

УДК: 616.155.392

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ОСНОВНОГО ФАКТОРА РОСТА
ФИБРОБЛАСТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ****^{1,2}Бакиров Б.А., ^{1,3}Каримов Д.О., ^{1,3}Викторова Т.В., ⁴Бессмельцев С.С.**¹ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Росздрава»,
Уфа, e-mail: bbakirov@mail.ru;²Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова, Уфа;³Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа;⁴Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии,
Санкт-Петербург

С целью определения роли полиморфного варианта гена основного фактора роста фибробластов (VEGF) в развитии и течении хронического лимфолейкоза был проведен анализ частот генотипов и аллелей у больных хроническим лимфолейкозом (N = 123) и здоровых индивидов (N = 101), проживающих в республике Башкортостан. Анализ распределения частот генотипов и аллелей изучаемого гена показал, что маркером повышенного риска развития хронического лимфолейкоза является аллель Т полиморфного локуса 773С > Т гена bFGF.

Ключевые слова: гены онкогенеза, генетический полиморфизм, хронический лимфолейкоз**BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTORS GENES POLYMORPHISMS
IN CHRONIC LYMPHATIC LEUKEMIA PATIENTS****^{1,2}Bakirov B.A., ^{1,3}Karimov D.O., ^{1,3}Viktorova T.V., ⁴Bessmeltsev S.S.**¹Bashkir State Medical University, Ufa, e-mail: bbakirov@mail.ru;²Republical Clinical Hospital, Ufa;³Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Ufa;⁴Russian Research Institute Hematology and Transfusiology, St.Petresburg

To study the role of polymorphic variant basic fibroblast growth factor gene in chronic lymphatic leukemia formation we carried out the comparative analysis of alleles and genotypes distributions in chronic lymphatic leukemia patients (N = 123) and healthy individuals (N = 101) from Bashkortostan Republic. Analysis of the frequency distribution of genotypes and alleles of the studied genes showed that marker of increased risk of chronic lymphocytic leukemia is T allele of the polymorphic locus 773C > T gene bFGF.

Keywords: genes of oncogenesis, genetic polymorphism, chronic lymphocytic leukemia

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – заболевание лимфоидной ткани, характеризующееся клональной пролиферацией и неуклонным накоплением длительно живущих опухолевых лимфоцитов в периферической крови, костном мозге, лимфатических узлах, селезенке, печени и других органах и тканях. При этом злокачественные лимфоциты не способны выполнять свои иммунные функции. Распространенность ХЛЛ в настоящее время 3 на 100 тыс. населения, в 2004 году в США было выявлено 8190 новых случаев. Частота семейных случаев составляет не более 10%. В последние годы был изучен ряд генов, продукты которых предположительно влияют на риск развития ХЛЛ, однако лишь для нескольких из них он был доказан [1].

В большинстве случаев диагноз ХЛЛ ставится уже на поздних стадиях болезни после присоединения осложнений. Между тем хорошо известно, что эффективность лечения ХЛЛ и качество жизни больных значительно повышаются при раннем на-

значении адекватной терапии. В связи с этим важной задачей онкогематологии является поиск прогностических критериев, позволяющих в наиболее ранние сроки оценить риск развития ХЛЛ [1, 5].

В регуляции процессов кроветворения принимает участие множество факторов роста, среди которых важным является основной фактор роста фибробластов – 2 bFGF (OMIM 134920). Белок bFGF представляет собой фактор широкого спектра действия, обладающий митогенной, ангиогенной и нейротрофической активностью. Он стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток путем активации серин/треониновой протеинкиназы raf1и опосредует организацию эндотелиальных клеток в капиллярно-подобные структуры. Белок bFGF играет важную роль в процессах быстрого увеличения количества бластных клеток, которые являются общим предшественником гематопозитических и эндотелиальных клеток – гемангиобластов [2, 5, 7]. Кроме того, bFGF регулирует процессы кроветворения,

управляя выживанием стволовых кроветворных клеток. Различные дефекты, связанные с подавлением функции bFGF, ведут к снижению выживания кроветворных клеток, а также нарушению процесса формирования их колоний [1]. Ген bFGF расположен в коротком плече и имеет 4 хромосомы (4q25-q27).

Целью настоящего исследования было изучение частот полиморфного варианта 773C > T гена bFGF у больных ХЛЛ и здоровых индивидов в Республике Башкортостан и поиск возможных ассоциаций генотипов и гаплотипов этих генов с развитием ХЛЛ.

Материалы и методы исследования

Молекулярно-генетической анализ образцов ДНК проведен у 224 человек – жителей Республики Башкортостан. В группу больных ХЛЛ вошли 123 пациента, находившиеся на стационарном лечении в гематологическом отделении Республиканской клинической больницы г. Уфы. Средний возраст обследованных пациентов, отобранных случайным образом, составил $49,6 \pm 1,4$ лет. На долю мужчин приходилось – 52,85% (65 человек), женщин – 47,15% (58 человек). По этнической принадлежности среди больных ХЛЛ оказалось 52 русских (42,28%), 54 татар (43,90%), 17 башкир (13,82%). Клиническое обследование больных проводилось врачами больницы и включало в себя обязательные и дополнительные методы исследования.

В качестве контроля были использованы образцы ДНК 101 практически здорового индивида, отобранные с учетом возраста ($47,3 \pm 1,6$), половой принадлежности (53 мужчины – 52,48%, 48 женщин – 47,52%) и этнического состава (43 русских – 42,57%, 44 татар – 43,56%, 14 башкир – 13,86%).

Образцы ДНК были выделены из лимфоцитов периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции [6].

Изучение полиморфных локусов проводилось методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК. Для генотипирования использовались локуспецифические олигонуклеотидные праймеры (F-5'-CAGGATTTGTGTGCTGTGG-3', R-5'-GGTTCGAGAAGTTTTTGAAGA-3') и эндонуклеаза рестрикции (BsuRI) [2].

Математическую обработку результатов исследования проводили на IBM-Pentium IV с использованием статистических программ BIOSTAT (Primer of Biostatistics, 4th Edition, S.A. Glantz, McGraw-Hill), а также в программах Statistica, Microsoft Excel.

Достоверность различий в распределении частот аллелей и генотипов между группами и ассоциацию с клиническим течением заболевания, выявляли, сравнивая выборки с использованием критерия χ^2 с поправкой Йейтса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Относительный риск заболевания по конкретному признаку вычисляли как отношение шансов, доверительный интервал для относительного риска. Анализ выживаемости проводился по методу Каплан-Мейер [23].

Результаты исследования и их обсуждение

Распределение частот генотипов изученного гена bFGF в группах больных и здоровых индивидов соответствовало ожидаемому по равновесию Харди-Вайнберга.

При сравнении общей выборки больных ХЛЛ и группы контроля выявлены достоверные различия по частотам генотипов полиморфного локуса 773C > T гена bFGF (таблица).

Частоты генотипов и аллелей полиморфных локусов в группах больных ХЛЛ и здоровых индивидов

Полиморфный вариант	Генотипы, аллели	Больные N = 123	Контроль N = 101	χ^2	p	OR	95% CI
773C > T ген bFGF	ТТ	40,65 %	56,44 %	4,92	0,027	0,52	0,31–0,90
	СТ	48,78 %	36,63 %	2,86	0,091	1,64	0,96–2,82
	СС	10,57 %	6,93 %	0,51	0,475	1,58	0,61–4,14
	Т	65,00 %	74,75 %	4,48	0,035	0,62	0,41–0,94
	С	35,00 %	25,25 %	4,48	0,035	1,57	1,05–2,30

Примечание: жирным шрифтом выделены ячейки с достоверным уровнем значимости ($p \leq 0,05$).

В группе больных ХЛЛ достоверно реже встречался генотип СС по сравнению с группой контроля (40,65 и 56,44% соответственно, $\chi^2 = 4,92$; $p = 0,027$). Частота аллеля С полиморфного локуса 773C > T гена bFGF в группе больных ХЛЛ достоверно больше, чем в группе контроля (35,00 и 25,25% соответственно, $\chi^2 = 4,48$; $p = 0,035$). Существенные различия также наблюдались по частотам аллеля Т (в кон-

трольной группе – 74,75% и в группе больных ХЛЛ – 65,00% $\chi^2 = 4,48$; $p = 0,035$). По частотам генотипа ТТ достоверных различий не обнаружено.

При исследовании механизмов такого сложного многостадийного процесса, как опухоль, мутациям генов отводится большая роль. Хотя изменение отдельного онкогена может вызывать предрасположенность к раку, для того чтобы опухоль

развилась, необходимы последующие мутации, затрагивающие другие онкогены, в частности, гены-супрессоры опухолей или гены, контролирующие программируемую клеточную смерть. Каждый из генов, принадлежащих к этим трем категориям, выполняет свою роль по разным механизмам. Вопрос в том, как они взаимодействуют в многоступенчатом процессе, приводящем, в конечном счете, к возникновению раковой клетки, и какова их роль в нормальных процессах жизнедеятельности.

В то время как значимость для гематопоза микросреды костного мозга давно доказана [7], роль, которую играют клетки эндотелия и ангиогенные факторы в образовании гематологических опухолей, стала очевидной лишь в последнее время [4]. Одновременная экспрессия bFGF и его рецепторов была установлена в миелобластах и незрелых миелоидных элементах при остром миелоидном лейкозе, множественной миеломе и ХЛЛ, что свидетельствует о силе аутокринного воздействия bFGF на опухолевые клетки этих типов. Было продемонстрировано, что bFGF стимулирует *in vitro* колониобразование лейкозных клеток, выделенных у пациентов с хроническим миеломоноцитарным лейкозом, в то время как нейтрализация bFGF с помощью антител подавляет подобные эффекты. Кроме того, активизация клеток эндотелия bFGF приводит к производству дополнительных цитокинов и гематопозитических факторов роста (например, Г-КСФ, ИЛ-6 и ИЛ-8), которые, в свою очередь, на протяжении всего периода действия паракринного механизма способствуют росту лейкозных клеток [2]. Известно, что стволовые клетки функционируют в тесном контакте с кроветворным микроокружением. Важным компонентом кроветворного микроокружения являются веретенновидные остеобласты, формирующие вместе с другими клетками функциональную нишу для покоящихся стволовых клеток [4]. Ниша для пролиферирующих СКК располагается в синусах костного мозга и связана с эндотелиальными клетками, экспрессирующими различные факторы роста. Одним из важнейших является фактор роста и регуляции клеток эндотелия bFGF. Нарушение взаимодействия стволовой кро-

ветворной клетки со своим микроокружением может приводить к патологическим изменениям пролиферации и дифференцировке стволовых клеток и, как следствие, развитию ХЛЛ.

Выводы

Таким образом, в результате проведенного исследования нами были определены маркеры риска развития ХЛЛ: аллель С полиморфного локуса 773С > Т гена bFGF (OR = 1,57).

Список литературы

1. Di Bernardo M.C., Crowther-Swanepoel D., Broderick P., Webb E., Sellick G., Wild R., et al. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia // *Nat Genet.* – 2008. – Vol. 40. – P. 1204–1215.
2. Faloon P., Arentson E., Kazarov A., Deng C.X., Porcher C., Orkin S., Choi K. Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. – 2000, *Development* 127. – P. 1931–1941.
3. Hiroshi Hirata¹, Yuji Hinoda², Nobuyuki Kikuno¹, Ken Kawamoto¹, Yutaka Suehiro², Yuichiro Tanaka¹ and Rajvir Dahiya¹ MDM2 SNP309 Polymorphism as Risk Factor for Susceptibility and Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma // *Clinical Cancer Research.* – 2007. – Vol. 13. – P. 123–129.
4. Huizinga T.W., Westendorp R.G., Bollen E.L., Keijzers V., Brinkman B.M., Langermans J.A., Breedveld F.C., Verweij C.L., van de Gaer L., Dams L., Crusius J.B., García-González A., van Oosten B.W., Polman C.H., Peña A.S. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients // *J Neuroimmunol.* – 1997. – Vol. 72. – P. 53–58.
5. Linet M.S., Schubauer-Berigan M.K., Weisenburger D.D., Richardson D.B., Landgren O., Blair A., et al. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis // *Br J Haematol.* – 2007. – Vol. 139. – P. 86–94.
6. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // *Methods in Molecular Biology.* Ed. Walker J.M. – N.Y., L.: Human Press. – 1984. – Vol. 2. – P. 31.
7. Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli / A. Alavi, J.D. Hood, R. Frausto, D.G. Stupack, D.A. Cheresh *Science.* – 2003 Jul 4. – Vol. 301(5629). – P. 94–6.

Рецензенты:

Гимранова Г.Г., д.м.н., зам. директора ФГУН «Уфимский НИИ Медицины труда и экологии человека» Роспотребнадзора, г. Уфа;

Максимов А.Г., д.м.н., доцент, доцент кафедры факультетской терапии ФГБОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, г. Санкт-Петербург.