

**ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский
университет» Росздрава
ФГУН «Уфимский научно-исследовательский институт
медицины труда и экологии человека» Роспотребнадзора**

**Б.А. Бакиров, Д.Х. Калимуллина, А.Б. Бакиров,
Т.В. Викторова**

**Распространенность и прогностическое
значение молекулярно-генетических маркеров
при множественной миеломе и хроническом
лимфолейкозе**

Уфа -2009

УДК 616-006:616.15
ББК 54.103+55.6
Р 24

Бакиров Б.А., Калимуллина Д.Х., Бакиров А.Б., Викторова Т.В.

Распространенность и прогностическое значение молекулярно-генетических маркеров при множественной миеломе и хроническом лимфолейкозе.
- Уфа: Изд-во «Мир печати» 2009. -104 с.

Монография посвящена одной из актуальных проблем онкогематологии-множественной миеломе и хроническому лимфолейкозу. Авторами представлен анализ современной литературы по эпидемиологии, этиологии, патогенезу, клиническим проявлениям и генетике двух наиболее часто встречающихся лимфопролиферативных заболеваний. Особое внимание уделено анализу основных эпидемиологических показателей данных заболеваний в Республике Башкортостан, состоянию сердечно-сосудистой системы и молекулярно-генетическим аспектам множественной миеломы и хронического лимфолейкоза.

Рецензенты:

*профессор, зав.кафедрой терапии и общеврачебной практики
с курсом гериатрии и подготовки врача общей практики
ИПО БГМУ В.И. Никуличева руководитель клиники иммуногематологии
МОНИКИ им. Владимирского, академик РАЕН,
заслуженный врач Российской Федерации,
профессор А.К. Голенков*

ISBN 978-5-9613-0106-9

© Бакиров Б.А., Калимуллина Д.Х.,
Бакиров А.Б., Викторова Т.В., 2009
© Издательство «Мир печати», 2009

**А.Б. Бакиров, Д.Х. Калимуллина, Б.А. Бакиров,
Т.В. Викторова**

**Распространенность и прогностическое значение
молекулярно-генетических маркеров
при множественной миеломе и хроническом лимфолейкозе**

		Содержание	Страницы
Введение		Лимфопролиферативные заболевания: современные представления.	5
Глава 1		Эпидемиология множественной миеломы	6
Глава 2	2.1	Клинико-генетические ассоциации генов детоксикации ксенобиотиков при множественной миеломе	21
	2.2	Клинико-генетические ассоциации генов цитокинов при множественной миеломе	42
Глава 3		Эпидемиология и факторы риска развития хронического лимфолейкоза	57
Глава 4	4.1	Клинико-генетические ассоциации генов детоксикации ксенобиотиков при хроническом лимфолейкозе	72
	4.2	Клинико-генетические ассоциации генов цитокинов при хроническом лимфолейкозе	76
		Список литературы	88

Список сокращений

ММ – множественная миелома

ИЛ – 6 – интерлейкин 6

ФНО – фактор некроза опухолей

АТФаза – аденозинтрифосфатаза

ХЛЛ – хронический лимфолейкоз

gp – гликопротеин

Pgp – Р-гликопротеин

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

TNF – тумор-некротизирующий фактор (фактор некроза опухолей)

GST – глутатион S трансферазы

CYP – цитохром P-450

MDR – multidrug resistance

HLA – human leucocytes antigens

Введение

Множественная миелома и хронический лимфолейкоз являются одними из самых распространенных заболеваний системы кроветворения. Так, множественная миелома имеет распространенность 1-5 на 100 000 населения. Хронический лимфолейкоз также является самым часто встречающимся видом лейкоза в странах Европы и Северной Америки, в этих странах на его долю приходится 30% всех онкологических заболеваний (Bloomfield C.D. et al., 1993).

Заболеваниями страдают преимущественно люди старших возрастных групп, однако за последние годы наметилась тенденция к увеличению среди заболевших доли лиц молодого возраста. Распространенность заболеваний неравномерна по миру и требует изучения с целью оптимизации организации помощи этому контингенту больных. Также неоднозначна позиция ученых по вопросу о факторах риска развития множественной миеломы и хронического лимфолейкоза. В литературе широко обсуждается проблема связи генетически детерминированной чувствительности к внешнесредовым факторам. Цитокины выполняют в организме разнообразные функции. Цитокины воздействуют на клетку, связываясь со специфическими рецепторами на цитоплазматической мембране и вызывая, тем самым, каскадную реакцию, ведущую к индукции, усилению или подавлению активности ряда регулируемых ими генов. Уровень цитокинов в сыворотке крови может быть обусловлен степенью экспрессии соответствующих генов. Поэтому изучение клинко-генетических ассоциаций при лимфопролиферативных заболеваниях является весьма актуальным с позиций выявления генетических маркеров течения заболеваний.

Глава 1

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

Множественная миелома (ММ) – это лимфопролиферативное заболевание из группы зрелоклеточных В - клеточных опухолей, морфологическим субстратом которого являются плазматические клетки, продуцирующие моноклональные иммуноглобулины (Воробьев А.И., 2003).

Множественная миелома составляет 1% онкологических заболеваний и немногим более 10% гемобластозов (International Myeloma Foundation. Concise Review. -USA Edition, 2003). Болеют множественной миеломой лица преимущественно в возрасте старше 40 лет; средний возраст больных составляет 69 лет (DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A., 1997; Hoffman R., Benz E.B., Shattil S.J., Furie B., 1995; Herrington L., Weiss N.S., Olsan F., 1995). На более ранний возраст приходится лишь 2-3% случаев. В литературе описаны только единичные случаи заболевания больных моложе 30 лет (Андреева Н.Е., Чернохвостова Е.В., 1985; DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A., 1997; Hoffman R., Benz E.B., Shattil S.J., Furie B., 1995).

Показатели заболеваемости ММ заметно отличаются по регионам мира. Известно, что в США частота заболеваемости ММ среди выходцев из Африки в 2 раза выше, чем среди белого населения. Возможно, причина этого явления кроется в том, что и в норме у представителей черной расы плазматических клеток больше, чем у белой расы (Дьюри Б.Г., 1987).

Для нивелирования влияния возрастной структуры на показатели заболеваемости и смертности принято рассчитывать стандартизованные показатели. Так как ММ встречается преимущественно среди лиц пожилого возраста, то при этом заболевании интенсивный и стандартизованный показатели могут значительно отличаться. В таблице 1 представлены стандартизованные показатели заболеваемости ММ в России и некоторых странах мира (Cancer Incidence in Five Continents, ARS Sca Publ., 1992).

Таблица 1

Стандартизованные показатели заболеваемости и смертности при ММ в России и некоторых странах мира в расчете на 100000 населения

Страна	Заболеваемость		Смертность	
	Мужчины	Женщины	Мужчины	Женщины
Россия	0,82	0,73	-	-
С-Петербург	0,90	0,74	-	-
США белокожие	3,6	2,4	2,39	1,65
США чернокожие	6,99	4,79	4,03	2,99
Канада	3,93	2,68	2,55	1,75
Великобритания	3,0	2,0	2,55	1,70
Швеция	3,82	2,52	2,45	1,61
ФРГ	1,79	1,1	1,37	0,71
Италия	3,04	2,47	2,33	1,64
Франция	2,4	2,0	1,91	1,46
Япония	1,8	1,62	0,99	0,99
Куба	1,94	2,46	1,89	1,43

В исследовании О.И. Камаевой и соавт. (1997) стандартизованная заболеваемость ММ на 100000 населения составила 4,09 для мужчин и 3,18 для женщин; при среднем значении 3,5 на оба пола.

R. J. Q. Mc Nally и соавт (1996) изучали частоту и распространенность лейкозов и лимфом в Северной Ирландии за период с 1989 по 1993 г. Оказалось, что частота ММ в Северной Ирландии выше, чем в Англии и Уэльсе. M. A. Hussein et al. (2002) отмечают, что ММ – второй по частоте гематологический рак после неходжкинской лимфомы в США на долю которого приходится 10% всех злокачественных новообразований. I. Bray et al. (2001) при прогнозировании темпов роста заболеваемости опухолями, отметили, что ожидаемые темпы роста заболеваемости ММ в Дании, Израиле, Новой Зеландии, Оксфорде и штате Юта в 2003-2007 годах ниже, чем неходжкинскими лимфомами.

R.A. Cartwright, et al. (2002) показали, что важным фактором риска гематологических заболеваний является половая принадлежность. ММ подвержены как мужчины, так и женщины. По данным Сапсет

Incidence in Five Continents (1992), в США, Великобритании, Канаде, ФРГ чаще болеют мужчины, на Кубе – женщины. Наряду с этим, во Франции и Японии уровень заболеваемости среди мужчин и женщин практически не отличается. Е. Crocetti et al. (2002) анализировали заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований в центральной Италии. Авторы отмечают увеличение заболеваемости ММ среди женщин и увеличение смертности как среди женщин, так и мужчин.

ММ известна как «болезнь пожилого возраста». Однако, по данным К.М. Абдулкадырова и соавт.(1997) наметилась тенденция к «омоложению»: средний возраст больных составил $55,5 \pm 6,05$ лет при доле лиц моложе 50 лет 16,7%. О.И. Камаевой и соавт. (1997) случаи заболеваемости ММ зарегистрированы, начиная с возраста 40-49 лет (1,92 на 100000 прикрепленного контингента). Самые высокие цифры заболеваемости -39,32-выявлены для лиц старше 70 лет. Проанализировав причины смертности пожилых мужчин и женщин от ММ в 23 Европейских странах, США и Японии, Q.F. Levi et al.(2001) пришли к выводу, что увеличение смертности, возможно, связано не только с увеличением заболеваемости, но и с улучшением диагностики. S. Franceschi, et C. La Vecchia (2001) изучали эпидемиологию раковых заболеваний у пожилых. Авторы считают, что возраст – не самый важный детерминант риска рака, но он увеличивает время воздействия канцерогенных веществ. Подчеркивается трудность интерпретации данных заболеваемости по ММ, т.к. это может быть связано с улучшением диагностики.

По современным представлениям, факторами риска развития ММ являются контакт с пестицидами, нефтепродуктами, воздействие радиации. И наоборот, иммуносупрессия, длительное раздражение иммунной системы (ревматические болезни) не сочетаются с повышенной заболеваемостью ММ (Barlogie B, Gale R.P., 1992). Н.Е.Андреева и Е.В.Чернохвостова приводят свидетельства об индуцирующем влиянии хронической антигенной стимуляции (Андреева Н.Е., Чернохвостова Е.В., 1985).

S.A. Khuder, A.B. Mutgi (1997) провели метаанализ связи множественной миеломы с сельскохозяйственным производством. Оказалось, что на ММ приходится 20% от всего числа гемобластозов.

В США тенденция к росту заболеваемости ММ наиболее выражена в центральных сельскохозяйственных районах страны. При анализе 32 публикаций за 1981-1997 г.г. в 28 сообщениях отмечена положительная корреляция между риском развития ММ и участием больных в сельскохозяйственном производстве. Стандартизированный относительный риск ММ у мужчин и женщин, работающих в сельском хозяйстве, составил 1,23 (при 95% доверительном интервале от 1,14 до 1,32), а у фермеров центральных районов США – 1,38 (1,27-1,51).

Предполагается, что взаимосвязь между развитием ММ и участием в сельскохозяйственном производстве объясняется влиянием разнообразных неблагоприятных факторов – пестицидов, инсектицидов, гербицидов, растворителей, микроорганизмов (Baker B. 2000). Neil Pearse, S. Reif John (1990) также выявили повышенную заболеваемость ММ у сельскохозяйственных рабочих. Одной из возможных причин авторы считают использование гербицидов или влияние вирусов животных. K. Wiklund (1986) проанализировал частоту развития раковых заболеваний среди шведских сельскохозяйственных рабочих и выявил повышенный риск развития рака печени, простаты, желудочно-кишечного тракта, злокачественных меланом и миеломы. L. Fritschi et al. (2002) исследовали в Канаде влияние профессии, связанной с работой с животными, на риск развития миеломы. Оказалось, что индивидуумы, работающие с крупным рогатым скотом, имеют повышенный риск развития лейкемии и лимфом, в том числе ММ, а те, кто связаны с обработкой рыбы – уменьшенный риск этих заболеваний.

В литературе имеются данные, посвященные анализу заболеваемости ММ и связи с промышленным производством (Endol – Erdgas – Kohle, 1996). O. Wong, G.K. Raabe (1998) при обобщении результатов 22 международных когортных исследований более 250000 работников нефтяной промышленности отметили, что стандартизованный относительный риск смерти от ММ составил 0,93 и не зависел от стажа и вида работ. N. Becker et al. (2001) в обзоре по эпидемиологии лимфополиферативных заболеваний подчеркивают, что многие исследователи выявили слабо увеличенный риск развития ММ у лиц с асбестозом.

S.A. Speer et al. (2002) изучали зависимость заболеваемости ММ от таких факторов риска, как курение, проживание и работа на и вблизи со свалками отходов нефтяных и очистительных заводов в 643 случаях ММ. Оказалось, что риск заболевания выше у тех, кто живет 10 и более лет ближе мили от большой химической свалки.

L. Massoudi Barbara et al. (1997) установили связь между работой в химической промышленности и смертью, вызванной ММ. Этот же фактор явился причиной избытка новообразований у мужчин, умерших в молодом возрасте.

Fu Hua et al. (1996) отметили повышение смертности от ММ в группе рабочих обувных фабрик Италии, где по технологии использовался бензин. Bezabeh Shewit et al. (1996) проанализировали 13 опубликованных эпидемиологических исследований «случай-контроль» и не выявили связи между развитием ММ и производственным воздействием бензола либо его содержащих продуктов.

J.L. Hatcher et al. (2001) проанализировали связь 540 случаев недавно диагностированной ММ и диагностических рентгеновских исследований и не выявили никаких ассоциаций. Авторы предполагают, что диагностическое рентгеновское обучение не влияет на риск развития заболевания. Противоположное мнение у N. Dainiak (2002) который считает, что ММ может быть связана с хроническим воздействием ионизирующей радиации, особенно в пожилом возрасте. T. Iwasaki et al. (2003) установили положительную корреляцию между смертностью и дозой хронического облучения у рабочих ядерной промышленности Японии при ММ, но дополнительное исследование показало, что эти результаты могли быть связаны и с образом жизни рабочих. Таким образом, многочисленные эпидемиологические исследования показали неоднородность заболеваемости ММ в разных возрастных и профессиональных группах.

Распространенность множественной миеломы в Республике Башкортостан

Наибольший показатель заболеваемости составил 2,36 (всего выявлено 70 вновь заболевших ММ) в 1998 году. Наименьший показатель (0,33) зарегистрирован в 1976 году, когда было выявлено 8 вновь заболевших. Необходимо отметить, что заболеваемость за 20 лет значительно возросла.

Средний уровень заболеваемости за 20 лет возрос почти в 4 раза: с $0,5 \pm 0,079$ (1976-1980 г.г.) до $1,99 \pm 0,138$ (1996-2000 г.г.) ($p < 0,05$). Регрессионный анализ подтвердил рост заболеваемости, положительный коэффициент корреляции составил более 0,9 (рис.1).

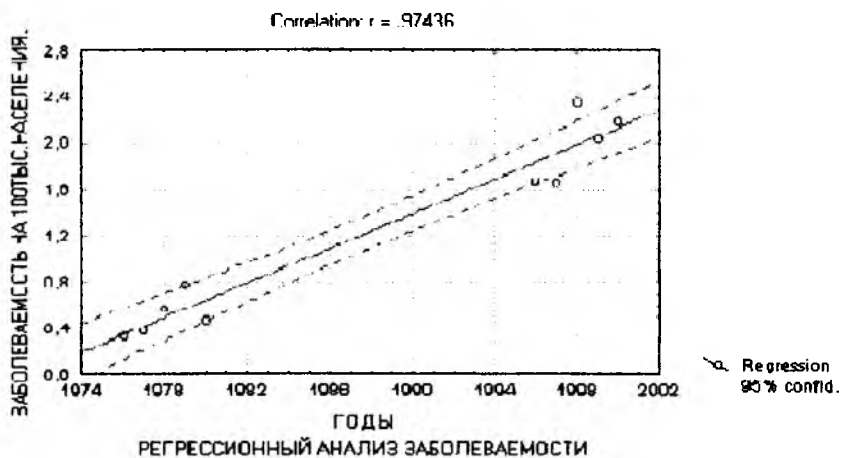


Рис.1
Регрессионный анализ заболеваемости

С целью нивелирования влияния возраста на показатель заболеваемости ММ, мы исследовали стандартизованный (Европейский) показатель заболеваемости ММ за период 1976 – 1980 и 1996 – 2000 годы. Выявлено, что он колебался в течение 20 лет с 0,23 в 1976 году до 4,76 в 1998 году. За исследуемый период отмечен рост стандартизованной заболеваемости ММ более чем в 3 раза.

Средние показатели стандартизованной (Европейской) заболеваемости составили $0,42 \pm 0,071$ (1976 – 1980 г.г.) и $1,49 \pm 0,114$ (1996 – 2000 г.г.), $p < 0,05$. При исследовании стандартизованного показателя наиболее четко прослеживается тенденция роста заболеваемости ММ за 1996-2000 годы (рис.2).

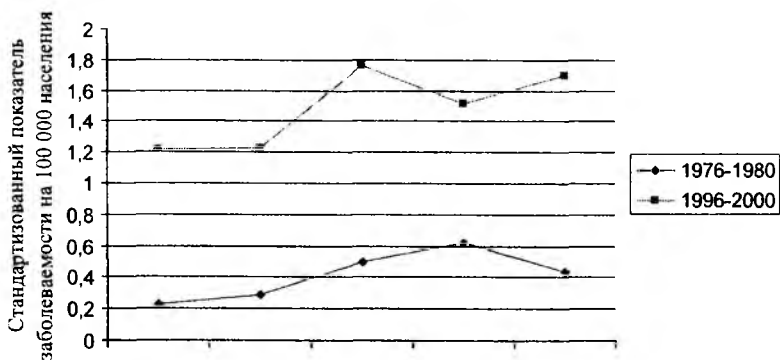


Рис.2.
Динамика стандартизованной заболеваемости
за 1976-1980 и 1996 – 2000 годы.

Регрессионный анализ стандартизованной заболеваемости за изучаемые периоды также свидетельствует о росте заболеваемости, коэффициент корреляции свыше 0,9 (рис.3). Это позволяет с высокой вероятностью прогнозировать рост заболеваемости ММ.

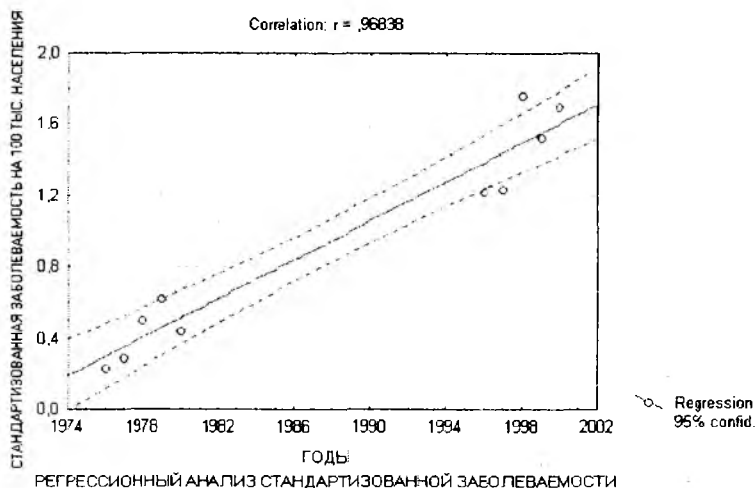


Рис. 3. Регрессионный анализ стандартизованной заболеваемости

Показатель стандартизированной заболеваемости по Республике Башкортостан оказался выше, чем в целом по России и по г. Санкт-Петербург: соответственно среди мужчин 0,82 и 0,90 и 0,73 и 0,74 среди женщин (Камаева О. И.; 1997).

Заболеваемость ММ среди городских и сельских жителей.

Представляло значительный интерес сравнение заболеваемости среди городских и сельских жителей за 1976-1980 и 1996-2000 г. Среди городских жителей максимального значения заболеваемость достигла в 1998 году - 2,22 и минимального – 0,42 в 1976 и 1977 годах (рис.4). В целом среди городских жителей рост заболеваемости за эти годы был статистически значим ($p < 0,01$).

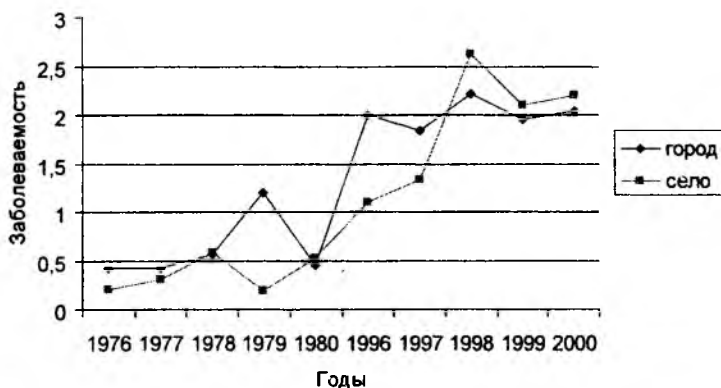
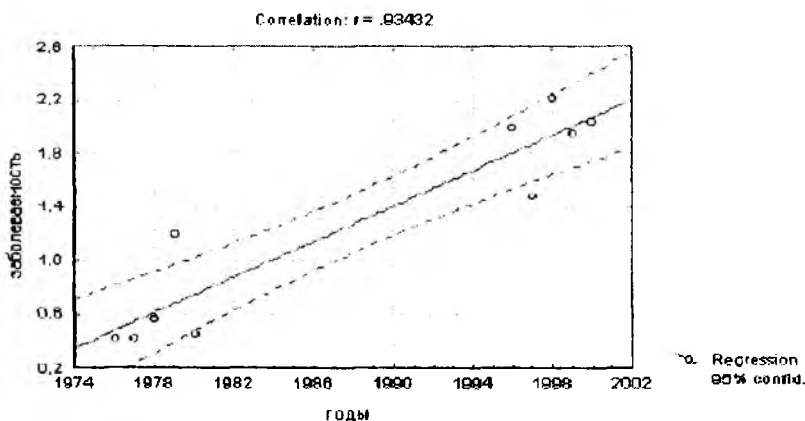


Рис. 4.

Заболеваемость ММ городских и сельских жителей Республики Башкортостан за 1976 – 1980 и 1996-2000 годы.

Средние значения заболеваемости городских жителей за исследуемые периоды приведены в таблице 5. Рост заболеваемости также был, статистически значим. Регрессионный анализ подтвердил рост заболеваемости среди городских жителей (рис.5), при этом коэффициент регрессии составил 0,9 ($p < 0,001$).



Анализ заболеваемости городского населения в Республике Башкортостан

Рис.5

Анализ заболеваемости городского населения в Республике Башкортостан

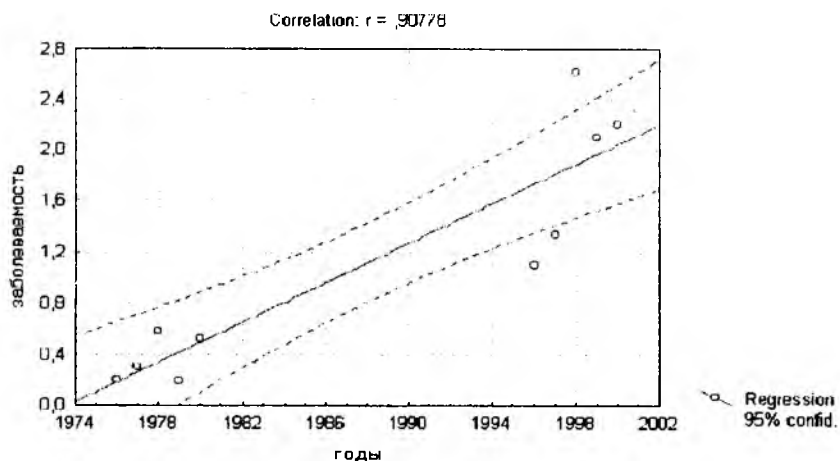
Заболеваемость сельских жителей ММ колебалась от 0,19 в 1979 году до 2,62 в 1998 году (рис.4). Рост заболеваемости этого контингента населения был статистически значим ($p < 0,01$). Средние значения заболеваемости сельских жителей приведены в таблице 5. При регрессионном анализе также получен положительный коэффициент регрессии 0,9 ($p < 0,003$). Это также свидетельствовало о неоспоримом росте заболеваемости (рис.6).

Средние уровни заболеваемости жителей городов за исследуемые периоды были выше, чем у сельских жителей, но разница не была статистически значимой (табл. 2).

Таблица 2

Средние уровни заболеваемости ММ жителей сел и городов
Республики Башкортостан за 1976 – 1980 и 1996 – 2000 годы.

Годы	Заболеваемость на 100000 городских жителей	Заболеваемость на 100000 сельских жителей
1976 – 1980 г.г.	$0,61 \pm 0,150$	$0,36 \pm 0,081$; $p_3 > 0,05$
1996 – 2000 г.г.	$2,01 \pm 0,062$; $p_1 < 0,01$	$1,87 \pm 0,283$; $p_2 < 0,01$ $p_3 > 0,05$



Анализ заболеваемости сельского населения в Республике Башкортостан

Рис. 6
Анализ заболеваемости сельского населения
Республики Башкортостан

P_1 – достоверность разницы заболеваемости городских жителей;
 P_2 – достоверность разницы заболеваемости сельских жителей; p_3 –
 достоверной разницы заболеваемости в сравнении городских и сель-
 ских жителей

Таким образом, выявлен рост заболеваемости ММ, как среди го-
 родских, так и среди сельских жителей. При этом темпы роста за-
 болеваемости сельских жителей оказались выше, чем у городских.
 Заболеваемость жителей городов была выше, чем у жителей сел, но
 разница была статистически не значима.

Анализ заболеваемости множественной миеломой по половой принадлежности.

Анализ заболеваемости по полу показал, что самый низкий
 уровень среди мужчин зарегистрирован в 1980 году -0,15- (всего 2
 вновь заболевших), а самый высокий в 1998 году (29 человек) – 2,43
 (рис.7).

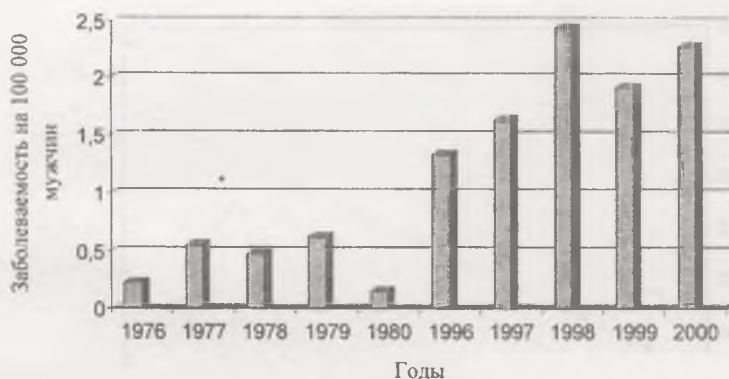


Рис. 7

Заболеваемость мужчин ММ за 1976-1980 и 1996-2000 годы

У мужчин самым подверженным ММ оказался возраст 60-75 лет. При этом в 1979 году пик заболеваемости у мужчин пришелся на возраст 65-69 лет и составил 8,03 на 100000 мужчин, то в 1996 году – 55-59 лет – 8,15; 65-69 лет – 9,55; 75-79 лет – 11,24. А так как в структуре населения лиц в возрасте 55-59 лет больше, чем 75-79 лет, то наблюдается как увеличение доли, так и абсолютного количества более молодых пациентов. Таким образом, прослеживается тенденция к «омоложению» ММ у мужчин в сочетании с ростом заболеваемости (статистические данные по возрастному и половому составу наиболее точно представлены в 1979 году - проводилась перепись населения). Сравнительный анализ заболеваемости мужчин в зависимости от возраста представлен на рисунке 8.

У женщин же самый низкий уровень составил 0,13 (2 больных) в 1977 году, а самый высокий в 1998 году – 2,28 (39 вновь заболевших ММ) (рис. 9).

Пик заболеваемости женщин в 1979 году был в возрасте 70-74 лет – 2,86; а в 1996 году – 60-64 лет – 5,09; в 1997 году – 65-69 лет – 8,06; в 1998 году – 60-64 года – 9,1; 1999 год – 70-74 лет – 6,68; 2000 год – 60-64 лет – 7,32 на 100000 женщин. У женщин также выявляется тенденция к «омоложению» ММ.

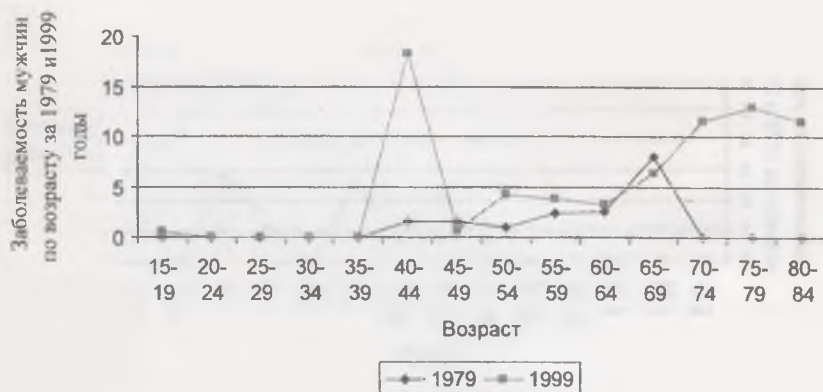


Рис.8.

Анализ заболеваемости мужчин по возрасту за 1976 – 1980 и 1996 – 2000 годы.

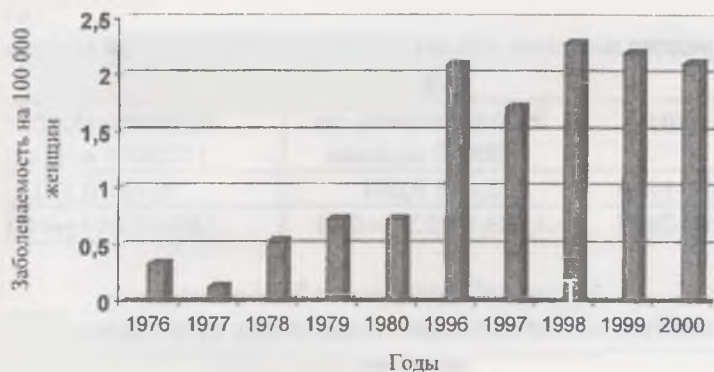


Рис.9

Заболеемость женщин ММ за 1976-1980 и 1996-2000 годы

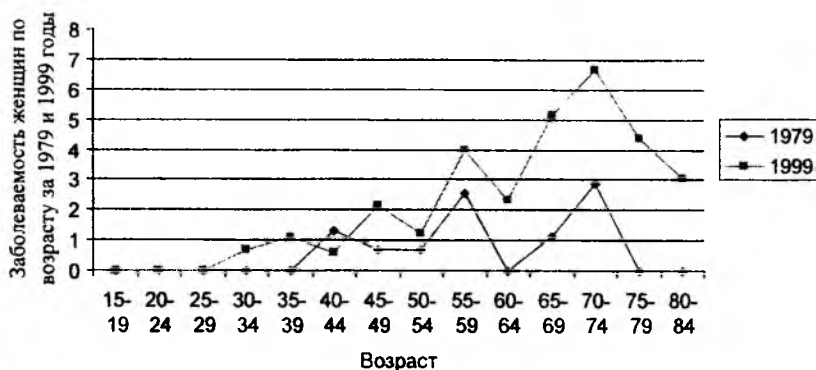


Рис. 10.

Анализ заболеваемости женщин по возрасту за 1976 – 1980
и 1996 – 2000 годы.

При сравнении заболеваемости ММ мужчин за исследуемые периоды установлено, что она выросла за 20 лет в 4,5 раза ($p < 0,01$), а среди женщин в 4,2 раза ($p < 0,01$). В целом уровень заболеваемости мужчин и женщин отличался незначительно, хотя среди женщин он был выше ($p > 0,05$; табл.3).

Таблица 3

Средние значения заболеваемости множественной миеломой
мужчин и женщин

Годы	Заболеваемость на 1000000 мужчин	Заболеваемость на 1000000 женщин
1976-1980	0,40± 0,091	0,49± 0.117
1996-2000	1,92± 0,202, $p < 0,01$	2,07± 0,097, $p < 0,01$

Анализ заболеваемости ММ по возрасту.

Известно, что заболеванию подвержены лица пожилого возраста, поэтому представляло значительный интерес изучение заболеваемости ММ лиц трудоспособного и старше трудоспособного возраста. Результаты исследования отражены в таблице 4. В целом заболеваемость среди лиц старше трудоспособного возраста выросла в большей степени, чем среди лиц трудоспособного возраста.

Таблица 4

Динамика заболеваемости ММ среди лиц трудоспособного и старше трудоспособного возраста.

Возраст	Заболеваемость ММ	
	1976 - 1980	1996 - 2000
Трудоспособный возраст	$0,43 \pm 0,206$	$1,18 \pm 0,435$; $p > 0,05$
Старше трудоспособного возраста	$0,67 \pm 0,357$	$3,92 \pm 0,969$; $p > 0,05$

Анализ заболеваемости по возрастным группам за исследуемые 20 лет выявил тенденцию к увеличению доли лих молодого возраста. Так, за 1976 – 1980 годы не был зарегистрирован ни один пациент в возрасте от 15 до 35 лет. А за период с 1996 – 2000 годы выявлены пациенты уже с 16 лет. Пик заболеваемости за 1976 – 1980 годы составил 2,21 для лиц в возрасте 65 – 69 лет, то через 20 лет этот уровень характерен для возраста 50-54 лет. Наибольший же уровень заболеваемости за 1996 – 2000 годы составил 6,48 для лиц в возрасте 65 – 69 лет. Почти в 5 раз возросла заболеваемость лиц в возрасте 35 – 39 лет, в 3,5 раза в возрасте 45 – 54 лет и 5,7 раз 60 – 64 лет. Таким образом, в нашем исследовании выявлена отчетливая тенденция к увеличению доли лиц молодого возраста, хотя пик заболеваемости и приходится на возраст 65-69 лет.

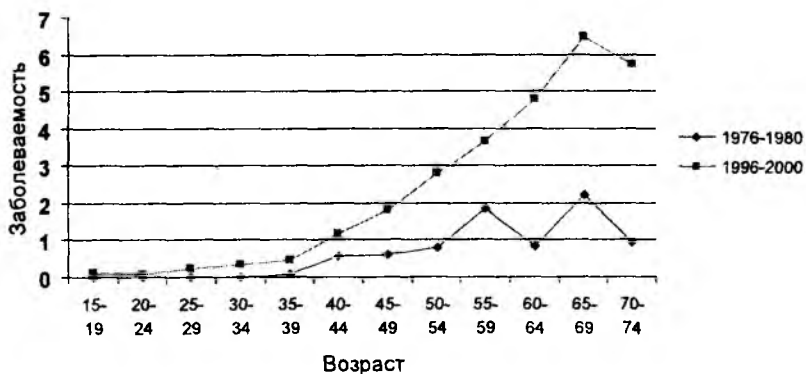


Рис. 11.

Заболеваемость множественной миеломой на 100000 населения по возрасту.

Анализ смертности от ММ в Республике Башкортостан за период с 1976 – 1980 и 1996 – 2000 годы.

Смертность за исследуемый промежуток времени колебалась от 0,29 в 1976 году до 2,14 в 1998 году. В целом, безусловно, необходимо отметить увеличение этого показателя.

Средний уровень смертности от множественной миеломы за 1996 – 2000 годы почти в 4 раза превысил уровень смертности за 1976 - 1980 годы (табл.5) .

Таблица 5

Средний уровень смертности от ММ на 100000 взрослого населения за 1976 – 1980 и 1996 – 2000 годы

Изучаемые годы	Показатель смертности на 100000 населения	Стандартизованный (Европейский) показатель смертности на 100000 населения
1976 – 1980	$0,41 \pm 0,064$	$0,36 \pm 0,054$
1996 – 2000	$1,6 \pm 0,21$	$1,22 \pm 0,171$

Мы также исследовали летальность от ММ в Республике Башкортостан за период с 1996-1980 и 1996-2000 годы. Хотя отмечена тенденция к росту летальности, но разница оказалась статистически не значимой. Если за 1976-1980 г. в среднем она составила $81,79 \pm 3,31$, то через 20 лет $89,0 \pm 6,25$ ($p > 0,05$).

Таким образом, за последние 20 лет отмечен рост заболеваемости и смертности от ММ. Статистически значимой разницы между заболеваемостью ММ сельского и городского населения не обнаружено. ММ болеют лица преимущественно пожилого возраста, но есть тенденция к увеличению доли лиц молодого возраста. Заболеваемость ММ неравномерна по административным районам РБ.

Глава 2

2.1. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ ГЕНОВ ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Полиморфизм гена цитохрома Р-450 (СУР1А1) у больных множественной миеломой

По классификации REAL миелома относится к лимфоидным опухолям низкой степени злокачественности (Harris N.L., Jaffe E.S., Stein H. et al., 1994). Миеломные клетки при ММ локализованы в костном мозге чаще всего в тесной ассоциации со стромальными клетками. Они являются долгоживущими клетками, в которых гены иммуноглобулинов подвергаются соматической гипермутации способом, очень напоминающим антигенную селекцию. Миеломные клетки имеют значительно сниженный уровень секреции иммуноглобулинов в сравнении с нормальными плазматическими клетками. В костном мозге миеломные и стромальные клетки секретируют цитокины и взаимодействуют друг с другом. При этом активируются стромальные клетки (включая остеокласты), которые в дальнейшем поддерживают рост и выживание миеломных клеток и ведут к осложнениям, связанным с множественной миеломой (Kuninaka S. et al., 2000; Klein B. et al., 1995).

В настоящее время не вызывает сомнения, что при онкологических заболеваниях ведущую роль играют генетические изменения, которые уже на раннем этапе заболевания могут определить его прогноз. Это возможно на основе изучения иммуногенетических характеристик больного, таких как HLA-фено - и/или генотип (Голенков А.К., Шабалин В.Н., 1995). Учитывая, что В-лимфоциты – основной источник морфологического субстрата опухоли при множественной миеломе - экспрессируют на своей поверхностной мембране HLA-антигены 1 и 2 классов и активно участвуют в развитии иммунных реакций, становится понятной важность изучения распределения HLA-антигенов у больных множественной миеломой как одного из патогенетических и прогностических факторов. В отличие от других

прогностических признаков, HLA-аллели обусловлены генетически и не подвержены изменениям в процессе заболевания. М.И. Зарайским (1998) выявлено наличие в фенотипе больных множественной миеломой антигена HLA-B13, который статистически значимо коррелировал с агрессивным течением заболевания, а фенотип HLA-A28 оказался маркером индолентного течения множественной миеломы.

Описано достаточно большое количество цитогенетических нарушений при множественной миеломе. В исследовании Avet-Loiseau H. et al. (2002) показано, что при ММ можно говорить о 4 главных категориях генетических изменений, имеющих не только клиническое, но и прогностическое значение. Это пациенты 1) без транслокации 14q32 и делеции (13); 2) с транслокацией t 4;14 или t 14;16 и делецией (13); 3) с транслокацией 14q32 и делецией (13); 4) с транслокацией 14q32 и без делеции (13).

Хромосомные транслокации в локусе тяжелой цепи иммуноглобулина (IgH) на хромосоме 14q32 и реже в локусе легкой цепи (IgL) на хромосоме 22q11 являются ключевыми событиями многих В-клеточных гемобластозов, в том числе, и ММ. На ведущую роль делеции 13q и транслокации 14q32 в онкогенезе миеломы указывают Joy Но R. (2002), Pratt G. (2002). По мнению Fenton et al. (2002), транслокация 14q32 играет важную роль в патогенезе ММ, так как она может привести к образованию потенциального онкогена. Нормальные В-клетки подвергаются серии двухцепочечных разрывов ДНК для выработки функционального белка Ig с высоким сродством к антигену. Предполагают, что данное явление может предрасполагать локус Ig к возникновению транслокаций. Хотя механизмы, лежащие в основе возникновения транслокаций Ig остаются невыясненными, вполне допустимо, что могут возникать: ошибки в работе рекомбиназного комплекса при V(D)J-рекомбинации; сбой в механизме рекомбинации при переключении изотипа; дефекты молекулярной структуры генов репарации ДНК.

Dalton et al. (2001) описали маркеры хромосомных транслокаций, позволяющие отличить легитимное (нормальное) переключение классов иммуноглобулинов от нелегитимного (патологического). Транслокации IgH возникают как первичное событие приблизительно 50% опухолей при ММ (Dalton et al., 2001). Наиболее часто

в транслокации локуса IgH вовлечены следующие участки : 11q13, 4p16, 6p21, 16q23.

При использовании методов обычной цитогенетики и технологии FISH- анализа интерфаз, транслокации (11;14) (q13; q32) выявляются в ~15-20% случаев ММ (Avet-Loiseau et al., 1998; Fonseca R, 2002). В участке 11q13 точки разрыва при ММ распределены в участке длиной 330 т.н.п., который располагается в направлении центромеры по отношению к гену циклина D1. В норме В-клетки экспрессируют циклин D2 и циклин D3, но не циклин D1. В результате данной транслокации ген циклина D1оказывается в непосредственной близости к мощному энхансерному (усилительному) элементу транскрипции, расположенному в 3'- конце локуса IgH, что приводит к нарушению нормальной регуляции онкогена.

При транслокации 6p21 точки разрыва находятся на расстоянии 60 т.н.п. от гена циклина D3 и ассоциированы с 6-ти кратным повышением уровня его экспрессии (Shaughnessy et al., 2001).

Транслокация t (4;14) выявляется приблизительно в 15% случаев опухолей ММ (Avet-Loiseau et al., 1998). В исследованиях P.Moreau et al. (2002) показано, что пациенты с транслокацией t (4,14) имели худшие показатели выживаемости, чем при t (11,14). Точки разрыва участка 4p16 попадают в регион длиной 50-100 т.н.п. в направлении центромеры от гена 3-го рецептора фактора роста фибробластов (FGFR-3), который становится ассоциированным с энхансером в 3'-участке гена IgH. Данный ген в нормальных плазматических клетках не экспрессируется, однако активизируется при транслокации t (4;14). По данным Chesi et al. (2001), активированный ген FGFR3 является онкогеном, который индуцирует трансформацию в фибробластах, а также клетках гемопоэза. Sibley et al. (2002) обнаружили транслокацию t (4,14), связанную с FGFR-3 у 10% больных ММ.

Среди других партнерных геномных участков для транслокаций локуса IgH, содержащих потенциальный онкоген, можно назвать следующие: 16q23-c-maf; 8q 24-c-myc; 6p25-MUM1/IRF-4; 1q21-24-IRTA и IRTA2; 20q12-maf B и др. (Dalton W. et al., 2001).

Dalton W. et al. (2001) предлагается гипотетическая комплексная модель поэтапного патогенеза множественной миеломы. Авторы допускают, что первичная хромосомная транслокация, возникающая

во время процесса рекомбинации при переключении классов иммуноглобулинов (после того, как незрелые пре-В-клетки встретились с антигеном), располагает сильные энхансеры (усилители транскрипции) локуса тяжелой цепи иммуноглобулина вблизи ключевых онкогенов на партнерской хромосоме, участвующей в транслокации. Нарушение регуляции этих онкогенов является ранним, и, возможно, первым событием, превращающем нормальную плазматическую клетку в миеломную. С того момента, когда выявляются небольшие клоны миеломных клеток, возникает реальный риск возникновения кариотипической нестабильности с разнообразными хромосомными аномалиями. О возрастании кариотипической нестабильности свидетельствуют следующие факты: 1) частота выявляемых кариотипических аномалий коррелирует со стадией, прогнозом и ответом на проводимую терапию ММ. Например, 20% аномалий регистрируется на I стадии ММ, 60% - на II и больше 80% на последней, экстрамедулярной стадии; 2) дополнительно к перечисленным выше транслокациям, при прогрессировании ММ обнаруживаются другие генетические нарушения: аномалии хромосомы 13 (чаще всего делеции); активирующие мутации онкогенов N- и K-ras; инактивирующие мутации гена супрессора опухолей p53; инактивация негативного регулятора клеточного цикла p16/INK4a путем метилирования промотора данного гена. Р. Bernasconi (2002) также указывает на ведущую роль делеции 13 хромосомы в патогенезе ММ и гаммапатии неустановленного значения.

Возникновение же вторичных транслокаций, не вовлеченных в механизмы модификации, специфических для В-клеток участков ДНК, активизирует экспрессию дополнительных онкогенов (Corradini P. et al., 1994; Liu P.C. et al., 1996;).

Таким образом, современные достижения в области цитогенетики позволяют объяснить механизм возникновения многих гемобластозов, в том числе ММ. Однако исследования в области молекулярной генетики, позволяющие детализировать механизмы возникновения и уточнить особенности течения уже возникшего заболевания, крайне малочисленны. С этих позиций представляет интерес изучение полиморфизма генов, определяющих патогенез ММ (гены цитокинов) и генов детоксикации ксенобиотиков (ответственны за выведение из

клетки чужеродных веществ, в том числе лекарственных препаратов).

Особенности индивидуального генетического фона играют очень существенную роль в детерминации онкологического риска. В настоящее время проводятся исследования по выяснению роли факторов внешней среды и генов детоксикации ксенобиотиков на патогенез многочисленных опухолевых заболеваний.

Особенности индивидуального генетического фона играют очень существенную, если не решающую роль в детерминации онкологического риска. В настоящее время во многих лабораториях мира предпринимаются усилия по выяснению роли факторов внешней среды, а также значимости влияния генов внешней среды на патогенез многочисленных мультифакториальных заболеваний, к которым можно отнести и разнообразные опухолевые заболевания.

Генетическая конституция складывается из тысяч взаимодействующих полиморфных аллелей, причем, каждый полиморфизм по отдельности обладает лишь весьма умеренным эффектом. Поэтому роль нормальных вариаций генома в патологии с трудом поддается изучению, а результаты отдельных работ отличаются плохой воспроизводимостью. На сегодняшний день идентифицированы десятки полиморфных генов-кандидатов, которые могут принимать участие в формировании онкологического риска. К ним относятся представители семейств цитохромов, глутатион-трансфераз, ацетил-трансфераз, цитокинов, некоторые онкогены и антионкогены, участники гормонального метаболизма.

Известно, что большинство чужеродных веществ (ксенобиотиков), попадая в организм человека, не оказывает прямого биологического эффекта, но вначале подвергается различным превращениям, так называемой биотрансформации. Ферменты биотрансформации – цитохромы Р-450, эпоксидгидролазы, гуаниноксидоредуктазы, глутатион S-трансферазы, N-ацетилтрансферазы и т.д. - участвуют в метаболизме лекарственных препаратов, канцерогенов и других ксенобиотиков. В классическом варианте система метаболизма ксенобиотиков включает три последовательных этапа: активация (фаза 1), детоксикация (фаза 2) и выведение (фаза 3). Обычно первые две фазы, при совместном действии, приводят к превращению многих

тысяч ксенобиотиков в более гидрофильные и менее токсичные метаболиты (Meyer U.A. and Zanger U.M., 1997; Nebert D.W., 1997; Кулинский В.И., 1999). Процессы связывания и выведения (фаза 3) также защищают организм от ксенобиотиков. Основные фазы обезвреживания ксенобиотиков индуцибельны, что имеет важное значение в биологии и медицине. Они функционируют как единый четко скоординированный комплекс, любые качественные или количественные отклонения, в работе которого сопровождаются нарушением процессов обезвреживания с непредсказуемыми, зачастую вредными последствиями для организма (Баранов В.С., 2000; Evans D.A.P., 1993).

Доказано, что у человека существует генетический контроль метаболизма, поэтому в зависимости от особенностей генома различные индивидуумы могут сохранять устойчивость или, наоборот, обнаруживать повышенную чувствительность к повреждающим агентам (Nebert D.W., 1997; Indulski J.A. and Lutz W., 2000; Buch S. et al., 2001). Предполагается, что индивидуальная предрасположенность к онкологическим заболеваниям также обусловлена различиями в детоксикации ксенобиотиков (Smith G., et al., 1995; Natagima A., 2002). Поскольку активность ферментов биотрансформации находится под контролем соответствующих генов, в последние годы появились исследования степени ассоциации между генетическими полиморфизмами и некоторыми заболеваниями, преимущественно онкологическими.

Фаза 1 (фаза активации, модификации), обеспечивается семейством ферментов – цитохромов P450, микросомальной эпоксидгидролазой, эстеразами, алкогольдегидрогеназами, альдегиддегидрогеназами (Арчаков А.И., 1975; Evans D.A.P., 1993; Crofts F., et al., 1994 и др.). Микросомальные гидроксилирующие системы локализованы в эндоплазматическом ретикулуме таких жизненно важных органов как, легкие, печень, мозг, почки, кожа и ответственны за биотрансформацию огромного числа гидрофобных соединений (Кулинский В.И., 1999; Evans D.A.P., 1993; Meyer U.A. and Zanger U.M., 1997; Nebert D.W., 1997). Ксенобиотики посредством монооксигеназной системы претерпевают ферментативную активацию в электрофильные соединения, которые детоксицируются и выводятся из организма. В отдельных случаях промежуточные продукты могут взаимодействовать с

ключевыми внутриклеточными макромолекулами, что связывают с возникновением токсических, тератогенных, мутагенных и канцерогенных эффектов.

Группа генов фазы 1 представлена генами суперсемейства цитохромов P-450, а также нецитохромных окислителей. У человека уже идентифицировано 18 генов, ответственных за синтез цитохромов, для большинства из которых описаны различные варианты генетического полиморфизма (Баранов В.С., 2000). Один из наиболее известных представителей семейства цитохромов P-450 - цитохром 1A1, кодируемый геном CYP1A1. Ген CYP1A1 локализован на хромосоме 15 (15q22-24). Он метаболизирует обширный спектр углеводородов, в том числе известный канцероген бензпирен. CYP1A1 экспрессируется, главным образом, в легких, то есть является ферментом, непосредственно взаимодействующим с экзогенными веществами и активирующим легочные проканцерогены. Описан однонуклеотидный полиморфизм 7-го экзона гена CYP1A1 (транзиция A-G), который приводит к замене аминокислоты изолейцина (Ile) на валин (Val) в 462 кодоне молекулы цитохрома P-450 (Ile462Val) (Hayashi S.I. et al., 1992; Оуама Т. et al., 1995). В результате такой замены продуцируется фермент, активность которого почти в два раза выше, чем в исходном белке, что ведет к увеличению концентрации промежуточных токсических метаболитов фазы 1 (Crofts F. et al., 1994).

В 1998 году К. Mace et al., было проведено специальное исследование экспрессии некоторых генов 1 и 2 фаз детоксикации ксенобиотиков, в результате чего было установлено, что кроме гена CYP1A1 в легочной ткани и бронхах экспрессируются следующие гены семейства цитохромов: CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C18, CYP2E1, CYP3A5, CYP1A2, CYP3A4 (Mace K. et al., 1998). По данным ряда авторов полиморфизм генов цитохромов ассоциирован с повышенным риском развития рака легких (Kawajiri K. et al., 1990; Nakachi K., et al., 1995; Kihara M. et al., 1995; Hong Y.S., et al., 1998; Le Marchand L. et al., 1998), колоректального рака (Sivaraman L., et al., 1994), рака молочной железы (Ambrosone C., et al., 1995; Taioli E., et al., 1995), неходжжкинской лимфомы (Soucek P., et al., 2002).

С целью поиска критериев предрасположенности к множественной миеломе целесообразно изучить полиморфные генетические

системы, прямо или косвенно задействованные в патогенезе заболевания – в особенности гены системы детоксикации ксенобиотиков, включая ген множественной лекарственной устойчивости и гены цитокинов. В молекулярно-генетическое исследование включено 129 больных, страдающих ММ, в возрасте от 31 до 76 лет (средний возраст $58,0 \pm 0$ лет). В качестве контроля обследовано 102 здоровых индивидуума, подобранных по полу и возрасту.

Материалом для молекулярно-генетического исследования служили образцы ДНК крови. ДНК выделяли из лимфоцитов периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew C.C., 1984). Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в 7%-ном полиакриламидном неденатурированном геле (7% ПААГ). После окончания электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия в течение 10 минут и анализировали при ультрафиолетовом освещении на трансиллюминаторе.

Точковая мутация в 7 экзоне гена CYP1A1 (транзиция A-G), является генным полиморфизмом (ПДРФ/HincII) и приводит к замене аминокислоты изолейцина (Ile) на валин (Val) в 462 кодоне молекулы цитохрома P-450 (Ile462Val) (Hayashi S. et al., 1992). В результате такой замены продуцируется фермент, активность которого почти в два раза выше, чем в исходном белке, что ведет к увеличению доли токсических метаболитов I фазы детоксикации. В соответствии с наличием или отсутствием сайтов рестрикции различают нормальные аллели (Ile) и мутантные, или полиморфные варианты (Val).

По нашим данным, при изучении полиморфизма гена CYP1A1 у больных ММ (рис.12) установлено, что на долю гомозигот по нормальному аллелю (генотип Ile/Ile) у больных приходилось 89,71%, тогда как в контроле частота данного варианта составляет 96,03%. Гетерозиготные носители мутации гена CYP1A1 с генотипом Ile/Val среди больных встречались в 10,29% случаев, что превышает аналогичный показатель в контроле, равный 3,97% более чем в 2,5 раза. Несмотря на то, что сравнительный анализ показал отсутствие статистически достоверных различий между группами ($\chi^2 = 1,92$; $p = 0,17$), тенденция к повышению мутантных форм у больных ММ заслуживает внимания.

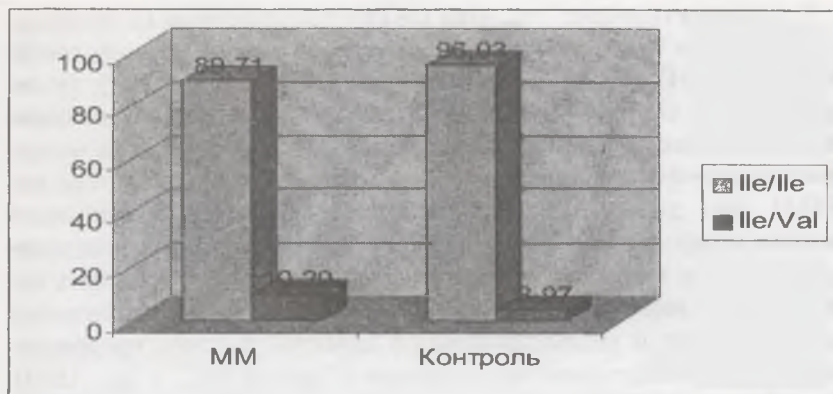


Рис.12.

Частота генотипов полиморфного локуса Ile 462Val гена CYP1A1 у больных множественной миеломой (MM).

Полиморфизм гена глутатион S-трансферазы M1 (GSTM1) у больных множественной миеломой

Главная функция ферментов фазы 2 заключается в детоксикации и нейтрализации гидрофильных и токсичных продуктов фазы 1 при помощи различных гидролаз и трансфераз. Функционирование всех ферментов фазы 2 сводится к метаболизму только тех веществ, которые уже имеют функциональные группы. В этой фазе принимают участие глутатионтрансферазы, глюкуронилтрансферазы, сульфонтрансферазы, эпоксидгидролазы, ацетилтрансферазы, метилтрансферазы и др. Большинство из этих ферментов находятся в гиалоплазме, часть из них локализована в мембранах эндоплазматического ретикулума и митохондрий. Наиболее широка и многообразна активность семейства глутатионтрансфераз, метаболизирующих тысячи канцерогенов и других ксенобиотиков. Основная реакция заключается в конъюгации промежуточных метаболитов с восстановленным глутатионом. К настоящему времени у млекопитающих известно 6 подклассов глутатион-S-трансфераз: alhpa, mu, kappa, tetha, pi и sigma, сходных по своим аминокислотным последовательностям (McLellan R. et al., 1997).

У человека подкласс *mu* (ген *GSTM1*) локализован на хромосоме 1 в области 1p13.3 и включает 5 tandemно расположенных генов: *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* и *GSTM5* (Zhong, 1992). Полиморфизм гена *GSTM1* обусловлен наличием протяженной делеции, которая возникла в результате неравного кроссинговера между двумя гомологичными последовательностями, фланкирующими ген *GSTM1*. При данной мутации синтез соответствующего белкового продукта не происходит (Seidegard J. et al., 1988). Наличие у индивидуума того или иного полиморфного варианта может определять как значительные индивидуальные различия в метаболизме экзогенных соединений, так и рассматриваться в качестве фактора предрасположенности к некоторым заболеваниям (Баранов В.С. и др., 1999). Нулевой аллель обнаружен с частотой около 50% в европейских популяциях, а также у китайцев и японцев (Chen C. et al., 1999). В популяции чернокожих американцев он встречается реже - приблизительно у 30% обследованных, а у коренных жителей Америки - в 20% случаев (Arruda V.R., 1998). Показано, что дефицит *GSTM1* встречается при наличии делеции в гомозиготном состоянии (нулевой генотип), что ассоциируется с повышенным риском развития ряда онкологических заболеваний, в том числе рака легких (d'Errico A. et al., 1996; Hong Y.S., et al., 1998), лейкоплакии (Nair U.J., et al., 1999).

Для оценки II фазы (фазы детоксикации и нейтрализации токсичных продуктов I фазы) мы изучали полиморфизм гена *GSTM1*, который отвечает за реакцию конъюгации промежуточных метаболитов с восстановленным глутатионом.

При изучении полиморфизма гена глутатион-S-трансферазы M1 (*GSTM1*) при MM нами получены следующие данные (табл. 6).

Таблица 6

Сравнение характера распределения частот генотипов полиморфного локуса гена *GSTM1* у больных множественной миеломой и в контрольной группе

Генотипы	Больные MM N=68		Контроль N=105	
	Абс.	%	Абс.	%
0/0	31	45,60	46	43,81
++	37	54,40	59	56,19
χ^2	0,01			

Частота гомозигот по делеции гена GSTM1 у больных множественной миеломой составила 45,60%, в контрольной группе – 43,81%. Статистический анализ показал отсутствие достоверных различий между группами ($\chi^2=0,01$; $p=1,00$). Следовательно, наличие делеции гена GSTM1 не влияет на предрасположенность к множественной миеломе. Полученные результаты согласуются с данными литературы. Так, Н. Ortega et al. (2000) показали, что частота гомозигот по делеции гена GSTM1 оказалась сходной как в группе больных множественной миеломой (34,5%), так и в контрольной группе (35,8%).

Отсутствие ассоциации делеции гена GSTM1 с предрасположенностью к множественной миеломе, на наш взгляд, можно объяснить тем, что окислительный стресс не играет изолированной ведущей роли при множественной миеломе.

Полиморфизм гена множественной лекарственной устойчивости (MDR1) у больных множественной миеломой.

В организме человека биохимические функции фазы 2 биотрансформации ксенобиотиков четко скоординированы с функциями других ферментов, в том числе и с фазой 3 – фазой выведения. Фаза 3 включает комплекс ферментов эвакуации ксенобиотиков. Выведение из организма продуктов детоксикации осуществляется через почки, легкие и кишечник. Механизмы выведения обеспечиваются Р-гликопротеидом, (Pgp), являющимся транспортной АТФазой.

Р-гликопротеин (гликопротеин с молекулярной массой 170кДа, gp170, Pgp) - белок-переносчик с широкой специфичностью. Исследования *in vitro* показали, что спектр субстратов Pgp включает не только противоопухолевые препараты, но и препараты, используемые для реверсии множественной лекарственной устойчивости, флуоресцентные красители, стероидные гормоны (Bradley G., Ling V., 1994; Cumber P.M. et al., 1991).

Активность Pgp определяет резистентность опухолевых клеток ко многим противоопухолевым лекарствам (антрациклиновым антибиотикам, алкалоидам растительного происхождения, в частности к винка-алкалоидам, подофиллотоксинам, таксанам и др.), а также ко многим другим веществам - флуоресцентным красителям, бромистому этидию, пуромицину, грамицидину D и др.

До сих пор не решен фундаментальный вопрос о биохимии Pgp: как один белок обеспечивает резистентность к широкому спектру разнообразных соединений. Возможная локализация сайта, связывающегося с лекарством, выявилась в результате анализа спонтанных мутаций в генах Pgp, которые были выделены из клеток линий китайского хомячка, резистентных к колхицину. Один из этих мутантов содержал валин на месте глицина в положении 185. Трансформанты, экспрессирующие эту мутацию, демонстрировали измененный профиль кросс-резистентности: увеличивалась резистентность к колхицину, адриамицину, снижалась к винбластину, винкристину и актиномицину Д. Из этих данных можно предположить, что Pgp имеет множественные сайты, связывающие лекарства, и это одно из возможных объяснений тому, как один белок транспортирует различные вещества.

P-гликопротеин - это очень консервативный белок. Он имеет гомологию с многочисленными бактериальными и эукариотическими транспортными белками. Показано, что семейство генов *pgp* принадлежит к суперсемейству генов, которые кодируют АТФ - связывающие мембранные транспортные системы в филогенетически далеких видах. Кроме *pgp* генов к ABC (ATF-Binding Cassete) принадлежит еще ряд генов млекопитающих: CFTR , TAP , MRP (Bradley G. and Ling V., 1994). Физиологическая роль Pgp еще не ясна, возможно, это защита от ксенобиотиков (например, локализация Pgp в эндотелии, выстилающем капилляры мозга, говорит о его вероятном вовлечении в гемато-энцефалический барьер). В других клетках Pgp, возможно, экспортирует эндогенные метаболиты. Существуют и другие гипотезы роли Pgp в нормальных клетках. Повышение экспрессии Pgp было обнаружено при биопсии в опухолях, взятых как до, так и после химиотерапии. Этот белок обнаружен во всех типах новообразований - саркомах, карциномах, лимфомах и других (Gottesmann M.M. et al., 1991; Juranka P.F. et al., 1989).

Наряду с детоксикацией и выведением ксенобиотиков P-gr играют существенную роль в формировании множественной лекарственной устойчивости при лечении злокачественных новообразований, в т.ч. гемобластозов.

Исследование устойчивости опухолевых клеток к цитостатическим лекарственным препаратам необходимо для понимания механизмов защиты клетки от повреждений. Изучение резистентности малигнизированных клеток к химиотерапии важно и для практической онкологии, поскольку с ней нередко связывают неудачи лечения злокачественных новообразований. Неэффективность терапии может быть обусловлена не только изменениями опухолевых клеток, но и целым рядом других причин, по которым препарат не доходит до клетки в адекватной и активной форме (особенности фармакокинетики лекарств).

Проблемы комбинированной химиотерапии опухолей и множественность мишеней для разных препаратов выдвигают на первый план множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) - весьма распространенный вид лекарственной резистентности клеток опухоли. В настоящее время это хорошо охарактеризованный феномен, для которого свойственна широкая перекрестная устойчивость (кросс-резистентность) клеток к различным веществам, несходным по химической структуре и механизму действия (Ling V., Endicott J.A., 1989; Simon S. and Schindler M., 1994).

При развитии МЛУ в клетках происходит три группы основных изменений:

1. Снижение накопления клетками цитотоксических веществ (Ling V. and Tompson L.H., 1974);

2. Изменение активности или экспрессии определенных клеточных белков, таких как Р-гликопротеин, МЛУ-ассоциированный протеин (MRP), глутатион-S-трансфераза (Simon S. and Schindler M., 1994), протеинкиназа С, ДНК топоизомераза II.

3. Изменения в клеточной физиологии, связанные с изменением структуры клеточной мембраны, цитозольного pH и характеристик внутриклеточного транспорта мембранных элементов (структура и функционирование лизосом) (Simon S. and Schindler M., 1994).

МЛУ представляет собой серьезное препятствие на пути успешного лечения злокачественных новообразований. Исследования последних лет показали, что молекулярные механизмы МЛУ множес-

твенны и лекарственная устойчивость клетки может определяться включением различных механизмов, характеризующих разные этапы осуществления токсического действия химиопрепарата на клетку - от ограничения накопления лекарства внутри клетки до отмены программы гибели клетки, индуцируемой веществом. Нередко в клетке включается несколько защитных механизмов, однако чаще всего преобладает какой-то один механизм. Наиболее изученными механизмами МЛУ являются активация трансмембранных транспортных белков, выводящих различные вещества из клетки (к ним принадлежит Р-гликопротеин); активация ферментов системы глутатиона, детоксицирующей препараты; изменения генов и белков, контролирующих апоптоз и выживаемость клетки (в первую очередь p53 и Bcl-2).

МЛУ была впервые обнаружена в опытах с культивируемыми клетками. Было показано, что воздействие на культуры клеток одного препарата может привести к возникновению популяции, резистентной одновременно ко многим другим веществам, с которыми клетки не встречались (перекрестная устойчивость).

МЛУ, разумеется, не обязательно возникает в результате воздействия лекарств на клетки. Она нередко связана с типом дифференцировки опухолевых клеток или с их локализацией в организме. Это так называемая “природная” МЛУ (устойчивость, исходно свойственная данным клеткам).

При природной МЛУ все клетки новообразования устойчивы к терапии. Приобретенная МЛУ может возникать в результате химиотерапии.

Множественность и разнообразие механизмов МЛУ значительно затрудняют как диагностику причин устойчивости больных к терапии, так и выработку разумных протоколов по преодолению МЛУ опухолевых клеток. Обсуждение каждого отдельного механизма МЛУ показывает, что чувствительность опухолевых клеток к терапии в большой степени зависит от “клеточного контекста” - от сочетания особенностей регуляции жизненно важных процессов клетки, связанных с ее видовой, тканевой принадлежностью, а также с теми генетическими изменениями, которые произошли в клетке в ходе ее малигнизации и прогрессии новообразования. Этот феномен также осложняет диагностику причин МЛУ опухолей.

Перечень изменений, приводящих к МЛУ, свидетельствует о том, что клетки млекопитающих обладают возможностью прерывать путь реализации повреждения на любом этапе, и показывает, что механизмы резистентности популяций опухолевых клеток к токсическим воздействиям разнообразны.

Современная химиотерапия обычно использует комбинацию лекарственных средств, принадлежащих к разным классам и действующих на разные клеточные мишени. Очевидно, что весьма разные лекарства повреждают в клетке разнообразные мишени.

Аргументом в пользу снижения накопления лекарства в клетке может быть результатом как ограничения поступления в клетку лекарственных препаратов, так и увеличения выведения их из клетки. Поскольку подавляющее большинство химиотерапевтических препаратов проникает в клетку путем простой диффузии через плазматическую мембрану, поступление вещества в клетку может измениться в том случае, если меняется структура клеточной мембраны. Действительно, электронно-микроскопические исследования и анализ липидов мембран клеток с МЛУ выявили отличия некоторых резистентных клеток от чувствительных (Simon S.M. and Schindler M., 1994).

Обнаруженные модификации могли, как изменять прохождение некоторых препаратов через мембрану, так и оказывать влияние на передачу сигналов, определяющих апоптоз. Однако сведений относительно данного механизма - изменений поступления лекарств в клетку, немного, и на первый план уже давно выступил другой механизм - выброс (откачка) токсических веществ из резистентных клеток. Выброс веществ из клеток связан с функционированием транспортных белков, к которым принадлежат Р-гликопротеин (Pgp), транспортеры семейства MRP, а также некоторые другие белки.

Pgp человека кодируется геном MDR1, принадлежащим к семейству MDR, локализованным в хромосоме 7 (7q21.1). Семейство MDR включает два гена человека (MDR1 и MDR2). С помощью метода трансфекции показано, что лишь один ген человека (MDR1) имеет отношение к МЛУ. Мутации в некоторых сайтах гена MDR1 могут приводить к изменению профиля перекрестной устойчивости клеток, т.е. к изменениям в связывании определенных субстратов. Введение в клетки гена MDR2 к лекарственной устойчивости не приводило (Gros P. and Buschman E., 1993).

К МЛУ может приводить как изменение экспрессии гена MDR1, так и увеличение дозы гена - амплификация участка генома, содержащего ген MDR1 и еще пять или шесть сцепленных с ним генов (Borst P., 1991). Амплификация обнаруживается обычно в культивируемых клеточных линиях с высокими уровнями Pgp-МЛУ, а не в материале, получаемом от больных. К МЛУ могут приводить также стабилизация мРНК MDR1, регуляция на уровне синтеза и процессинга белка (Bosh I. and Croop J., 1996).

Высказывались предположения и относительно возможности непосредственной регуляции активности Pgp его субстратами (Bosh I. and Croop J., 1996).

Ген MDR1 состоит из 28 экзонов, соответствующих четырем упорядоченным доменам белкового продукта. Это два трансмембранных домена и два АТФ-связывающих домена. До сих пор полная физиологическая роль Р-гликопротеида остается недостаточно изученной. В гене MDR1 обнаружен ряд полиморфизмов, некоторые из них оказывают влияние на экспрессию. S. Hoffmeyer et al. (2000) идентифицировали полиморфизм в 26 экзоне гена MDR1 (C3435T), который в гомозиготном состоянии приводит к резкому снижению экспрессии и функциональной активности Р-гликопротеида и как следствие к увеличению уровня субстрата (лекарственного вещества) в плазме. Частота данного полиморфизма существенно различается в различных этнических группах. M. Tanabe et al. (2001) в результате полного анализа гена MDR1 обнаружили девять однонуклеотидных замен: три из них (G2677A, G2677T, T-129C) снижают уровень экспрессии гена. Изучение и характеристика полиморфизмов и мутаций в гене MDR1 и их влияния на экспрессию гена является мощным инструментом для совершенствования терапии различных заболеваний лекарственными препаратами (Ling V., 1997; Mickley L.A. et al., 1998; Cascorbi I. et al., 2001; Ameyaw M.M. et al., 2001; Tanabe M. et al., 2001).

В нашем исследовании выявлено, что у больных ММ нормальный вариант (генотип CC) встречался в 9,09% случаев, гетерозиготные носители мутации (генотип CT) выявлялись с частотой 46,97%, на долю гомозиготных носителей мутации (генотип TT) приходилось 43,94%. Близкое к описанному распределение частот генотипов полиморфизма C3435T гена MDR1 наблюдалось и в контроле, где гомози-

готы по нормальным аллелям встречались с частотой 6,11%, на долю гетерозиготных носителей мутации приходилось 46,56%, гомозиготы по мутации выявлялись в 47,33% случаев. При сравнении группы больных с контролем с использованием критерия χ^2 существенных различий не обнаружено ($\chi^2=0,65$; $p>0,05$) (рис.13).

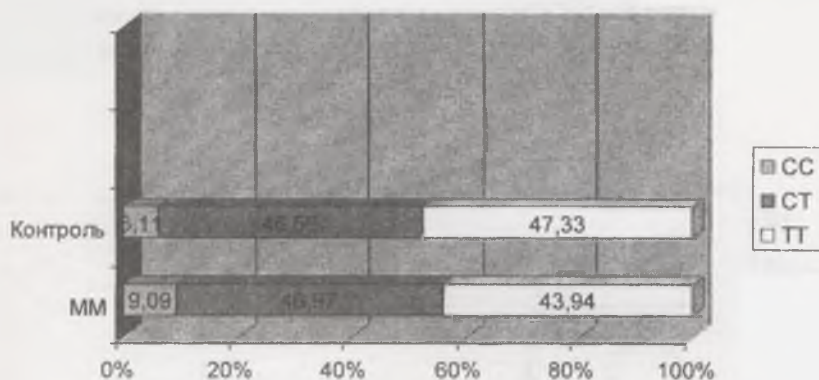


Рис. 13.

Частота генотипов полиморфного локуса С3435Т гена MDR1 у больных множественной миеломой

С целью оценки влияния роли полиморфизма С3435Т гена множественной лекарственной устойчивости MDR1 на течение множественной миеломы, проведено сравнение выживаемости по Kaplan-Meier пациентов с различными генотипами по этому полиморфизму.

Наилучшие показатели выживаемости были характерны для гетерозигот СТ: 25% больных погибли в течение 34,2 месяцев, медиана выживаемости равна 48 месяцам, а 75% больных погибли в течение 66,8 месяцев.

Значительно худшие показатели у гомозигот ТТ: 25% больных погибли в течение года, 50% в течение 28,4 месяцев. Анализ достоверности различий между группами с генотипами ТС и ТТ по Cox $p=0,11$; Gexan $p=0,01$; Cox-Mantel $p=0,04$.

Медиана выживаемости больных с генотипом СС ($n=6$) составила 38 мес. Сравнительные кривые выживаемости приведены на рис.14.

Анализ кривых свидетельствует о том, что гомозиготы ТТ по полиморфизму С3435Т гена MDR1, характеризующиеся снижением Р-гликопротеина в клетке и, соответственно, повышением в клетке различных веществ, в том числе и цитостатиков, погибали раньше и быстрее, чем гетерозиготы. Это может быть связано и с увеличением токсического эффекта цитостатиков. Можно также предположить, что токсическое воздействие препаратов оказывает на выживаемость пациентов не меньшую роль, нежели резистентность к терапии.

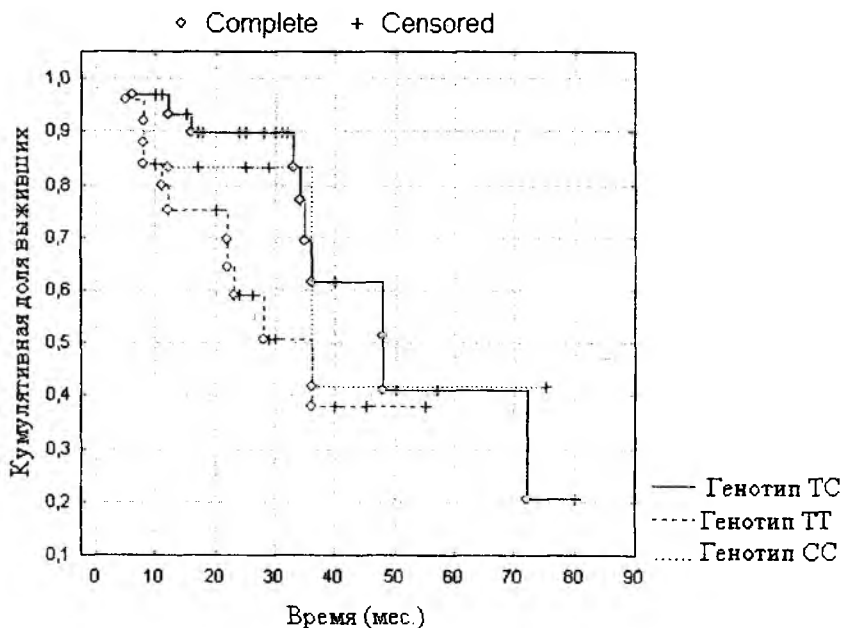


Рис.14.

Кумулятивная выживаемость больных множественной миеломой в зависимости от генотипа по полиморфизму С3435Т гена MDR1.

Тенденция к возрастанию частоты встречаемости больных с нормальными вариантами гена MDR1 может быть обусловлена повышен-

ной резистентностью к лечению в случае повышенной экспрессии Р-гликопротеида, что ассоциируется с нормальными полиморфными вариантами гена MDR1. Это предположение находит подтверждение и в данных литературы, согласно которым резистентность к терапии цитостатическими препаратами больных гемобластозами и множественной миеломой, в частности, может быть обусловлена повышенной экспрессией гена MDR1 (Cumber P.M., et al., 1991). Помимо этого, в литературе имеются указания на то, что больные с пониженной экспрессией гена MDR1 имели лучший прогноз и более высокие показатели выживаемости. При хроническом миелолейкозе обнаружена тенденция к повышенной экспрессии MDR у больных в период бластного криза по сравнению с хронической фазой (Hegewisch-Becker S. and Hossfeld D.K., 1996). При В-клеточном ХЛЛ было показано, что MDR ген экспрессируется практически во все В-ХЛЛ бластных клетках, не зависимо от стадии заболевания, однако активность Р-гликопротеиновой помпы усиливается в процессе лечения цитостатическими препаратами (Hegewisch-Becker S. and Hossfeld D.K., 1996). В ряде работ данные об ассоциации тяжести течения гемобластозов и резистентностью к терапии противоречивы. Так, в исследовании S. Gurbuxani et al. (1998) показано отсутствие корреляции между MDR и ответом на проводимую терапию.

Анализ сочетаний генотипов по генам детоксикации ксенобиотиков у больных множественной миеломой

Поскольку выявление генетических маркеров при мультифакторальной патологии предполагает анализ одновременно большого числа генов, вовлеченных в определенный этап патогенеза, представлялось целесообразным провести изучение характера распределения сочетаний генотипов по вышеописанным генам системы детоксикации ксенобиотиков у больных ММ.

В табл. 7 представлены комбинации генотипов по трем полиморфным генам детоксикации ксенобиотиков, выявленные у больных множественной миеломой.

Таблица 7

Комбинации генотипов по генам детоксикации ксенобиотиков CYP1A1, GSTM1 и MDR1, выявленные у больных множественной миеломой

Комбинации генотипов CYP1A1/ GSTM1/ MDR1	Частота (абс / %)				χ^2	OR (CI ₉₅)
	Больные множественной миеломой N=66		Контрольная группа N=102			
	абс	%	абс	%		
Иле-Иле/(+)/CC	5	7,58	1	0,98	3,33	8,28 (1,90- 195,1)
Иле-Иле/(+)/CT	16	24,24	26	25,49	0,001	0,94 (0,43-2,03)
Иле-Иле/(+)/TT	11	16,67	26	25,49	1,34	0,59 (0,25-1,37)
Иле-Иле/(0)/CC	0	0,00	4	3,92	1,23	0,01 (0,61-1,00)
Иле-Иле/(0)/CT	13	19,70	24	23,53	0,13	0,80 (0,35-1,81)
Иле-Иле/(0)/TT	14	21,21	17	16,67	0,29	1,35 (0,57-3,17)
Иле-Val/(+)/CC	1	1,52	0	0,00	0,90	-
Иле-Val/(+)/CT	1	1,52	2	1,96	0,00	0,77 (0,03-11,13)
Иле-Val/(+)/TT	2	3,03	0	0,00	3,24	-
Иле-Val/(0)/CC	0	0,00	0	0,00	-	-
Иле-Val/(0)/CT	1	1,52	0	0,00	0,90	-
Иле-Val/(0)/TT	2	3,03	2	1,96	0,00	1,56 (0,15-15,98)

Из 12 возможных сочетаний генотипов у больных ММ встречалось 10 вариантов, в контроле – 8. Три варианта, а именно, сочетания генотипов CYP1A1(Ile-Val)/GSTM1(+)/MDR1(CC), CYP1A1(Ile-

Val)/GSTM1(+)/MDR1(TT) и CYP1A1(Ile-Val)/GSTM1(0)/MDR1(CT) встречались только у больных ММ. Как видно, при ММ чаще, чем в контроле, встречалась комбинация, включающая нормальные варианты по всем изученным полиморфным системам, т.е. вариант Ile-Ile/(+)/CC, на долю которого приходилось 7,58% у больных ММ и 0,98% в контроле ($\chi^2=3,3$; $p>0,05$). Соответственно, возрастает и показатель OR, который составил 8,28. Одной из причин наблюдаемого накопления у больных ММ комбинаций с нормальными вариантами по всем генам может быть быстрая детоксикация и выведение из организма не только ксенобиотиков, но и лекарственных препаратов, что и приводит к низкой эффективности терапии заболеваний и манифестации ММ.

Рассмотрим сочетания генотипов по генам GSTM1 и MDR1, которые относятся ко 2-ой и 3-ей фазам детоксикации ксенобиотиков и функционируют в тесной взаимосвязи (табл.8).

Таблица 8

Комбинации генотипов GSTM1/ MDR1	Частота (абс / %)				χ^2	OR (CI ₉₅)
	Больные множественной миеломой N=66		Контрольная группа N=102			
	абс	%	абс	%		
(+)/CC	6	9,10	1	0,87	4,73	10,1 (1,16-231,8)
(+)/CT	17	25,76	31	26,96	0,23	0,80 (0,37-1,68)
(+)/TT	13	19,70	32	27,83	2,22	0,54 (0,24-1,19)
(0)/CC	0	0,00	4	3,48	1,23	1,01 (0,68-2,36)
(0)/CT	14	21,21	25	21,74	0,10	0,83 (0,37-1,85)
(0)/TT	16	24,24	22	19,13	0,05	1,16 (0,52-2,58)

Установлено, что у больных ММ существенно чаще (9,10%), чем в контроле (0,87%), встречается вариант GSTM1(+)/MDR1(CC), включающий нормальные аллели по обеим полиморфным системам. Сравнительный анализ выявил наличие достоверных различий ($\chi^2=4,73$; $p<0,05$). Показатель OR для этой комбинации генотипов составил 10,1, указывая на его высокую прогностическую значимость.

2.2. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Для выбора адекватной терапевтической тактики клиницистам крайне важно возможно, более раннее получить информацию о предполагаемой степени активности течения заболевания. Одним из критериев тяжести и маркером неблагоприятного прогноза множественной миеломы является повышение уровня цитокинов в сыворотке крови больных.

Пролиферация, дифференцировка и функция лимфо- и гемопоэтических клеток регулируется с помощью сложной сети лимфо- и гемопоэтических ростовых факторов и молекул поверхности клеток, которые определяют взаимодействие между клетками стромы и лимфо- и гемопоэтическими предшественниками в костном мозге (Kuninaka S. et al., 2000). Эти ростовые факторы связываются со специфическими рецепторами, расположенными на поверхности клетки и относятся к различным семействам, к которым можно отнести тирозинкиназы рецепторов и рецепторы цитокинов гемопоэза.

Патогенез ММ зависит от присутствия некоторых из этих ростовых факторов (цитокинов), которые поддерживают выживание, пролиферацию и дифференцировку клеток ММ в костном мозге на протяжении различных стадий заболевания (Марри Р. И и соавт., 1993).

Цитокины – группа гормоноподобных белков и пептидов, которые синтезируются и секретируются клетками иммунной системы и другими типами клеток. В целом, цитокины принимают участие в регуляции роста, дифференцировки и продолжительности жизни клеток, а также в управлении процессом программированной клеточной гибели (Кольман Л., 2000; Kuninaka S. et al., 2000). Особенно важна их роль как медиаторов воспаления, которым принадлежит клю-

чевая роль в положительной и отрицательной регуляции иммунного ответа, а также в его интеграции с физиологическими функциями других органов и систем, в частности, эндокринной и гемопозитической (Klein B. et al., 1995).

В культурах миеломных клеток *in vitro* продуцируются многие цитокины, в частности, гранулоцито-макрофагальный колонийстимулирующий фактор, интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-1b, интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-11 (IL-11), фактор некроза опухолей- α (ФНО- α) и онкостатин М (Filella X. et al., 1996, 1998).

Множественной миеломе присущи активация и ингибция цитокин-продуцирующего пула клеток периферической крови. Уровень цитокинов, секретируемых плазматическими клетками, во многом определяет клиническую картину течения ММ, а степень активности патологического процесса, прежде всего, определяется биологией опухолевых клеток и, в частности, их морфологией и способностью к пролиферации и дифференцировке (Klein B. et al., 1995; Nachbaur D. et al., 1991). Известно также, что у больных злокачественными лимфомами в период манифестации заболевания отмечается повышенный уровень ФНО- α в сыворотке крови (Salles G. et al., 1996). По мере нарастания активности течения заболевания увеличивается процент больных с очень высокой и очень низкой концентрацией сывороточного ФНО- α (Стельмашенко Л.В., 1997).

Несмотря на то, что все эти цитокины могут стимулировать спонтанную пролиферацию миеломных клеток (Lauta V. M., 2001), только моноклональные антитела на IL-6 способны почти полностью ингибировать пролиферацию миеломных клеток *in vitro* (Brieva J. A. et al., 1990; Reittie J. E., et al., 1996; Chauhan B. D. et al., 1997). Этот факт является очевидным указанием на то, что IL-6 является главным ростовым фактором миеломных клеток *in vitro* (Lauta V. M., 2001).

IL-6 поддерживает выживание и распространение миеломных клеток не только стимуляцией клеточного деления, но и путем предотвращения программированной клеточной гибели (апоптоза) (Ishioka S. et al., 1999; Reittie J. E., et al., 1996; Chauhan B. D. et al., 1997; Kerr J. F. R. et al., 1993). В ряде работ показано, что IL-6 может продуцироваться либо аутокринным путем (Kawano M. et al., 1988), либо паракринной секрецией клетками микросреды опухоли в костном мозге (Klein

B. et al., 1989; 1995). Вероятно, что IL-6 секретируется в больших количествах стромальными клетками костного мозга, остеобластами (Brieva J.A. et al., 1990; Reittie J.E. et al., 1996).

IL-6, источником которого при ММ предположительно являются опухолевые клетки, макрофаги или стромальные клетки, имеет прогностическое значение, так как его концентрация зависит лишь от уровня продукции, но не от задержки на фоне недостаточности почек, как это свойственно другому прогностическому маркеру – β 2-микроглобулину (Thavasu P.W. et al., 1995). Уровень сывороточного IL-6 был повышен только в фазе прогрессии заболевания и достигал максимальных величин у больных с агрессивной формой (Зарайский М.И., 1998; Watson J.M. et al., 1990; Plante M. et al., 1994; Berek J.S. et al., 1991).

В 1998 г. появилась публикация (Fishman D. et al., 1998), сообщающая о выявленном полиморфном сайте (-174G $\rightarrow$ C) в регуляторном участке гена IL-6 (промоторная область), в котором два аллеля G и C определяют различный конститутивный и индуцибельный уровень экспрессии гена. Был установлен возрастающий эффект “дозы гена” в ряду генотипов C/C, G/C, G/G, выражающийся, соответственно в повышении активности его транскрипции. На молекулярном уровне данное явление объясняет факт расположения данного полиморфного сайта в участке между -225 и -164, который демонстрирует негативный регуляторный эффект на транскрипцию гена IL-6 (Ray A. et al., 1990). Исследования по репрессии промотора IL6 продемонстрировали связывание глюкокортикоидного рецептора в участке вблизи сайта -201. Полиморфизм G/C в сайте -174 располагается достаточно близко, чтобы потенциально повлиять на связывание глюкокортикоидного рецептора. Интересно также то, что замена G на C в позиции -174 создает потенциальный сайт связывания для фактора транскрипции NF- κ B. В опытах на культурах клеток показано репрессорное влияние NF- κ B на экспрессию гена (Liu Y. et al., 1997).

Ассоциации функционального полиморфизма в промоторной области (-174G $\rightarrow$ C) гена IL6 выявлены при некоторых мультифакториальных заболеваниях: системный хронический артрит с ранней манифестацией (Fishman D. et al., 1998), остеопороз (Ota N. et al., 2001), проявление саркомы Капоши у ВИЧ-инфицированных (Foster C.B. et al., 2000), болезнь Альцгеймера (Bagli M. et al., 2000), системная

красная волчанка (Linker-Israeli M. et al., 1999), аневризма брюшной аорты (Jones K.G. et al., 2001).

Для поиска генетических маркеров множественной миеломы нами были изучены ассоциации полиморфных вариантов генов медиаторов воспаления (цитокинов). С этой целью у больных множественной миеломой и в контрольной группе проведен сравнительный анализ полиморфизма генов интерлейкина-6 (IL-6), факторов некроза опухолей (ФНО) α и β .

Приступая к исследованиям, мы предположили, что генетические варианты генов IL-6, ФНО- α и ФНО- β , а также их комбинации, могут быть ассоциированы либо с предрасположенностью к развитию множественной миеломы, либо с различными по степени тяжести вариантами клинического течения заболевания.

Полиморфизм локуса -174G→C промоторной области гена IL-6 у больных множественной миеломой

Результаты изучения полиморфизма -174G→C промоторной области гена интерлейкина-6 (IL-6) представлены в табл. 9.

Таблица 9

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса -174G→C промоторной области гена IL-6 у больных множественной миеломой и в контрольной группе

Генотипы (аллели)	Больные ММ, N=68		Контроль N=102	
	Абс.	%	Абс.	%
GG	24	35,29	37	36,3
GC	33	48,51	53	52,0
CC	11	16,20	12	11,7
Аллель G	81	59,60	127	62,3
Аллель C	55	40,40	77	37,7
χ^2	0,14			

Как видно из таблицы, частота генотипа CC в общей группе больных множественной миеломой составила 16,2% и на долю аллеля C приходилось 40,4%. Более низкие значения аналогичных показателей оказались характерны для контрольной группы, где частота генотипа CC составила 11,7% и аллеля C - 37,7%. Однако применение критерия χ^2 при сравнении общей группы больных множественной

миеломой и контрольной группы существенных отличий не выявило ($\chi^2=0,35$; $p=0,55$). Наши данные согласуются с результатами других авторов, которые также не выявили существенных различий характера распределения частот генотипов локуса -174G→C промоторной области гена IL-6 между больными множественной миеломой и контрольной группой (Zheng Ch.Y. et al., 2000; Dring A. et al., 2001).

С целью выявления ассоциаций данного полиморфизма с длительностью жизни пациентов проведено исследование кумулятивной выживаемости пациентов с множественной миеломой по Kaplan, Meier (1958) в зависимости от генотипа по полиморфизму -174G→C гена IL-6.

Установлено, что у пациентов с генотипом CC медиана времени выживания составила 58 месяцев, 25% больных погибли в течение 34 месяцев, а 75% погибли за 96 месяцев. Статистически значимо более низкими показателями общей выживаемости характеризовались пациенты с генотипом GG: медиана времени выживания составила 23,7 месяца, 25% больных погибли в течение года, 75% - 34,2 месяца (рис. 15).

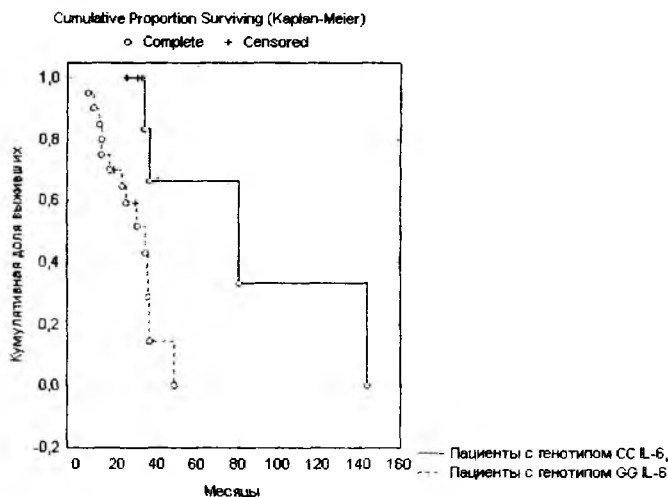


Рис.15

Сравнительная выживаемость больных с генотипом CC и GG гена IL-6 при множественной миеломе

Промежуточное положение по выживаемости занимали пациенты с генотипом GC: 25% больных погибли за 22,2 месяца, медиана времени выживания оставила 36,7 месяцев и 75% пациентов погибли в течение 54,3 месяцев (рис.16).

При проведении сравнительного анализа выживаемости оказалось, что наилучшей выживаемостью характеризовались пациенты с генотипом CC, затем GC и наихудшей- GG, но статистически значимой разница была лишь в группах с генотипом CC и GG (рис.26; $p < 0,05$).

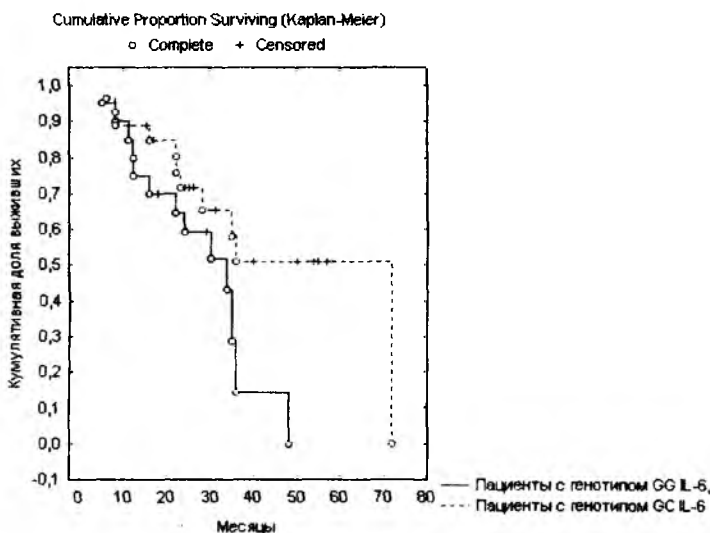


Рис.16.

Сравнительная выживаемость больных с генотипом GC и GG гена IL – 6.

Таким образом, в результате молекулярно-генетического исследования больных множественной миеломой выявлена ассоциация генотипа CC полиморфизма -174G→C промоторного участка гена IL-6 гена с более высокими показателями выживаемости. По-видимому, низкий конститутивный и индуцибельный уровень транскрипции гена IL-6 и, соответственно, снижение содержания сывороточ-

ного IL-6 у индивидов с генотипом CC может иметь протективное действие в период клинической манифестации этого заболевания

Генотип CC гена IL-6 (мутация в полиморфизме –174G→C) предполагает низкий уровень экспрессии гена и снижение выработки IL-6, что ведет к уменьшению стимуляции роста ММ и его повреждающего провоспалительного действия на висцеральные органы, а это, в свою очередь, также сочетается с доброкачественным течением заболевания.

По видимому, низкий конститутивный и индуцибельный уровень транскрипции гена IL-6 у индивидов с генотипом CC может иметь протективное действие в период клинической манифестации множественной миеломы. Учитывая противоречивость литературных данных по ассоциации локуса –174G→C гена IL-6 с тяжестью течения множественной миеломы на других выборках, полученные нами результаты, вероятно, отражают этноспецифичность изученной полиморфной системы. Основываясь на полученных результатах, можно предположить, что генотипирование полиморфного локуса –174G→C гена IL-6 на ранней стадии развития множественной миеломы у больных позволило бы выделить группу, генетически предрасположенную к доброкачественному течению заболевания.

Полиморфизм локуса -380G→A гена фактора некроза опухолей α (TNF α)

В последние годы доказано, что фактор некроза опухолей α (TNF α) и фактор некроза опухолей β (TNF β или лимфотоксин α , LT α) играют существенную роль при развитии и функционировании нормальной лимфоидной ткани. Эти цитокины продуцируются на самых ранних стадиях воспалительного процесса и инициируют запуск каскада цитокинов, в котором наиболее важными являются интерлейкин-1, интерлейкин-6, а также сам TNF α . TNF (α и β) может стимулировать рост определенных лимфоидных клеток при трансформации (например, миеломных клеток). TNF α индуцирует синтез интерлейкина-6 и является потенциальным фактором резорбции кости при множественной миеломе (Bertolini D.R. et al., 1986), а также играет важную роль при развитии остеолитических процессов, наблюдаемых у пациентов множественной миеломы (Bataille R., 1997).

Имеются данные, указывающие на то, что интенсивность синтеза TNF также может быть запрограммирована на генетическом уровне. Гены TNF α и TNF β расположены в пределах главного комплекса гистосовместимости III класса на хромосоме 6 в области бp21.3. Это высокополиморфный участок генома. В гене TNF α описано, по меньшей мере, 8 полиморфных сайтов (Messer G. et al., 1991; Wilson A.G. et al., 1997; Bidwell J. et al., 1999). На линиях В-клеток человека было показано, что генетический полиморфизм, локализованный в положении -308 промоторного участка гена TNF α , характеризующийся заменой гуанина на аденин (-308G→A), ассоциирован с повышенной экспрессией гена *in vitro*: присутствие аллеля G определяет часто встречающийся вариант TNF α *1, а присутствие аллеля A - более редкий вариант TNF α *2 (Wilson A.G. et al., 1997; Allen R.D. et al., 1999; Kroeger K.M. et al., 2000). Наличие последовательности длиной в 10 пн, гомологичной консенсусу связывающего сайта белка-активатора-2 (AP-2), характеризует TNF α *1 аллель. AP-2 белок репрессирует активность промотора TNF α , из чего, в свою очередь, следует, что -308G→A полиморфизм может влиять на экспрессию гена TNF α . В ряде работ продемонстрирована роль описанного выше полиморфного варианта TNF α (TNF α *1/2) в определении риска развития множественной миеломы (Davies F.E. et al., 2000). В работе K. Neben et al. (2002) обнаружена корреляция между генотипами, определяющими высокий уровень экспрессии гена TNF α (промоторные полиморфизмы -308 и -238) и повышением концентрации TNF α в сыворотке крови у больных множественной миеломой.

Носители определенных аллелей генов TNF α и TNF β часто страдают некоторыми хроническими воспалительными заболеваниями, что, возможно, обусловлено наследственными особенностями продукции цитокинов. В работах ряда авторов отмечено повышение концентрации TNF α в сыворотке крови больных, страдающих онкологическими заболеваниями (Gadducci A. et al., 1995; Partanen R. et al., 1995). В некоторых случаях зарегистрирована ассоциация повышенного уровня TNF с более тяжелым течением лимфомы (Salles G. et al., 1996). В экспериментальных исследованиях L. Trentin et al. (1993) показано, что TNF могут стимулировать рост злокачественных В-клеток при хронических лимфопролиферативных заболеваниях. TNF

могут играть роль генов-кандидатов множественной миеломы, поскольку известно, что при сочетании определенных аллелей в генах TNF α и TNF β происходит повышение продукции TNF (Huang S.L. et al., 1997; Foos T.M. et al., 2002), что является фактором риска злокачественного перерождения клеток крови.

В табл. 11 представлены наши результаты молекулярно-генетического изучения полиморфизма –308G→А в промоторной области гена TNF α .

Таблица 11

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса - 308G→ATNF α у больных множественной миеломой и в контрольной группе

Обследованные группы	Объем выборки	Частота генотипов, абс. чис. (%)			Частота аллелей, абс. чис. (%)	
		1/1	1/2	2/2	1	2
Больные ММ	68	48 (70,59)	19 (27,91)	1 (1,50)	115 (84,6)	21 (15,4)
Контроль	151	11 (74,17)	36 (23,84)	3 (1,99)	260 (86,09)	42 (13,91)
χ^2		0,15	0,23	0,08	0,13	

Согласно полученным результатам, в группе больных множественной миеломой частота генотипа 2/2, определяющего повышенный уровень экспрессии гена, составила 1,50%, частота аллеля 2 – 15,4%, что не имеет достоверных отличий по сравнению с контрольной группой, где на долю генотипа 2/2 и аллеля 2 приходится 1,99 и 13,91%, соответственно.

Полиморфизм локуса +252A→G гена TNF β

Полиморфизм интрона 1 гена TNF β (лимфотоксин α , LT α) обусловлен заменой аденина на гуанин в 252 положении нуклеотида (+252A→G). Наличие аллеля А соответствует наиболее частому варианту полиморфизма, аллелю 10.5, тогда как мутантный аллель G

обозначается как аллель 5.5. В работах G. Messer et al. (1991) была выявлена ассоциация мутантного аллеля 5.5 с повышением уровня экспрессии лимфотоксина и TNF.

Важно отметить, что согласно литературным данным, полиморфные аллели локусов -308G→A гена TNF α и +252A→G гена LT α обычно находятся в тесном сцеплении. Более того, имеются сведения об ассоциации определенных комбинаций полиморфных вариантов генов TNF α и LT α с гемобластозами, в частности, с неходжскинской лимфомой (Chouchane L. et al., 1997; Warzocha K. et al., 1998) и хроническим лимфолейкозом (Demeter J. et al., 1997).

Изучению полиморфизма генов IL-6 и TNF посвящены исследования Ch. Zheng et.al. (2000). Есть сообщение о выявленной ассоциации тяжести течения неходжскинской лимфомы с комбинацией функциональных полиморфизмов -308G/A для TNF α и +252-NcoI для TNF β (Warzocha K. et al., 1998). Были обнаружены ассоциации TNF α и TNF β с рядом других нозологий (Wilson A. et al., 1993, Hamann A. et al., 1995). Однако нельзя не признать, что данные литературы, касающиеся изучению генетических ассоциаций при множественной миеломе, на сегодняшний день крайне малочисленны.

Результаты молекулярно-генетического анализа полиморфизма гена TNF β лимфотоксина α (LT α) у больных множественной миеломой из Республики Башкортостан продемонстрированы в таблице 12.

Таблица 12

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса +252A→G гена TNF β у больных множественной миеломой и в контрольной группе

Генотипы (аллели)	Больные ММ N=67		Контроль N=97	
	Абс.	%	Абс.	%
10.5/10.5	35	52,24	53	54,64
10.5/5.5	27	40,30	40	41,24
5.5/5.5	5	7,46	4	4,12
Аллель 10.5	97	72,39	146	75,26
Аллель 5.5	37	27,61	48	24,74
χ^2	0,21			

Как видно из полученных данных, только один генотип, а именно генотип 5.5/5.5., характеризующийся наличием мутации гена TNF β в гомозиготном состоянии, у больных множественной миеломой встречался с более высокой частотой по сравнению с контролем (7,46 и 4,12%, соответственно). Тем не менее, сравнительный анализ не выявил существенных различий между группами по данному маркеру ($\chi^2 = 0,33$; $p > 0,05$).

Характер распределения частот аллелей по локусу +252A→G TNF β обнаружил тенденцию к возрастанию доли мутантного аллеля 5.5 в когорте больных до 27,61% против 24,74% в контроле. Однако статистический анализ не выявил существенных различий между группами ($\chi^2 = 0,21$; $p > 0,05$).

Анализ комбинаций генотипов по локусам TNF α и TNF β у больных множественной миеломой

Важно отметить, что согласно литературным данным, полиморфные аллели локусов – 308G→A гена ФНО- α и +252A→G гена ФНО- β обычно находятся в тесном сцеплении. Более того, имеются сведения об ассоциации определенных комбинаций полиморфных вариантов генов ФНО- α и ФНО- β с гемобластозами, в частности, с неходжинской лимфомой (Chouchane L. et al., 1997; Warzocha K. et al., 1998) и хроническим лимфолейкозом (Demeter J. et al., 1997).

Для проведения данного раздела работы, в анализ были включены только те индивиды, у которых были типированы полиморфизмы по локусам TNF α и TNF β . Данные по распределению комбинаций генотипов приведены в табл. 13.

Таблица 13

Комбинации генотипов по локусам TNF α и TNF β у больных множественной миеломой и в контрольной группе

Комбинации генотипов - 308/+252	Частота (%)		χ^2	OR
	Больные MM N=67	Контроль N=56		
GG/AA (low risk)	46,27	58,93	2,73	0,6

GG/AG (high risk)	29,85	12,50	8,0; p<0,05	2,98
GG/GG (high risk)	2,99	0	1,34	-
GA/AA (high risk)	0	0	-	-
GA/AG (high risk)	16,42	23,21	1,05	0,65
GA/GG (high risk)	2,99	3,57	0,01	0,83
AA/AA (high risk)	0	0	-	-
AA/AG (high risk)	0	0	-	-
AA/GG (high risk)	1,49	1,79	0,01	0,83

Из представленных в таблице данных видно, что из 9 возможных комбинаций генотипов у всех обследованных индивидов встречались 6 вариантов. Вариант GG/GG, для которого характерно наличие мутации по гену TNF β в гомозиготном состоянии и нормальные аллели по гену TNF α , был выявлен только у больных множественной миеломой с частотой 2,99%. Хотя различия между группами оказались не достоверными (что можно объяснить низкой численностью данных генотипов), данный вариант можно считать маркером повышенного риска развития множественной миеломы. Существенные различия между больными и контролем установлены по комбинации GG/AG, характеризующейся наличием мутации в гене TNF β в гетерозиготном состоянии и нормальными аллелями по гену TNF α . Так, у больных множественной миеломой на долю данного варианта приходилось 29,85%, что оказалось в 2,4 раза выше, чем в группе здоровых индивидов, где данный вариант был выявлен у 12,5% индивидов ($\chi^2=8,0$; $p<0,05$). Исходя из полученных данных, можно сделать заключение о возможности использования в качестве марке-

ров повышенного риска развития множественной миеломы комбинаций генотипов с нормальными аллельными вариантами по локусу -308TNF α в сочетании с мутацией по локусу +252 TNF β в гомо- или гетерозиготном положении.

Ранее было указано, что локусы -308TNF α и +252 TNF β располагаются в непосредственной близости и находятся в тесном сцеплении. В этой связи представлялось целесообразным проанализировать характер сцепления между аллелями в обследуемых выборках. В табл. 14 приведены частоты сцепленных и несцепленных аллелей у больных множественной миеломой и в контрольной группе.

Таблица 14

Характеристика сцепления полиморфных аллелей локусов -308TNF α и +252 TNF β у больных множественной миеломой и в контрольной группе

Сцепление аллелей -308/+252	Частота, абс. чис. (%)		χ^2
	Больные ММ, N=67	Контроль N=56	
Имеется	41 (61,19)	47 (83,93)	6,67;
Отсутствует	26 (38,81)	9 (16,07)	p<0,05

В контрольной группе на долю сцепленных аллелей по локусам -308TNF α и +252 TNF β приходилось 83,93% аллелей и 16,07% аллелей оказалось несцепленными, когда нормальное аллельное состояние одного локуса сочеталось с мутацией другого локуса. Согласно данным литературы, в популяции Британии соотношение сцепленных и несцепленных аллелей в контрольной группе (N=202) по указанным полиморфным системам составляло 75,8%:24,2% (Howell W. et al., 2002). При этом разница между контрольными группами оказалась не достоверной ($\chi^2=1,65$; $p>0,05$).

У больных множественной миеломой наблюдалось резкое смещение в распределении сцепленных и несцепленных аллелей в сторону существенного преобладания (по сравнению с контролем) последних. Так, на долю сцепленных аллелей у больных множественной миеломой, приходилось 61,19% и 38,81% аллелей были не сцепленными. Статистический анализ выявил существенные различия с контролем ($\chi^2=6,67$; $p<0,05$) и показал, что несцепленные аллели по локусам

-308TNF α и +252 TNF β среди больных множественной миеломой встречались в 2,4 раза чаще, чем в контроле.

Таким образом, при анализе комбинаций генотипов и степени сцепления аллелей по локусам -308TNF α и +252 TNF β мы выявили маркерные комбинации, ассоциированные с повышенной вероятностью развития множественной миеломы и показали, что среди больных множественной миеломой существенно возрастает по сравнению с контролем доля лиц, имеющих несцепленные аллели.

Таким образом, в результате молекулярно-генетического исследования больных множественной миеломой с учетом клинического течения заболевания, выявлена ассоциация генотипа СС полиморфизма -174G $\rightarrow$ C промоторного участка гена IL-6 гена с доброкачественным течением множественной миеломы. По видимому, низкий конститутивный и индуцибельный уровень транскрипции гена IL-6 у индивидов с генотипом СС может иметь протективное действие в период клинической манифестации множественной миеломы. Учитывая противоречивость данных литературы по ассоциации локуса -174G $\rightarrow$ C гена IL-6 с тяжестью течения множественной миеломы на других выборках, полученные нами результаты, вероятно, отражают этноспецифичность изученной полиморфной системы. Основываясь на полученных результатах, можно предположить, что генотипирование полиморфного локуса -174G $\rightarrow$ C гена IL-6 на ранней стадии развития множественной миеломы у больных позволило бы выделить группу, генетически предрасположенную к доброкачественному течению заболевания.

В последние годы доказано, что фактор некроза опухолей α (TNF α) и фактор некроза опухолей β (TNF β) играют существенную роль при развитии и функционировании нормальной лимфоидной ткани.

Анализируя полученные нами данные по частоте аллелей локуса +252A $\rightarrow$ TNF β , можно говорить лишь о небольшой тенденции к возрастанию частоты аллеля 5.5 при агрессивном течении множественной миеломы. Между тем, существенные различия между подгруппами с разным течением множественной миеломы отсутствовали ($\chi^2=0,01$; $p>0,05$).

При анализе комбинаций генотипов и степени сцепления аллелей по локусам -308TNF α и +252TNF β мы выявили маркерные комбинации, ассоциированные с повышенной вероятностью развития множественной миеломы и показали, что среди больных множественной миеломой существенно возрастает по сравнению с контролем доля лиц, имеющих несцепленные аллели.

Глава 3

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – одно из распространенных опухолевых заболеваний кроветворной системы. В-клеточный хронический лимфолейкоз составляет около 7 % среди всех лимфатических опухолей в мире и более 90% всех случаев хронического лимфолейкоза в Европе и США (Воробьев А.И., 2003). Redaelli A. et al. (2005) указывают, что ХЛЛ составляет 22-30% всех гемобластозов и встречается с частотой 1-5,5 на 100 тысяч населения. Распространенность заболевания во всем мире неуклонно растет, что связано как с увеличением в структуре населения доли лиц пожилого возраста, так и с абсолютным ростом заболеваемости.

Анализ 7264 случаев онкозаболеваний за 1974-1993 годы в Сардинии (Brossia G, et al., 2004) показал, что за последние 20 лет произошло удвоение случаев рака, особенно явно это прослеживается при лимфопролиферативных заболеваниях - ХЛЛ и множественной миеломе.

Показатели заболеваемости ХЛЛ заметно отличаются по регионам мира. Лидируют Австралия, США, Ирландия и Италия (Redaelli et al., 2005). Также высока распространенность ХЛЛ в Европе и США, в то время как в Азии и Африке заболевание встречается редко. По данным Shvidel L et al., 1998), ХЛЛ составляет 30% всех лейкозов в Европе. Результаты исследования Shvidel L. et al., 1998) демонстрируют высокую частоту ХЛЛ в Израиле: ежегодная заболеваемость составила 4,3 на 100 000 населения. Подтверждаются проведенные ранее исследования о более высокой распространенности заболевания среди евреев Ashkenazi по сравнению с Sephardic Jews. В то же время, относительный риск болезни среди Ashkenazi по сравнению с Sephardic Jews за последние годы значительно снизился - с 6.0 (1975-1979 годы) до 2.4 (1990-1996 годы). Высокая частота ХЛЛ была обнаружена среди выходцев из СССР – 26 новых случаев и 11 ранее известных среди 60 000 новых иммигрантов за 8 лет (Shvidel L. et al., 1998),

Известно, что эта нозология крайне редко встречается в Японии, Китае, у представителей тюркских народностей (Finch S., 1969; Воробьев А.И., 2003). В Пакистане ХЛЛ составляет 13,91% среди всех гемобластозов (Idris M. et al., 2004).

R. A. Cartwright et al. (2002) показали, что важным фактором в развитии гематологических заболеваний является половая принадлежность. ХЛЛ чаще болеют белые по сравнению с чернокожими. Отмечено преобладание мужчин: соотношение составило 1,82:1 в Турции (Pamuk ON et al., 2004) и 2:1 в Европе (Petrucci M. et al., 1998).

Большинство исследователей подчеркивают, что заболеванию подвержены преимущественно лица пожилого возраста: преобладающее количество больных находится в возрасте 64-70 лет (Redaelli A. et al., 2004). Анализ 120 случаев ХЛЛ в Тунисе за 1988-1998 годы установил: медиана возраста заболевших ХЛЛ составляет 66 лет, а 75% больных – мужчины (Khalifa M, et al., 2002). В центральной Африке возраст больных колебался от 32 до 78 лет; 26,7% больных были в возрасте 60-64 года; 21,3% - моложе 50 лет, средний возраст - $56,88 \pm 10,1$ лет (Mukiibi JM et al., 2004).

Большое значение для развития заболевания имеет наследственность: лица, родственники которых страдают ХЛЛ, имеют повышенный риск болезни (Redaelli A. et al., 2004). Риск болезни у родственников первой линии составляет 3,6%, в сравнении с риском для населения в целом - 2,1% (Goldin LR et al., 2005). При наличии в родословной случая заболевания у лиц старше 65 лет риск возрастает от 14 до 18% (без таковой - 3,5%) (Caporaso N, Marti GE, Goldin L., 2004). По данным шведского канцер-регистра, риск ХЛЛ и неходжкинских лимфом у братьев и сестер составляет 3,2 (ДИ 1,3-7,6), а у детей – 1,6 (ДИ -1,1-2,3) (Chang ET. et al., 2005). Разная степень зависимости от наследственности различных форм лимфом в Швеции показана в работе Altieri A, Bermejo JL, Hemminki K. (2005), в штате Юта США - Kerber RA, O'Brien E. (2005). Для ХЛЛ характерен феномен «ожидания», то есть в каждом следующем поколении заболевание начинается в более раннем возрасте и протекает агрессивнее (Catovsky D., 1997).

Ранее были описаны определенные закономерности возникновения гемобластозов, риски развития лейкозов (Осечинский И.В., 1982, 1989). В последние годы также продолжается изучение факторов клинической и эпидемиологической предрасположенности к ХЛЛ (Redaelli A. et al., 2004). В Канаде проведено изучение влияния профессии, связанной с работой с животными, на риск развития миеломы. Оказалось, что индивидуумы, работающие с крупным рогатым скотом, имеют повышенный риск развития лейкемии, лимфом и ММ, а те, кто связаны с обработкой рыбы – уменьшенный риск этих заболеваний (L. Fritschi et al., 2002). В качестве факторов риска ХЛЛ у жителей Канзаса и Небраски были выявлены такие производственные факторы, как работа в сельском хозяйстве, лесоводстве, автомобилестроении, телефонной связи, сварочных работах, производстве оборудования для металлообработки. Риск был непосредственно связан со стажем работы (Zeng T. et al., 2002). Существует и противоположное мнение: Redaelli A. et al. (2004) не найдено конкретного фактора окружающей среды, способствовавшего развитию ХЛЛ.

На ассоциацию ХЛЛ и высокого индекса массы тела сообщили Ross JA, Parker E, Blair CK, Cerhan JR, Folsom AR. (2004). В то же время, по данным Fernberg P et al. (2006), курение, увеличение индекса массы тела не являются факторами риска ХЛЛ. Askling J. et al. (2005) считают, что применение глюкокортикостероидов не влияет на риск возникновения лимфопролиферативных заболеваний.

Одним из факторов риска развития ХЛЛ является ионизирующая радиация (Zablotska LB. et al., 2004; Boice JD Jr. et al., 2006). L. Massoudi Barbara et al. (1997) установили связь между работой в химической промышленности и смертью, вызванной ХЛЛ среди лиц старше 65 лет. Как показали исследования, проведенные в Испании, Чехии, Франции, Германии и Ирландии, одним из факторов, увеличивающих риск возникновения ХЛЛ, является использование краски для волос: OR = 1.2, 95% CI 0.9-1.7 (de Sanjose S, Benavente Y, Nieters A. et al. 2006). При применении краски более, чем 12 раз в год, степень риска еще более возростала (Benavente Y. et al. , 2005). О возможном влиянии сексуальных отношений на риск ХЛЛ сообщают Cartwright RA, Gurney KA, Moorman AV. (2002).

Исследования последних лет показали связь с наличием аутоиммунного заболевания в анамнезе и риском возникновения ХЛЛ. О. Landgren et al. (2006) проанализировали 7 тысяч наблюдений в Швеции и Дании. Оказалось, что повышенный риск возникновения заболевания связан с наличием системных заболеваний соединительной ткани и не зависит от витаминВ12 дефицитной анемии. У 18% больных с аутоиммунными гемолитическими анемиями в последующем через 9-76 (в среднем 26,5) месяцев развились лимфопролиферативные заболевания (S. Sallah, J. Y. Wan and L. R. Hanrahan, 2001).

Установлено также, что из всех гемобластозов именно для ХЛЛ характерен наиболее высокий риск возникновения вторых опухолей, частота которых достигает 51,4 %. Это приводит к значительному снижению медианы выживаемости (Данилова Н.В. и соавт., 2000). В США пятилетняя выживаемость для лиц моложе 65 лет составляет 83%, а старше 65 лет – 68% (Redaelli A. et al., 2005). Существенное влияние на показатели выживаемости оказывает возраст больных: по данным турецких ученых, пятилетняя выживаемость больных ХЛЛ моложе 55 лет была выше, чем пациентов более старшего возраста, однако десятилетняя выживаемость была практически одинаковой. При этом сам ХЛЛ был причиной смерти чаще у молодых (Pamuk GE et al., 2002). Медиана выживаемости составила 48 недель. Пятилетняя выживаемость, по данным этого автора, достигала 36,5%, а десятилетняя – 8%. Показатели выживаемости молодых больных из Турции были ниже, чем пациентов с Запада (Pamuk ON et al., 2004). Факторами прогноза оказались стадия по Rei и Binet, а также абсолютное значение лимфоцитов выше $100 \times 10^9/\text{л}$ (Khalifa M, et al., 2002). Наиболее значимыми прогностическим факторами оказались стадия по Rei (по сравнению с Binet), пожилой возраст и количество лимфоцитов (Pamuk ON et al., 2004). Более худшие показатели выживаемости были характерны для больных с CD38-позитивными лимфоцитами (Cocco AE et al., 2005).

Изучение эпидемиологических характеристик ХЛЛ в Республике Башкортостан проведено в 1971 (Тугузбаева Г.Ф., 1971) и 1995 годах (Царева Е.Г., 1999).

Исследования, проведенные в 1995 году, выявили заболеваемость хроническим лимфолейкозом на уровне 2,06 на 100 000 тысяч насе-

ления (Царева Е.Г., 1999). Заболеваемость среди мужчин была выше, чем женщин, а городских жителей выше, чем сельских (Никуличева В.И. и соавт., 1996).

Таким образом, изучение эпидемиологических показателей при ХЛЛ проводились в различное время многими учеными. Сведения о факторах риска заболевания носят противоречивый характер. Необходимо продолжать подобные исследования, так как знание и прогнозирование уровней заболеваемости, распространенности, смертности позволит оптимизировать медицинскую и социальную помощь больным с ХЛЛ.

Заболеваемость, распространенность, выживаемость и смертность при хроническом лимфолейкозе в Республике Башкортостан за 2001-2005 годы

При изучении заболеваемости ХЛЛ в Республике Башкортостан за 2001-2005 годы обнаружена тенденция к росту показателя с 1,98 в 2001 году до 3,1 в 2005 году. Наибольший показатель заболеваемости наблюдался в 2004 году и составил 3,35 на 100 000 человек взрослого населения (зарегистрировано всего 104 новых случая заболевания). Средний показатель заболеваемости ХЛЛ за изучаемые годы в Республике Башкортостан составил $2,56 \pm 0,29$ на 100 000 населения (табл. 15).

Таблица 15

Абсолютное число впервые зарегистрированных случаев и показатель заболеваемости хроническим лимфолейкозом по Республике Башкортостан на 100 000 взрослого населения за 2001-2005 годы

Годы	Абсолютное число больных	Заболеваемость	Средний показатель за 5 лет
2001	61	1,98	$2,56 \pm 0,29$
2002	74	2,42	
2003	60	1,95	
2004	104	3,35	
2005	97	3,1	

По данным Царевой Е.Г. (1999), заболеваемость ХЛЛ за 1995-1999 годы составила $1,89 \pm 0,02$. Таким образом, выявлен статистически значимый рост показателя за 2001 – 2005 годы по сравнению с 1995-1999 годами ($p < 0,05$). Для изучения динамики заболеваемости ХЛЛ проведен регрессионный анализ (рис.17).

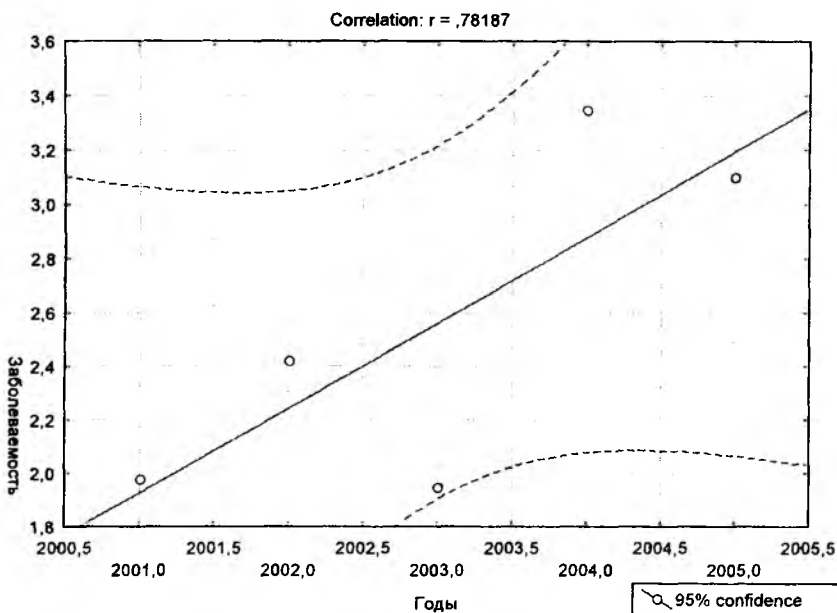


Рис.17.

Регрессионный анализ заболеваемости хроническим лимфолейкозом в Республике Башкортостан за 2001-2005 годы

Регрессионный анализ подтвердил рост заболеваемости (коэффициент корреляции $r=0,78$; $p < 0,05$). Таким образом, можно прогнозировать дальнейший рост заболеваемости ХЛЛ в Республике Башкортостан.

Известно, что лимфопролиферативным заболеваниям подвержены лица пожилого возраста. По данным нашего исследования, заболеваемость за 2001-2005 годы колебалась от 0,48 (20-24 года) на

100 000 населения этого возраста до 17, 07 (80-84 года). Заболеваемость достигла значения 25,87 для возраста 80-84 года в 2005 году. Изучение графика заболеваемости по возрастам (рис. 18) показывает, что с увеличением возраста заболеваемость неуклонно растет, достигая максимума в возрасте 80-84 года.

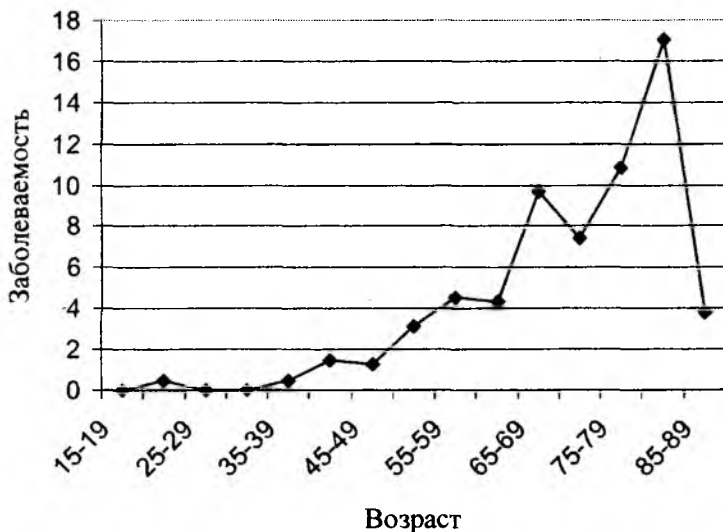


Рис. 18.

Заболеваемость хроническим лимфолейкозом
в Республике Башкортостан за 2001-2005 годы по возрастам

При анализе заболеваемости по половой принадлежности установлено, что показатель достиг среди мужчин наибольшего уровня в 2004г. и составил 3,90 (всего выявлено 55 больных-мужчин). Наименьший показатель – 2,32 – зарегистрирован в 2001г., когда было выявлено 32 вновь заболевших мужчин. Среди женщин наибольший показатель зафиксирован также в 2004г.– 2,9 (49 случаев), а наименьший отмечен в 2003г. – 1,61 (27 вновь зарегистрированные заболевшие женщины). В целом уровень заболеваемости среди мужчин был статистически значимо выше ($3,08 \pm 0,33$), чем среди женщин ($2,14 \pm 0,26$; $p < 0,05$) (рис. 19).

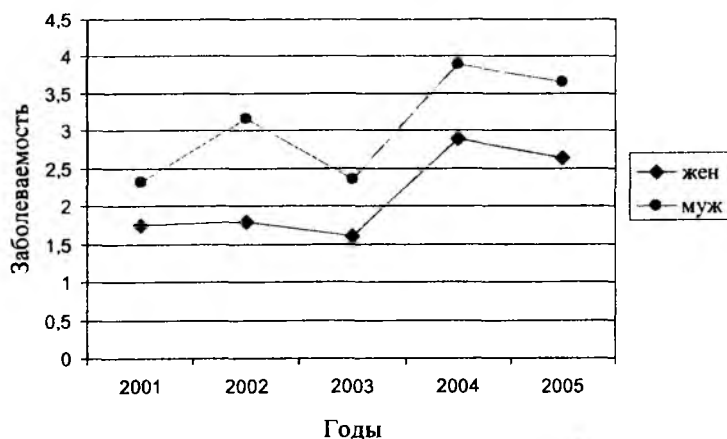


Рис. 19.

Динамика заболеваемости хроническим лимфолейкозом мужчин и женщин на 100 000 лиц соответствующего пола по Республике Башкортостан за 2001-2005 годы

При сравнении заболеваемости городских и сельских жителей оказалось, что заболеваемость горожан статистически значимо выше, чем сельских жителей (соответственно $2,87 \pm 0,36$ и $2,05 \pm 0,19$; $p < 0,05$; рис.20).

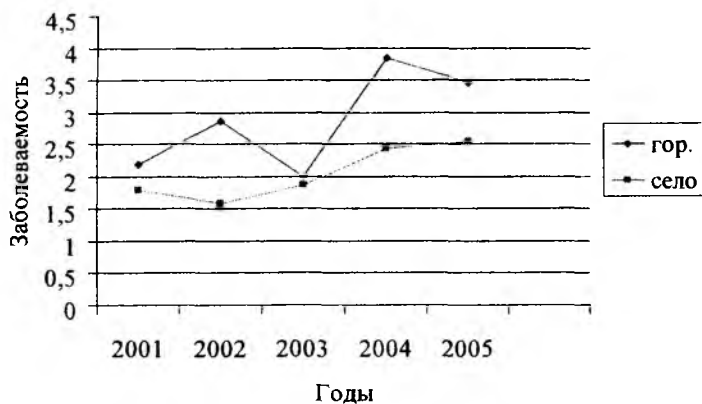


Рис.20.

Заболеваемость хроническим лимфолейкозом жителей города и села Республики Башкортостан за 2001-2005 годы

Наибольшие значения заболеваемости среди горожан зарегистрированы в 2004 году (78 вновь заболевших, показатель 3,84), а среди селян в 2005 году (31 вновь заболевший, показатель 2,55) (табл.16).

Таблица 16

Абсолютное число зарегистрированных случаев и показатель заболеваемости хроническим лимфолейкозом среди городских и сельских жителей республики Башкортостан за 2001-2005 годы

Годы	Абсолютное число больных		Заболеваемость	
	Город	Село	Город	Село
2001	45	19	2,18	1,79
2002	57	17	2,86	1,59
2003	40	20	1,99	1,87
2004	78	26	3,84	2,43
2005	66	31	3,46	2,55

Одним из важнейших показателей, используемых в медицинской статистике, является показатель распространенности. Распространенность ХЛЛ в Республике Башкортостан возросла в 2,7 раз – с 3,06 в 2001 году до 8,22 в 2005 году (табл.17).

Таблица 17

Распространенность хронического лимфолейкоза
в Республике Башкортостан за 2001-2005 годы

Годы	Распространенность	Среднее значение распространенности
2001	3,06	5,24±0,94
2002	3,83	
2003	4,55	
2004	6,55	
2005	8,22	

Для подтверждения гипотезы о росте распространенности проведен регрессионный анализ (рис.21). Проведенный анализ подтвердил статистически значимый рост показателя распространенности ХЛЛ в Республике Башкортостан за 2001-2005 годы (коэффициент корреляции $r=0,98$; $p=0,004$).

Рост распространенности связан как с ростом заболеваемости, так и увеличением продолжительности жизни этого контингента больных: среднее значение распространенности ($5,24 \pm 0,94$) практически в 1,5 раза (статистически значимо) превышает показатель заболеваемости ($2,56 \pm 0,29$; $p < 0,05$).

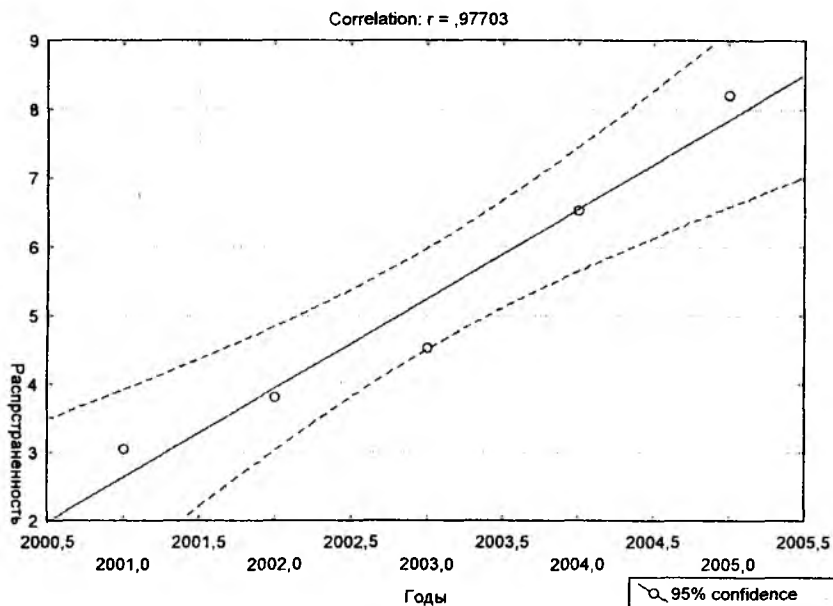


Рис. 21.

Регрессионный анализ распространенности хронического лимфолейкоза в Республике Башкортостан за 2001-2005 годы.

Распространенность заболевания среди мужчин больше ($5,95 \pm 1,05$), чем среди женщин ($4,65 \pm 0,86$), но различия статистически не значимы.

Среди мужчин наибольшее значение распространенности выявлено в 2005 году – 9,22 (всего зарегистрирован 131 больной - мужчина), наименьшее в 2001г. – 3,69 (выявлен 51 заболевший мужчина).

Среди женщин наибольший показатель составил 7,39 (126 больных-женщин) в 2005 году, а наименьший в 2001г. – 2,54 (зарегистрированы 42 женщины), рис.22.

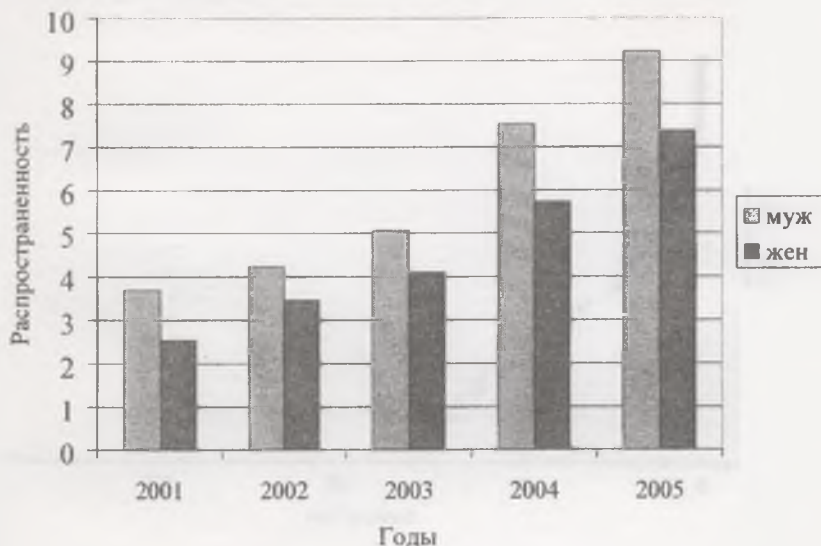


Рис.22.

Распространенность хронического лимфолейкоза среди мужчин и женщин в Республике Башкортостан

Анализ выживаемости больных хроническим лимфолейкозом

Анализ выживаемости за 2001-2005 годы показал, что медиана выживаемости составила 34 мес., однако 25% больных проживали лишь 6 мес. График суммарной выживаемости представлен на рис.23.

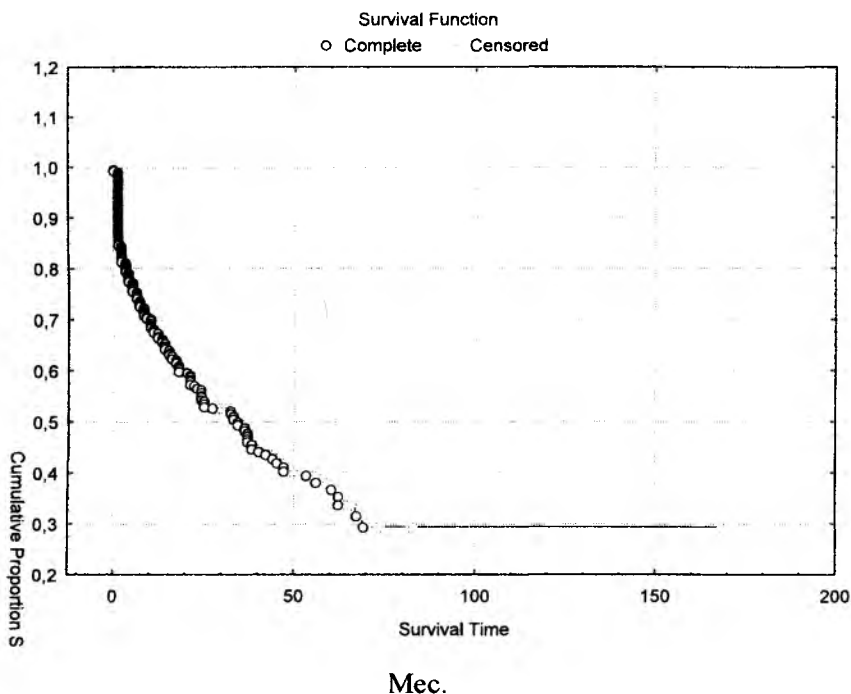


Рис.23.

График выживаемости больных хроническим лимфолейкозом за 2001-2005 годы

Учитывая различные уровни заболеваемости мужчин и женщин, представляло значительный интерес сравнить их показатели выживаемости. График выживаемости представлен на рис. 24.

Анализ графика показывает, что в течение первого года жизни после установления диагноза выживаемость в зависимости от пола пациента практически не отличается. Однако медиана уже значительно отличается: 50% мужчин проживает 25 мес., а 50% женщин - 40 мес. Таким образом, показатели выживаемости женщин оказались статистически значимо лучше, чем мужчин (p по Coх-Mantel = 0,037).

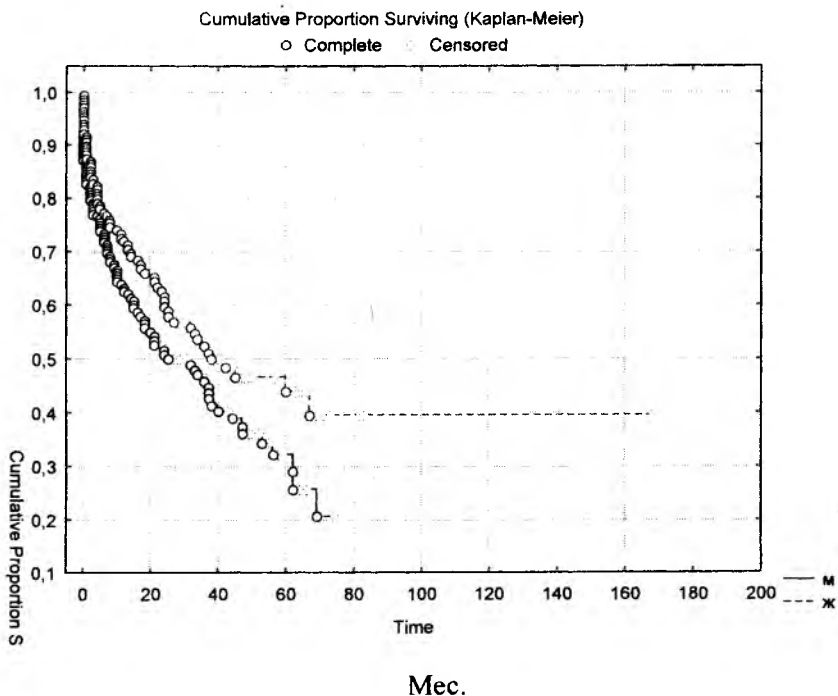


Рис. 24.

Сравнительный график выживаемости мужчин и женщин с хроническим лимфолейкозом

Смертность от хронического лимфолейкоза взрослого населения Республики Башкортостан за 2001 – 2005 годы

Смертность за исследуемый промежуток времени колебалась от 0,89 в 2001 году до 1,60 в 2002 году (табл. 18). Смертность среди мужчин была выше, чем среди женщин: среди мужчин наибольшего значения показатель достиг 2,59 (2002), за 2001-2005 годы – $1,68 \pm 0,28$; а среди женщин - 1,18 (2004), за 2001-2005 годы – $0,96 \pm 0,07$. Для городских жителей смертность достигла максимума в 2002 году – 1,86, для сельских – 1,15 в 2005 году.

Таблица 18

Абсолютное число умерших больных от хронического лимфолейкоза и показатель смертности в Республике Башкортостан за 2001 – 2005 годы

Годы	Хронический лимфолейкоз	
	Абсолютное число	Показатель смертности
2001	27	0,89
2002	49	1,60
2003	34	1,10
2004	45	1,45
2005	43	1,38

В целом, безусловно, необходимо отметить увеличение этого показателя (рис. 25). Среднее значение за 5 лет составляет $1,29 \pm 0,128$ на 100 000 населения.

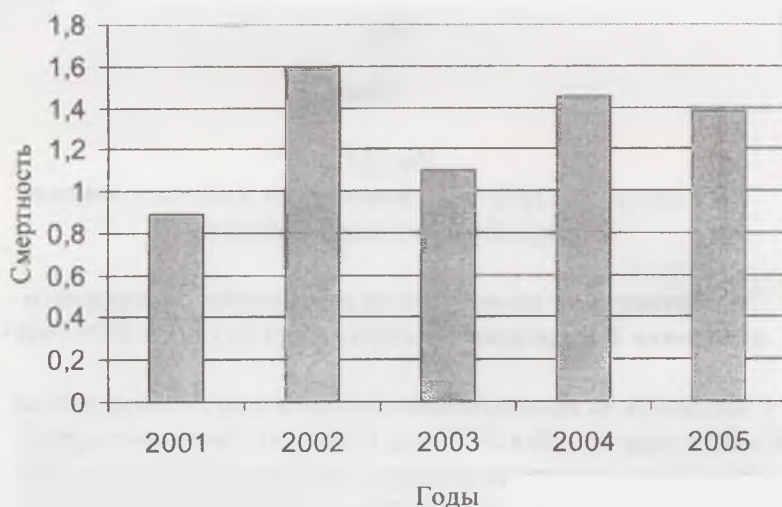


Рис. 25.
Смертность больных хроническим лимфолейкозом
в Республике Башкортостан за 2001-2005 годы

Таким образом, изучение заболеваемости хроническим лимфолейкозом и его распространенности в Республике Башкортостан за 2001-2005 годы показало, что показатели имеют четкую тенденцию к росту. Средний показатель заболеваемости ХЛЛ за изучаемые годы в Республике Башкортостан составил $2,56 \pm 0,29$ на 100 000 населения. Заболеваемость жителей города статистически значимо выше, чем жителей села. ХЛЛ более подвержены лица старше 50 лет, максимум заболеваемости характерен для возраста 80-84 года. Заболеваемость мужчин статистически значимо превышает показатель женщин. Распространенность заболевания за 2001-2005 годы составляет $5,24 \pm 0,94$ на 100 000 взрослого населения. Имеется четкая тенденция роста как показателя заболеваемости, так и распространенности. Медиана выживаемости больных ХЛЛ за 2001-2005 годы составляет 34 мес. Выживаемость мужчин статистически значимо хуже, чем женщин. Смертность при ХЛЛ за 2001-2005 годы составляет $1,3 \pm 0,13$ на 100 000 населения. Все вышесказанное необходимо учитывать при организации помощи этому контингенту больных.

Глава 4

4.1. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ ГЕНОВ ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

В последнее время расширяются исследования, связанные с поиском и характеристикой полиморфных вариантов ДНК в кодирующих и не кодирующих районах генов, в той или иной степени вовлеченных в канцерогенез и оказывающих модифицирующее влияние на течение патологического процесса (Е. В. Домрачева и др., 2002; Y. Tsujimoto et al., 1985; Абдулкадыров К.М. и др., 2002; Сингер М., Берг П.; 1998). В таком качестве могут выступать гены детоксикации, ответственные за метаболизм и инактивацию ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов (Gahrton G. et al., 1982). К ним относятся гены, кодирующие белки фазы 1 и 2 детоксикации: (изоформы цитохрома р-450 Cyp1A1, Cyp2E1, глутатион S-трансферазы, эпоксидгидролаза, N-ацетилтрансфераза и др.). Изучение ассоциации вариантов указанных генов с различными лимфопролиферативными заболеваниями позволит выявить комбинации генотипов, ассоциированные с развитием той или иной патологии, в частности, хронического лимфолейкоза.

К одной из наиболее важных групп генов детоксикации относят суперсемейство глутатион S-трансфераз (GST). Суперсемейство ферментов GST катализирует конъюгацию экзогенных (ксенобиотиков) и эндогенных веществ с помощью глутатиона и играет существенную роль в инактивации, а иногда и в активации многих лекарств и чужеродных веществ. Кроме того, GST могут участвовать в клеточной дифференциации и опухолевой трансформации [L. Wang, M.J. Groves, M.D. Hepburn et al.; 2000].

Локус GSTM1 представлен тремя аллельными вариантами: GSTM1*A, GSTM1*B и GSTM1*0. Аллели GSTM1*A и GSTM1*B функционально идентичны и отличаются заменой K172N. «Нулевая» аллель (GSTM1*0) обусловлена делецией, которая возникла в результате неравного кроссинговера между двумя гомологичными последовательностями, фланкирующими ген GSTM1 (Zhong S., Wolf C.R., Spurr

N.K., 1992). При данной мутации синтез соответствующего белкового продукта не происходит.

К настоящему времени накоплено достаточное количество сведений об ассоциации GSTM1*0/0 генотипа с риском развития ряда заболеваний, преимущественно онкологических. Считается, что мутация гена GSTM1 может быть фактором риска развития некоторых видов злокачественных опухолей вследствие возникающей повышенной чувствительности к химическим канцерогенам (Van Poppel G. et al., 1993). J.Seidegard и соавт. (1986) обнаружили связь между нулевым генотипом гена GSTM1 и предрасположенностью к раку легкого. S. Zhong и соавт. (1992) выявили преобладание гомозиготных носителей делеции гена GSTM1 среди больных колоректальным раком (Zhong S. et al., 1992). Также показано, что при нулевом генотипе GSTM1 риск возникновения рака молочной железы повышен в 2,1 раза.

Все сказанное определяет необходимость разработки новых способов прогнозирования клинических вариантов течения хронического лимфолейкоза на самых ранних стадиях заболевания. Наличие у индивида того или иного полиморфного варианта по генам-кандидатам хронического лимфолейкоза, в частности, генам детоксикации ксенобиотиков и другим генам, можно рассматривать в качестве фактора прогнозирования клинических особенностей и предрасположенности к хроническому лимфолейкозу.

При изучении полиморфизма гена глутатион S-трансферазы M1(GSTM1) получены следующие данные (рис. 26).

Частота гомозигот по делеции гена GSTM1 у больных ХЛЛ составила 37,9%, в контрольной группе — 43,8 %. Статистический анализ показал отсутствие достоверных отличий между группами ($\chi^2=0,53$; $p>0,05$). В исследовании Yuille M, Condic A, Hudson C и др. получены данные, согласно которым частота нулевого генотипа генов GSTM1 и GSTT1 была достоверно выше у больных с В-ХЛЛ по сравнению с контрольной группой ($p=0,04$). Противоречие полученных нами результатов может быть связано с этноспецифичностью рассматриваемых выборов.

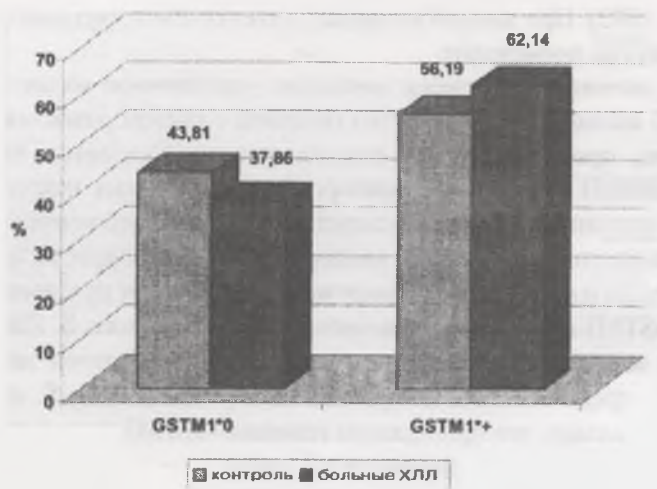


Рис. 26.

Сравнение частот генотипов полиморфного локуса гена GSTM1 у больных хроническим лимфолейкозом

Для выявления ассоциации полиморфизма гена GSTM1 с формой хронического лимфолейкоза было проведено изучение частоты гомозигот по делеции у больных с прогрессирующей и опухолевой формами заболевания. Полученные данные представлены в табл.19.

Таблица 19

Сравнение распределения частот генотипов делеционного полиморфного локуса гена больных хроническим лимфолейкозом с учетом клинической формы заболевания

Генотипы	Прогрессирующая форма (n=54)		Опухолевая форма (n=49)	
	абс.	%	абс.	%
GSTM1*0	18	33,33	21	42,86
GSTM1*+	36	66,67	28	57,14
χ^2 ; p	3,91; 0,04			

Как следует из представленных данных, на долю гомозигот по делеции приходилось 33,33% больных с прогрессирующей формой заболевания и 42,86% больных с опухолевой формой хронического лимфолейкоза. Учитывая статистически значимые различия ($p < 0,05$) между этими группами больных, повышение частоты делеции гена GSTM1 при опухолевой форме ХЛЛ указывает на прогностическую значимость данного показателя в отношении неблагоприятного течения заболевания.

4.2. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

Хотя в настоящее время этиология ХЛЛ до конца не выяснена, в ряде исследований показано, что на развитие заболевания значительное влияние могут оказывать наследственные дефекты лимфатической ткани (Воробьев А.И., 1985, 2002). Так же известно, что ХЛЛ сопровождается целым спектром цитогенетических нарушений (Azzoni L. et al., 1995).

Хронический лимфолейкоз является моделью преждевременной клеточной смерти или апоптоза. Было выявлено, что мутация тумор супрессивного гена p53 и повышенный уровень экспрессии p27 коррелирует с прогрессией заболевания и неблагоприятным прогнозом Gadducci M. A. et al., 1995; di Celle P.F. et al., 1994; Partanen R., Koskinen H., Hemminki K., 1995; Van Poppel G. et al., 1992). Ингибиторами апоптоза являются такие цитокины, как фактор некроза опухоли (ФНО), интерлейкин (ИЛ) ИЛ-8, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6. Являясь пара- и аутокринными факторами роста, эти цитокины оказывают влияние на пролиферацию опухолевых клеток и, следовательно, играют существенную роль в патогенезе ХЛЛ (Fluckiger A.C. et al., 1994; Foa R. et al., 1988; Chouchane L. et al., 1997; di Celle P.F. et al., 1994; Cordone I. et al., 1998).

Известно, что ФНО ингибирует все типы колониеобразующих единиц (КОЕ) в нормальном костном мозге, при этом 50% снижения числа колоний наблюдается при применении ФНО в дозе 6×10^4 ЕД/мл (Morse H.R. et al., 1999). Показано, что пролиферация ранних гемопоэтических предшественников в костном мозге ингибируется ФНО после его взаимодействия с рецептором ФНО типа II, а ингибция более коммитированных клеток-предшественников осуществляется через взаимодействие с рецептором ФНО типа I. Также установлено, что ФНО- α через рецептор ФНО-I понижает SCF-индуцированную пролиферацию нормальных клеток-предшественников в костном мозге. Jacobsen T.W. et al. (1995) выявили, что ФНО увеличивает содержание мРНК P53 и понижает экспрессию рецептора c-kit (тирозин-киназный тип рецептора) на гемопоэтических клетках-предшес-

твенниках и на незлокачественных клетках, что обуславливает ингибицию пролиферации этих клеток под влиянием ФНО (Jacobsen T.W. et al., 1995).

Однако, в ряде случаев при онкогематогических заболеваниях противоопухолевые и антипролиферативные цитокины извращенно становятся факторами роста злокачественных клеток. Например: ФНО в норме являясь цитотоксическим фактором при ВКЛ становится индуктором мРНК протоонкогенов: *c-myc*, *c-fos*, *c-jun* и повышает жизнеспособность клеток от больных волосатоклеточным лейкозом (Яворковский Л.М., 1994) и хроническим В-клеточным лейкозом. Показано, что ФНО в дозе от 1 до 100 ЕД/мл одинаковым образом и в одинаковой степени ингибируют рост как нормальных, так и миелолейкозных КОЕ (Offit K. et al., 1994). Было предложено использовать ФНО для очистки костного мозга от лейкозных клеток, так как при больших дозах ФНО (103-105 ЕД/мл) происходит существенная гибель опухолевых клеток при очистке от них костного мозга (С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев, А.А. Воробьев, 1999).

У разных авторов имеются различные критерии прогнозирования течения хронического лимфолейкоза, однако до сих пор нет критериев, которые бы позволили дать четкий и однозначный прогноз течения данного заболевания.

Известны критерии прогнозирования ХЛЛ по Rai et al.:

- Удвоение абсолютного числа лимфоцитов в крови менее чем за 12 месяцев—неблагоприятный прогноз);
- Диффузная инфильтрация лимфоцитами костного мозга в биопсийном материале (неблагоприятный прогноз);
- Сывороточный β -2 микроглобулин (повышенный уровень—неблагоприятный прогноз);
- Растворимый CD23 в сыворотке (повышенный уровень – неблагоприятный прогноз).

Генетические маркеры хронического лимфолейкоза.

ФНО – аутокринный ростовой фактор для клеток хронического В-лейкоза. Имеются данные, указывающие на то, что интенсивность синтеза ФНО может быть запрограммирована на генетическом уровне (Neilson J.R. et al., 1997; Filella X. et al., 1996; Morse H.R. et al.,

1999; Howell W.M. et al., 2002; Day C.P. et al., 1998). Гены ФНО- α и ФНО- β расположены в пределах главного комплекса гистосовместимости III класса на хромосоме 6 в области 6p21.3. Это высокополиморфный участок генома. В гене ФНО- α описано, по меньшей мере, 8 полиморфных сайтов (Wilson A.G. et al., 1993; Wilson A.G. et al., 1997; Messer G., Spengler U., Jung M.C., 1999). На линиях В-клеток человека было показано, что генетический полиморфизм, локализованный в положении -308 промоторного участка гена ФНО- α , характеризующийся заменой гуанина на аденин ($-308G \rightarrow A$), ассоциирован с повышенной экспрессией гена *in vitro*: присутствие аллеля G определяет часто встречающийся вариант ФНО- α^*1 , а присутствие аллеля A – более редкий вариант ФНО- α^*2 (Allen R.D. , 1999; Wilson A.G. et al. , 1997; Kroeger K.M. et al., 2000; Louis E. et al., 1998; Day C.P. et al., 1998). Показано, что редкий аллель ФНО- α^*2 ассоциирован с повышенной продукцией ФНО- α (Jacob C.O. et al., 1990; Abraham L.J., French M.A.H., Dawkins R.L., 1993). Наличие последовательности длиной в 10 пн, гомологичной консенсусу связывающего сайта белка-активатора-2 (AP-2), характеризует ФНО- α^*1 аллель. AP-2 белок репрессирует активность промотора ФНО- α , из чего, в свою очередь, следует, что $-308G \rightarrow A$ полиморфизм может влиять на экспрессию гена ФНО- α (Stuber F., et al., 1995/96).

Носители определенных аллелей генов ФНО- α и ФНО- β часто страдают некоторыми хроническими воспалительными заболеваниями, что, возможно, обусловлено наследственными особенностями продукции цитокинов (Louis E., et al., 1998).

В работах ряда авторов отмечено повышение концентрации ФНО- α в сыворотке крови больных, страдающих онкологическими заболеваниями (Howell W.M., et al. , 2002; Partanen R., Koskinen H., Hemminki K., 1995; Gadducci M. A., et al, 1995). В некоторых случаях зарегистрирована ассоциация повышенного уровня ФНО с более тяжелым течением лимфомы (Salles G., Bienvenu J., Bastion Y., 1996). В экспериментальных исследованиях L.Trentin и соавт. (1993) показано, что ФНО могут стимулировать рост злокачественных В-клеток при хронических лимфопролиферативных заболеваниях. Однако, в литературе имеются и альтернативные данные, согласно которым при

ряде опухолей наблюдается повышение в сыворотке крови концентрации ФНО- α и ФНО- β , но не обнаружено ассоциации с описанным полиморфизмом (Salles G., Bienvenu J., Bastion Y., 1996; Warzocha K., et al., 1997).

Полиморфизм первого интрона гена ФНО- β (лимфотоксин α) обусловлен заменой аденина на гуанин в 252 положении нуклеотида (+252A $\rightarrow$ G). Наличие аллеля А соответствует наиболее частому варианту полиморфизма, аллелю 1/2, тогда как мутантный аллель G обозначается как аллель 2. В работах G. Messer и соавт. (1991) была выявлена ассоциация мутантного аллеля 2 с повышением уровня экспрессии лимфотоксина и ФНО (Messer G., Spengler U., Jung M.C., 1991).

Важно отметить, что согласно литературным данным, полиморфные аллели локусов -308G $\rightarrow$ A гена ФНО- α и +252A $\rightarrow$ G гена ФНО- β обычно находятся в тесном сцеплении (Stanulla M., Schrauder A., Welte K., Schrappe M., 2001). Более того, имеются сведения об ассоциации определенных комбинаций полиморфных вариантов генов ФНО- α и ФНО- β с гемобластозами, в частности, с неходжскинской лимфомой (Cordingley F.T. et al., 1988; Chouchane L., Ben Ahmed S, Baccouche S., Remadi S., 1997) и хроническим лимфолейкозом (Demeter J. et al., 1997).

Изучению полиморфизма генов IL-6 и ФНО посвящены исследования С.Y. Zheng и соавт. (2000), Salles G., Bienvenu J., Bastion Y., 1996). Есть сообщение о выявленной ассоциации тяжести течения неходжскинской лимфомы с комбинацией функциональных полиморфизмов -308G $\rightarrow$ A для ФНО- α и +252A $\rightarrow$ G для ФНО- β (Warzocha K. et al., 1998). Были обнаружены ассоциации ФНО- α и ФНО- β с рядом других нозологий (Wilson A.G. et al., Hamann A. et al., 1995).

Таким образом, полиморфные генетические варианты генов IL-6, ФНО- α и ФНО- β находятся в ассоциации со степенью экспрессии данных генов и, следовательно, теоретически могли бы быть генетическими маркерами прогнозирования течения, а также определять сроки манифестации, тяжесть клинического течения и исход хронического лимфолейкоза.

4.1. Полиморфизм локуса -174G →С промоторной области гена интерлейкина-6.

Результаты изучения полиморфизма -174G→С промоторной области гена интерлейкина-6 (IL-6) представлены на рис. 27. Показано, что частота генотипа СС в общей группе больных хроническим лимфолейкозом составила 13,13% и на долю аллеля С приходилось 39,01%. В контрольной группе аналогичные показатели составили для генотипа СС -11,88% и для аллеля С -41,83%. Генотип GG у больных ХЛЛ встречался с частотой 44,44% против 36,63% в контроле. Гетерозиготный по мутации генотип GC выявлен с частотой 42,42% у больных ХЛЛ и 51,48% в контроле. Различия между больными хроническим лимфолейкозом и контролем по распределению частот генотипов ($\chi^2 = 1,69$) и аллелей ($\chi^2 = 0,14$) не достигали уровня статистической значимости ($p > 0,05$).

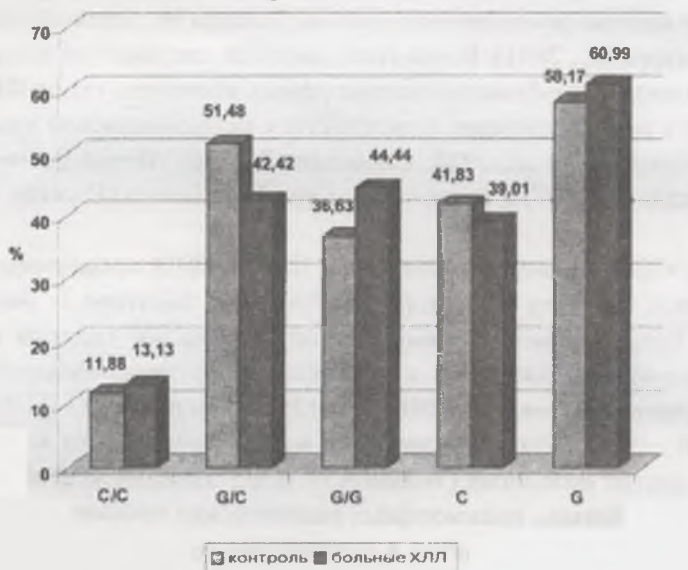


Рис. 27.

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса -174G→С промоторной области гена IL-6 у больных хроническим лимфолейкозом

Полученные результаты согласуются с литературными данными по изучению полиморфизма генов цитокинов у больных ХЛЛ (Hulkonen J, Vilpo J, Vilpo L et al., 2000). Авторы этого исследования провели изучение характера распределения частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов IL-6 у 36 больных ХЛЛ и 400 контрольных индивидов, согласно которым полученные различия между группами больных ХЛЛ и контролем не достигали уровня статистической значимости.

Результаты распределения генотипов и аллелей локуса -174G→С промоторной области гена IL-6 у больных хроническим лимфолейкозом в зависимости от клинических форм заболевания отражены в табл. 20. Как видно, на долю генотипа СС приходилось 11,78% при прогрессирующей форме ХЛЛ и 14,58 % при опухолевой форме заболевания. Частота генотипа GG составила 47,06 и 41,67 %, соответственно, на долю гетерозигот GC приходилось 41,18% при прогрессирующей форме и 43,75% - при опухолевой форме. Частоты аллелей G и C также оказались сходными у больных хроническим лимфолейкозом с прогрессирующей и опухолевой формами.

Таблица 20

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса -174G→С промоторной области гена IL-6 у больных ХЛЛ с учетом формы заболевания

Обследуемые группы	N	Частота генотипов						Частота аллелей			
		G/G		G/C		C/C		G		C	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Прогрессирующая форма	54	24	47,06	21	41,18	6	11,78	45	62,50	27	37,50
Опухолевая форма	50	20	41,67	21	43,75	7	14,58	41	59,42	28	40,58
χ^2 ; p		0,35; 0,89						0,04; 0,84			

Таким образом, сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса $-174G \rightarrow C$ гена IL-6 у больных хроническим лимфолейкозом в зависимости от формы заболевания значительных различий не выявил ($p > 0,05$).

Полиморфизм локуса $-308G \rightarrow A$ промоторной области гена фактора некроза опухолей α (ФНО- α).

Результаты молекулярно-генетического изучения полиморфизма $-308G \rightarrow A$ в промоторной области гена ФНО- α продемонстрированы на рис.28.

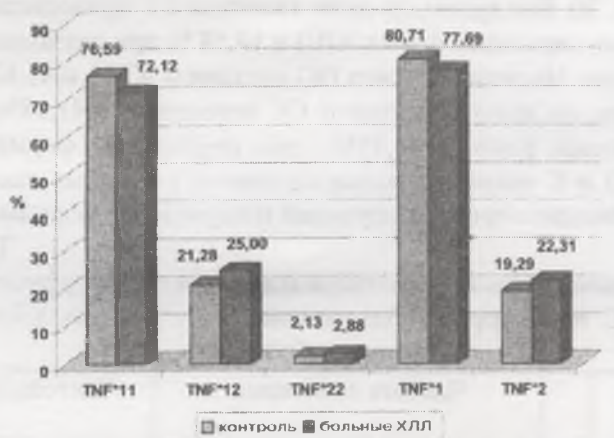


Рис. 28.

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса $-308G \rightarrow A$ ФНО- α у больных хроническим лимфолейкозом

Согласно полученным результатам, в группе больных хроническим лимфолейкозом частота генотипа TNF*22, гомозиготного по мутантным аллелям и определяющего повышенный уровень экспрессии гена ФНО- α , составила 2,88%, частота аллеля TNF*2 – 22,31%, что не имеет значимых отличий по сравнению с контрольной группой, где на долю генотипа TNF*22 и аллеля TNF*2 приходится 2,13 и 19,29%, соответственно ($\chi^2 = 0,83$; $p = 0,36$). Полученные результаты

согласуются с аналогичными литературными данными, представленные в работах Mainou-Fowler T, Dickinson AM, Taylor PR et al. (2000) и Wihlborg C, Sjoberg J, Intaglietta M et al. (1999). Авторами этих исследований был изучен полиморфизм гена TNF- α у больных с В-ХЛЛ и болезнью Ходжкина. Результаты этих работ показали отсутствие значимых различий между группами больных и контролем по распределению частот аллелей.

Данные сравнительного анализа особенностей распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса -380G $\rightarrow$ A гена ФНО- α у больных ХЛЛ с учетом формы заболевания приведены в таблице 21. В результате изучения характера распределения частот генотипов у больных ХЛЛ в зависимости от формы заболевания выявлено увеличение частоты встречаемости мутантного генотипа TNF*22 у больных с опухолевой формой ХЛЛ до 4,0% по сравнению с прогрессирующей формой ХЛЛ, где на долю генотипа TNF*22 приходилось 1,9%. Несмотря на то, что применение критерия χ^2 не выявило значимых различий по частотам генотипов между больными ХЛЛ и контрольной группой ($\chi^2=0,45$; $p=0,86$), повышение частоты мутантного генотипа у больных с опухолевой формой свидетельствует о возможной прогностической значимости данного генетического маркера.

Таблица 21

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса -308G $\rightarrow$ A ФНО- α у больных ХЛЛ с учетом клинической формы заболевания

Обследуемые группы	N	Частота генотипов						Частота аллелей			
		TNF*11		TNF*12		TNF*22		TNF*1		TNF*2	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Прогрессирующая форма	54	39	72,2	14	25,9	1	1,9	53	77,9	15	22,1
Опухолевая форма	50	36	72,0	12	24	2	4,0	48	77,4	14	22,6
χ^2 ; p		0,45; 0,86						0,001; 1,0			

Полученные результаты позволяют предположить, что генотипирование полиморфизма локуса – 308G→A ФНО- α на ранних стадиях заболевания у больных ХЛЛ помогло бы выделить группу лиц, генетически предрасположенную к опухолевой форме заболевания.

Полиморфизм локуса +252A→G гена фактора некроза опухолей β (ФНО- β)

Результаты молекулярно-генетического анализа полиморфизма +252A→G ГЕНА ФНО β у больных ХЛЛ по сравнению с контрольной группой представлены на рис.29.

Как видно из полученных данных, только один генотип, а именно LT*22, характеризующийся наличием мутации гена ФНО- β в гомозиготном состоянии, у больных ХЛЛ встречался более чем в 2 раза чаще по сравнению с контролем (9,00% и 3,55%, соответственно). Соответственно, применение критерия χ^2 показало наличие достоверных различий между группами ($\chi^2=3,82$; $p=0,05$). Для генотипа LT*22 был рассчитан показатель OR, который для больных хроническим лимфолейкозом составил 2,68, что указывает на значимое повышение вероятности развития хронического лимфолейкоза у индивидов с данным генотипом.

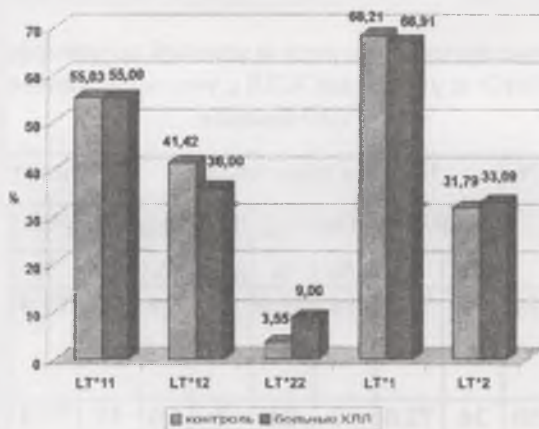


Рис. 29.

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса +252A→G гена ФНО – β у больных хроническим лимфолейкозом

Сравнительный анализ, характера распределения частот генотипов гена ФНО – β у больных ХЛЛ с учетом формы заболевания не выявил выраженных различий между больными с прогрессирующей и опухолевой формой, о чем свидетельствуют данные, приведенные в табл. 22. Так, на долю мутантных генотипов, гомозиготных по аллелю LT*22, приходится 9,6% у больных с прогрессирующей формой и 8,3% у больных с опухолевой формой хронического лимфолейкоза ($\chi^2=0,001$; $p>0,05$). Близкие по значению частоты выявлены для генотипов LT*11 и LT*12 при прогрессирующей и опухолевой формах заболевания. Статистический анализ показал отсутствие значительных различий по распределению частот генотипов ($\chi^2=0,009$; $p>0,05$).

Таблица 22

Распределение частот генотипов
 полиморфного локуса +252A→G гена ФНО – β у больных ХЛЛ
 с учетом клинической формы заболевания

Обсле- дуемые группы	N	Частота генотипов						Частота аллелей			
		LT*11		LT*12		LT*22		LT*1		LT*2	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Прогрес- сирующая форма	52	28	53,84	19	36,54	5	9,62	47	66,19	24	33,80
Опухолевая форма	48	27	56,25	17	35,42	4	8,33	44	67,69	21	32,31
χ^2 ; p		0,08; 1,00						0,001; 0,99			

Анализ комбинаций генотипов по локусам ФНО- α и ФНО- β у больных хроническим лимфолейкозом.

Принимая во внимание, что гены ФНО- α и ФНО- β расположены на одной хромосоме в непосредственной близости (6p21.3), целесообразным представлялось изучить особенности комбинаций генотипов по изученным локусам и характер сцепления между ними. Данные по распределению комбинаций генотипов приведены в табл. 23.

Из представленных в таблице данных видно, что из 9 возможных комбинаций генотипов в контроле встречались все 9 вариантов, у больных хроническим лимфолейкозом - 7 вариантов, (комбинации генотипов TNF*22/LT*11 и TNF*22/LT*12 у больных не встречались). Вариант TNF*11/LT*22, для которого характерно наличие мутации по гену ФНО-β в гомозиготном состоянии и нормальных аллелей по гену ФНО-α, чаще встречается у больных (3,85%), чем у здоровых (1,89%). Существенные различия между больными и контролем установлены по комбинации TNF*22/LT*22, характеризующейся наличием мутаций в генах ФНО-α и

Таблица 23

Комбинации генотипов по локусам ФНО-α и ФНО-β у больных хроническим лимфолейкозом

Комбинации генотипов -308/+252	Частота комбинаций генотипов				OR*	
	больные ХЛЛ (n=104)		контрольная группа (n=158)		Б-К	К-Б
	абс.	%	абс.	%		
TNF*11/LT*11	49	47,12	71	44,94	1,09	0,92
TNF*11/LT*12	19	18,27	29	18,35	0,99	1,01
TNF*11/LT*22	4	3,85	3	1,89	2,07	0,48
TNF*22/LT*11	-	-	2	1,27	0,30	3,34
TNF*22/LT*12	-	-	1	0,63	0,50	1,99
TNF*22/LT*22	3	2,88	1	0,63	4,66	0,21
TNF*12/LT*11	6	5,77	15	9,49	0,56	1,71
TNF*12/LT*12	17	16,35	34	21,52	0,71	1,40
TNF*12/LT*22	2	1,92	2	1,27	1,53	0,65

ФНО-β в гомозиготном состоянии. Данный вариант выявлен у 2,88% больных ХЛЛ и только у 0,63% индивидов контрольной груп-

пы. Данная комбинация у больных ХЛЛ встречалась в 4,8 раз чаще по сравнению со здоровыми индивидами ($OR=4,66$).

Исходя из полученных данных, можно сделать заключение о возможности использования в качестве маркеров повышенного риска развития ХЛЛ двух комбинаций генотипов: с нормальным аллельным вариантом по локусу $-308\text{ФНО-}\alpha$ в сочетании с мутацией по локусу $+252\text{ ФНО-}\beta$ в гомозиготном состоянии (вариант TNF*11/LT*22) и комбинацией мутантных генотипов в гомозиготном состоянии по локусам $-308\text{ФНО-}\alpha$ и $+252\text{ ФНО-}\beta$ (вариант TNF*22/LT*22).

Необходимо отметить, что сочетания генотипов TNF*22/LT*11 и TNF*22/LT*12 встречались только в контроле с частотой 1,27 и 0,63%, соответственно. Между тем, у больных хроническим лимфолейкозом указанные варианты выявлены не были. Показатель OR для комбинации генотипов TNF*22/LT*11 и TNF*22/LT*12 составил 0,30 и 0,50, соответственно, что свидетельствует о протективном значении этих вариантов.

На следующем этапе нами был проведен анализ комбинаций генотипов по локусам $-308\text{ФНО-}\alpha$ и $+252\text{ ФНО-}\beta$ у больных хроническим лимфолейкозом в зависимости от клинической формы заболевания. Результаты анализа представлены в табл. 24. У больных с прогрессирующей формой заболевания и у больных с опухолевой формой выявлено по 7 комбинаций генотипов. Заслуживает внимания наблюдаемое повышение у больных с прогрессирующей формой комбинации генотипов TNF*11/LT*22 до 5,8% против 2,1% при опухолевой форме ХЛЛ. Показатель OR для этого варианта составил 2,88, указывая на повышенную предрасположенность к прогрессирующему течению заболевания при наличии данной комбинации. Аналогичное заключение можно сделать и для комбинации генотипов TNF*12/LT*12 , на долю которого приходится 21,2% при прогрессирующей форме и только 12,5% - при опухолевой форме ХЛЛ. Для данного варианта показатель OR составил 1,88, свидетельствуя о повышенной вероятности развития прогрессирующей формы ХЛЛ у лиц с данным генотипом.

Таблица 24

Комбинации генотипов по локусам ФНО-α и ФНО-β у больных хроническим лимфолейкозом с учетом клинической формы заболевания

Комбинации генотипов –308/+252	Частота комбинаций генотипов				OR*	
	прогрессирующая форма (n=52)		опухолевая форма (n=48)		П-О	О-П
	абс.	%	абс.	%		
TNF*11/LT*11	26	50,0	23	47,92	1,09	0,92
TNF*11/LT*12	8	15,38	11	22,92	0,61	1,63
TNF*11/LT*22	3	5,77	1	2,08	2,88	0,34
TNF*22/LT*22	1	1,92	2	4,17	0,45	2,22
TNF*12/LT*11	2	3,85	4	8,33	0,44	2,27
TNF*12/LT*12	11	21,15	6	12,5	1,88	0,53
TNF*12/LT*22	1	1,92	1	2,08	0,92	1,08

В качестве прогностически неблагоприятных комбинаций генотипов по локусам ФНО-α и ФНО-β следует отметить варианты TNF*22/LT*22 и TNF*12/LT*11, частота которых при опухолевой форме хронического лимфолейкоза оказалась почти в 2 раза выше, чем при прогрессирующей форме заболевания. Показатели OR в отношении опухолевой формы ХЛЛ составили 2,22 для сочетания TNF*22/LT*22 и 2,27 для комбинации генотипов TNF*12/LT*11. Полученные результаты позволяют использовать данные комбинации генотипов по локусам ФНО-α и β в качестве возможных генетических маркеров предрасположенности к опухолевой форме ХЛЛ.

Литература

1. Абдулкадыров, К. М. Влияние различных режимов химиотерапии на длительность жизни и причины смерти больных множественной миеломой (ретроспективный анализ) / К. М. Абдулкадыров, С. С. Бессмельцев, Л. В. Стельмашенко // Вопросы онкологии. - 1997. - № 3. - С. 341-346.
2. Алгоритм проведения цитогенетического исследования у больных гемобластозами / Е. В. Домрачева, А. В. Захарова, А. М. Удовиченко и др. // Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии : Материалы Рос. науч.-практ. конф., посв. 70-летию Рос. науч.-исслед. ин-та гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, 18–20 июня 2002 г. – СПб., 2002. – С. 113.
3. Алмазов, В. А. Миеломная болезнь : Обзор / В. А. Алмазов, Б. В. Афанасьев, Э. И. Подольцева // Клиническая медицина. - 1993. - Т. 71, № 2. -С. 5-10.
4. Андреева, Н. Е. Диагностика и лечение множественной миеломы. - М. : Ньюдиамед - АО, 1998. - 30 с.
5. Андреева, Н. Е. Иммуноглобулинопатии / Н. Е.Андреева, Е. В. Чернохвостова. - М. : Медицина, - 1985. - 238 с.
6. Андреева, Н. Е. Парапρωτεинемические гемобластозы (иммуноглобулин-секретирующие лимфомы) / Н. Е. Андреева, Т. В. Балакирева // Руководство по гематологии : в 3 т. Т. 2 / под ред. А. И. Воробьева. – 3-е изд., перераб. и доп. - М. : Ньюдиамед, 2003. - С. 151-184.
7. Андреева, Н. Е. Ретроспективный анализ цитостатической терапии пациентов с множественной миеломой / Н. Е.Андреева, Е. Ю. Ильяшенко, Э. Ю.Сариди // Проблемы гематологии. - 2002. - № 3. – С. 7 -11.
8. Арчаков, А. И. Микросомальное окисление. - М. : Наука, 1975. –327 с.
9. Бессмельцев, С. С. Недостаточность кровообращения и методы ее коррекции при множественной миеломе / С. С. Бессмельцев, К. М. Абдулкадыров // Терапевтический архив. - 1992. - № 7. – С. 62-66.
10. Влияние ультрафиолетового облучения лимфоцитов крови на синдром полинейропатии при множественной миеломе и

макроглобулинемии Вальденстрема / Г. А. Дудина, А. В. Кильдюшевский, А. К. Голенков и др. // Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии : Материалы науч. практ. конф. – СПб, 2002. – С. 113-114.

11. Влияние химиотерапии циклоплатамом на гемостаз при множественной миеломе / Т. И. Ксензова, Л. В. Жердева, Н. Е. Андреева, А. У. Магомедова // Гематология и трансфузиология. - 1997. - Т. 42, № 6. - С. 12-15.

12. Волкова, М. А. Полвека в терапии хронического лимфолейкоза / М. А. Волкова // Гематология и трансфузиология. - 1998. - № 5. - С. 6-12.

13. Воробьев, А. И. Опухоли лимфатической системы / А. И. Воробьев, А. М. Кременецкая, Д. В. Харaziшвили // Гематология и трансфузиология. - 2000. - Т. 45, № 3. - С. 4-14.

14. Воробьев, А. И. Принципы дифференциальной диагностики зрелоклеточных лимфатических опухолей / А. И. Воробьев, Е. И. Яхнина, Р. С. Самойлова // Терапевтический архив. - 1995. - № 7. - С. 3-7.

15. Геном человека и гены «предрасположенности» : (введение в предиктивную медицину) / В. С. Баранов, Е. В. Баранова, Т. Э. Иващенко, М. В. Асеев. - СПб. : Интермедика, 2000. – 272 с.

16. Герчева, Л. Интракраниально приложение на циклофосфамид при миеломной болезни / Л. Герчева, И. Живков, Дж. Хозжажикова // Совр. мед. – 1983. – Т. 34, № 5. – С. 239-294.

17. Дьюри, Б. Г. Современная гематология и онкология / под ред. В. Ф. Фаррбенкса. – М., 1987. - С. 10-23.

18. Зарайский, М. И. Роль HLA-антигенов в прогнозировании активности течения множественной миеломы / М. И. Зарайский, Э. И. Подольцева // Терапевтический архив. - 1998. - № 7. - С. 42-46.

19. Кетлинский, С. А. Эндогенные иммуномодуляторы / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев, А. А. Воробьев. – СПб. : Гиппократ, 1992. – 255 с.

20. Кольман, Л. Наглядная биохимия / Л. Кольман, Н. Г. Рем. - М. : Мир, 2000. – 469 с.

21. Кулинский, В. И. Обезвреживание ксенобиотиков / В. И. Кулинский // Соросовский Образовательный журнал. - 1999. - № 1. - С. 8-12.

22. Кухтевич, А. В. Транзиторная протеинурия как проявление миеломной болезни / А. В. Кухтевич, А. В. Русских, В. И. Киреева // Тер. архив. - 2000. - № 6. - С. 65-66.
23. Осечинский, И. В. Закономерности возникновения гемобластозов : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1981. - 155 с.
24. Острая и хроническая почечная недостаточность у больных миеломной болезнью / Л. С. Бирюкова, Е. Б. Володяева, Е. В. Фетинова и др. // Тер. архив. - 1999. - № 7. - С. 58-64.
25. Подольцева, Э. И. Классификация множественной миеломы / Терапевтический алгоритм / Э. И. Подольцева // Гематология и трансфузиология. - 1997. - Т. 42, № 3. - С. 8-11.
26. Распространение и основные варианты гемобластозов в Республике Башкортостан / В. И. Никуличева, Е. Г. Царева, Г. Ш. Сафуанова, Д. Х. Калимуллина // Материалы 3 Всероссийского съезда гематологов и трансфузиологов. — СПб., 1996. — С. 6.
27. Риск возникновения вторых злокачественных опухолей у больных гемобластозами / Н. В. Данилова, Н. В. Хлевная, И. И. Лим [и др.] // Гематология и трансфузиология. - 2000. — Т. 45. - С. 40-43.
28. Руководство по гематологии : в 2 т. / под ред. А.И. Воробьева. - М., 2002. — Т. 2. - 277
29. Сингер, М. Гены и геномы : в 2-х т. / М. Сингер, П. Берг — М.: Мир, 1998. — Т. 2. — 391 с.
30. Стельмашенко, Л. В. Роль некоторых биохимических и иммунологических факторов в прогнозировании течения и эффективности лечения множественной миеломы : автореф. дис. ... канд. мед. наук. - СПб., 1997. - 20 с.
31. Тареева, И. Е. Нефрология : руководство для врачей : в 2-х т. - М. : Медицина, 1995. — Т. 1. - 495 с.
32. Тугузбаева, Г. Ф. Диспансеризация больных лейкозами / Г. Ф. Тугузбаева // Вопросы сердечно-сосудистой патологии и заболеваний желудочно-кишечного тракта : сб. науч. тр. - Уфа, 1973. — С. 122-124.
33. Тугузбаева, Г. Ф. О заболеваемости сельского населения лейкозами в ряде районов Башкирской АССР / Г. Ф. Тугузбаева // Вопросы сердечно-сосудистой патологии и заболеваний желудочно-кишечного тракта : сб. науч. тр. - Уфа, 1973. — С. 104-108.

34. Царева, Е. Г. Гемобластозы в Республике Башкортостан: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Уфа, 1999. – 24 с.

35. Эпидемиологическая оценка индивидуального риска возникновения гемобластозов / И. В. Осечинский, Г. А. Броун, М. С. Маджитова, Ц. В. Чинчаладзе // Организация гематологической помощи : науч. темат. сб. – М., 1989. – С. 87-90.

36. Эпидемиологические показатели миеломной болезни и сочетающихся с ней нефропатий. / О. Камаева, В. Сура, Н. Виноградова и др. // Терапевтический архив. – 1997. – № 1. – С. 73-75.

37. Яворковский, Л. М. Ген P53 при лимфопролиферативных заболеваниях / Л. М. Яворковский // Экспериментальная онкология – 1994. – № 1, Т. 16. – С. 16.

38. Яковлева, С. В. Значение уровня лактатдегидрогеназы и $\beta 2$ микроглобулина для оценки прогноза и выбора терапии при множественной миеломе / С. В. Яковлева, Н. Е. Андреева, А. С. Изгородин // Терапевтический архив. – 1995. – № 7. – С. 35-39.

39. Яковлева, С. В. Прогностическое значение цитологического исследования костного мозга при множественной миеломе / С. В. Яковлева // Терапевтический архив. – 2000. – № 7. – С. 48-51.

40. A case- control study of hematopoietic and lymphoid neoplasms. The role of work in the chemical industry / Massoudi Barbara L., Talboff Evelyn O., Day Richard D. et al. // Amer. J. Ind. Med. – 1997. – Vol. 31, № 1. – P. 21-27.

41. ACYP1A1 restriction fragment length polymorphism is associated with cancer in African-American woman / E. Taioli, J. Trachman, X. Chen et al. // Cancer Res. – 1995. – Vol. 55. – P. 3757-58.

42. A molecular study of the t(4,14) in multiple myeloma / K. Sibley, G. Fenton, A. Dring et al. // Br. J. Haematol. – 2002. – Vol. 118, № 2. – P. 514-20.

43. A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density / N. Ota, T. Nakajima, I. Nakazawa et al. // Hum. Genet. – 2001. – Vol. 46. – P. 267-272.

44. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal From the International Lymphoma Study Group / N.L. Harris, E.S. Jaffe, H. Stein et al. // Blood. – 1994. – Vol. 84. – P. 1361-1392.

45. Abraham L.J. /Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor alpha / L.J. Abraham, M.A.H. French, R.L. Dawkins // Clin. Exp. Immunol. – 1993. – Vol. 92. – P. 14–18.

46. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma/ M. Chesi, L.A. Brents, S.A. Ely et al. // Blood. - 2001. – Vol. 97. - P. 729-736.

47. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations - analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group phase III trial / P.C. Liu, T. Leong, L. Quam et al. // Blood. - 1996. - Vol. 88. - P. 2699-2706.

48. Acute phase proteins and prognosis in multiple myeloma / G. Merlini, V. Perfetti, P.G. Gobbi et al. // Br. J. Haematol. - 1993. - Vol. 83, № 4. - P. 595-601.

49. Advancement of multiple myeloma from diagnosis through plateau phase to progression does not involve a new B-cell clone: evidence from the Ig heavy chain gene / D.E. Joshua, R. Brown, J. Gibson et al. // Blood. -1993. - Vol. 82, № 1. - P.202-206.

50. Allen, R.D. Polymorphism of the human TNF- α promoter – random variation or functional diversity? / R. D. Allen // Molecular Immunology. - 1999. - Vol. 36. - P. 1017.

51. Allen, R. D. Polymorphism of the human TNF- α promoter – random variation or functional diversity? / R. D. Allen // Molecular Immunology. – 1999. – Vol. 36. – P. 1017.

52. Altieri, A. Familial risk for non-Hodgkin lymphoma and other lymphoproliferative malignancies by histopathologic subtype: the Swedish Family-Cancer Database / A. Altieri, J.L. Bermejo, K. Hemminki // Blood. – 2005. – Vol. 106, № 2. – P. 668-72.

53. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles / A.G. Wilson, N. de Vries, F. Pociot et al. // J. Exp. Med. . - 1993. -Vol. 177. - P.557.

54. An experience with sixty cases of haematological malignancies; a clinico haematological correlation / M. Idris, S.H. Shah, J. Fareed, N. Gul // J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad. – 2004. - Bd. 16, № 4. - S. 51-4.

55. An IL 6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human

immunodeficiency virus / C.B. Foster, T. Lehrbecher, S. Samuels et al. // *Blood*. – 2000. – Vol. 96, № 7. – P. 2562-7.

56. An overview of young CLL patients: a single-centre experience from Turkey / G.E. Pamuk, O.N. Pamuk, T. Soysal [et al.] // *Haematologia* (Budap.). – 2002. – Vol. 31, № 4. – P. 303-11.

57. Animal related occupations and the risk of leukemia, myeloma and non – Nodgkin's Lymphoma in Canada / L. Fritschi, K.C. Johnson, E.V. Kliewer, R. Fry // *Cancer Causes Control*. – 2002. – Vol. 13, № 6. – P. 563-571.

58. Association between an interleukin-6 promoter and 3' flanking region haplotype and reduced Alzheimer's disease risk in a German population / M. Bagli, A. Papassotiropoulos, M. Knapp et al. // *Neurosci. Lett*. – 2000. – Vol. 283, № 2. – P. 109-112.

59. Association between personal use of hair dyes and lymphoid neoplasms in Europe / S. de Sanjose, Y. Benavente, A. Nieters [et al.] // *Am. J. Epidemiol*. – 2006. – Vol. 164, № 1. – P. 47-55.

60. Association of cigarette smoking and CYP1A1 polymorphisms with adenocarcinoma of the lung by grades of differentiation / K. Nakachi, S. Hayashi, K. Kawajiri, K. Imai // *Carcinogenesis*. – 1995. – Vol. 16, № 9. – P. 2209.

61. Association of CYP1A1, GSTM1 and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggests cell type specificities to tobacco carcinogens / L. Le Marchand, L. Sivaraman, L. Pierce et al. // *Cancer Res*. – 1998. – Vol. 58. – P. 4858.

62. Association of IL-6 gene alleles with systemic lupus erythematosus (SLE) and with elevated IL-6 expression / M. Linker-Israeli, D.J. Wallace, J. Prehn et al. // *Genes.Immun*. – 1999. – Vol. 1, № 1. – P. 45-52.

63. Au William W. Cajas – Salanar Nohelia. Salama Salama A. Inheritance of polymorphic metabolizing genes on emironmental discase and quality of life: Pap / 3 rd Internation Conference on Environmental Mutagenesis in Human Populations. Bangkok // Khao Yai Nov. 29 Dec. 4. 1998.

64. Au William W., Sierra-Forres Carlos H // *Mutat. Res. Fundam. and Mol. Much. Mytagen*. – 1999. – Vol. 428, № 1-2. – P. 131-140.

65. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myeloma / M. Kawano, T. Hirano, T. Matsuda et al. // *Nature*. – 1988. – Vol. 332. – P.83.

66. Autocrine or paracrine models of cytokine production and utilization in B-cell chronic lymphocytic leukemia / R. Foa, M. Giovarelli, M.T.T. Fierro et al. // *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* – 1988. – Vol. 30. – P. 339-341.

67. Baker, B.A. Can pesticide contaminated soil cause nealth effect? : Abstr. North American Congress of Clinical Toxicology Annual Meefing. Tucson. Ariz. Sept.13-18. -2000. –J. / B.A Baker, A. Topliff // *Clin. Toxicol.* - 2000. –Vol. 38, № 5. – P. 513-514.

68. Barlogie, B. Multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia : parallels and contrasts / B. Barlogie, R.P. Gale // *Am. J. Med.* - 1992. –Vol. 93 (4). – P. 443-450.

69. Bataille, R. New insight in the clinical biology of multiple myeloma / R. Bataille // *Semin. Hematol.* - 1997. - Vol. 34. - P. 23-28.

70. Becker, N. Asbestos exposure and malignant lymphomas a review of the epidemiological literature / N. Becker, J. Berger, Bolm-Audorffu // *Int. Arch. Occup. Environ Health.* – 2001. – Sep. - Vol. 74 (7). – P. 459-69.

71. Bimodal cell populations are common in chronic lymphocytic leukemia but do not impact overall survival / A.E. Cocco, E.S. Osei, D.M. Thut [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2005. – Vol. 123, № 6. – P. 818-25.

72. Bloomfield, C. D. In : *Basic Principles and Clinical Management of Cancer* / C. D. Bloomfield, K. A. Foon, E. G. Lemine – N. Y., 1993. – P. 459-468.

73. Body mass index and risk of leukemia in older women / J. A. Ross, E. Parker, C. K. Blair [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* – 2004. – Vol. 13, № 11. – Pt. 1. – P. 1810-3.

74. Boice, J.D. Jr. Cancer mortality among populations residing in counties near the Hanford site, 1950-2000 / J.D. Boice Jr., M.T. Mumma, W.J. Blot // *Health Phys.* – 2006. – Vol. 90, № 5. – P. 431-45.

75. Borst, R. Genetic mechanisms of drug resistance. A review / R. Borst // *Acta Oncol.* - 1991. -Vol. 30 - P. 87-105.

76. Bosh, I. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer / I. Bosh I., J. Croop // *Biochim. Biophys. Acta*, - 1996. - Vol. 1288. - P. 37-54.

77. Bradley, G. P-glycoprotein, multidrug resistance and tumor progression / G. Bradley, V. Ling // *Cancer Metast. Reviews.* - 1994. – Vol. 13. –P. 223-233.

78. Bray, I. Recent trends and future projections of lymphoid neoplasms a Bayesian ageperiod – cohort analysis / I. Bray, P. Brennan, P. Boffetta // *Cancer Causes Control*. – 2001. – Vol. 12 (9). – P. 813-820.
79. *Cancer Incidence in Five Continents (ARS Sca Publ)*. – 1992. – 23 p.
80. Caporaso, N. Perspectives on familial chronic lymphocytic leukemia: genes and the environment / N. Caporaso, G.E. Marti, L. Goldin // *Semin Hematol*. – 2004. – Vol. 41, № 3. – P. 201-6.
81. Cartwright, R. A. Sex ratios and the risks of haematological malignancies / R.A. Cartwright, K.A. Gurney, A.V. Moorman // *Br. J. of haematology*. – 2002. – Sep. – Vol. 118 (4). – P. 1071-7.
82. Catovsky, D. The search for genetic clues in chronic lymphocytic leukemia / D. Catovsky // *Hematol. Cell Ther*. – 1997. – Vol. 39. – Suppl. 1. – P. S5-11.
83. Changed trends of cancer mortality in the elderly / Levi O.F., Luccini F., Negri E. et al. // *Ann. Oncol*. – 2001. – Oct. – Vol. 12 (10). – P. 1467-77.
84. Characterisation of Human Glutathione S-Transferase μ Cluster Containing a Duplicated GSTM1 Gene that Causes Ultrarapid Enzyme Activity / R. McLellan, M. Oscarson, A.K. Alexandrie et al. // *Mol. Pharmacol*. – 1997. – Vol. 52, № 6. – P. 958-965.
85. Characterization of xenobiotic-metabolism enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues / K. Mace, E.D. Bowman, P. Vautravers et al. // *Eur. J. Cancer*. – 1998. – Vol. 34. – P. 974-920.
86. Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) in Central Africans / J.M. Mukiibi, B. Paul, C.M. Nyirenda [et al.] // *Cent. Afr. J. Med*. – 2004. – Vol. 50, № 11-12. – P. 111-5.
87. Chronic lymphocytic leukemia in Hiroshima and Nagasaki, Japan / S.C. Finch, T. Hoshino, T. Itoda et al. // *Blood*. – 1969. – Vol. 33. – P. 79-86.
88. Chronic lymphocytic leukemia in Turkey: experience of a single center in Istanbul / O.N. Pamuk, G.E. Pamuk, T. Soysal [et al.] // *South Med. J*. – 2004. – Vol. 97, № 3. – P. 240-5.
89. Clinical and morphologic features of B-cell small lymphocytic lymphoma with del(6)(q21q23) / K. Offit, D. C. Louie, N. Z. Parsa et al. // *Blood*. – 1994. – Vol. 83. – N 9. – P. 2611–2618.

90. Constitutive production of interleukin-6 by ovarian cancer cell lines and by primary ovarian tumor cultures / J. M. Watson, J. L. Sensintaffar, J.S. Berek, O. Martinez-Maza // *Cancer Res.* - 1990. - Vol. 50. - P.6959-6965.

91. Crocetti, E. Time trends in cancer incidence and mortality in central Italy / Crocetti E., Paei E., Miccinesi G., Costantini A.S. et al. // *Eur. J. Cancer Prev.* - 2002. - Aug. - Vol. 11(4). - P.387-395.

92. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma / J. Jr. Shaughnessy, A. Gabrea, Y. Qi et al. // *Blood.* - 2001. - Vol. 98. - P. 217-223.

93. CYP1A1 Genetic polymorphism and in situ colorectal cancer / L. Sivaraman, M.P. Leathman, J. Yee et al. // *Cancer Res.* - 1994. - Vol. 54. - P. 3692-95.

94. Cytochrome P4501A1 and glutation S-transferase (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk / C. Ambrosone, J. Freudenheim, S. Graham et al. // *Cancer Res.* - 1995. - Vol. 55, № 16. - P. 3483 - 3485.

95. Cytogenetic mapping of the duplicated segment of chromosome 12 in lymphoproliferative disorders / G. Gahrton, K. H. Robert, K. Friberg et al. // *Nature.* - 1982. - Vol. 297. - P. 513.

96. Cytokine gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of constitutive interleukin-8 (IL-8) mRNA expression and secretion of biologically active IL-8 protein / P.F. di Celle, A. Carbone, D. Marchis et al. // *Blood.* - 1994. - Vol. 84. - P. 220-228.

97. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases / J. Bidwell, L. Keen, G. Gallagher et al. // *Genes Immun.* - 1999. - Vol. 1, № 1. - P. 3-19.

98. Cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1alpha) and soluble interleukin-2 receptor as serum tumor markers in multiple myeloma / X. Filella, J. Blade, A.L. Guillermo et al. // *Cancer Detect Prev.* - 1996. - Vol. 20, № 1. - P. 52-56.

99. Cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1alpha) and soluble interleukin-2 receptor as serum tumor markers in multiple myeloma / X. Filella, J. Blade, A.L. Guillermo et al. // *Cancer Detect. Prev.* - 1996. - Vol. 20. - № 1. - P. 52-56.

100. Dainiak, N. Hematologic concepic of exposure to ionizing radiation / N. Dainiak // *Exp. Hematol.* – 2002. – Jun. – Vol 30 (6). – P. 513-528.

101. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival / J.R. Neilson, R. Auer, D. White et al. // *Leukemia.* – 1997. – Vol. 11. – P. 1929-1932.

102. Detection of CYP1A1 gene polymorphism using designed RFLP and distributions of CYP1A1 genotypes in Japanese / T. Oyama, T. Mitsudomi, T. Kawamoto et al. // *Int. Arch. Occup. Environ Health.* – 1995. – Vol. 67, № 4. – P. 253-6.

103. DeVita, V.T. *Cancer. Principles and Practice of Oncology* / V.T. DeVita, S. Hellman, S.A. Rosenberg, - 5th ed. – Philadelphia : Lippincott Raven Publishers, 1997. - Vol. 2. - 456 p.

104. Dimopoulos, M. A. Solitary plasmacytoma of bone and extramedullary plasmacytoma. Hematology / M. A. Dimopoulos, Ch Kiamouris, L.A. Mouloupous // *Oncol. Clin. of North Am.* – 1999. - Vol. 13, № 6. – P. 1249-1258.

105. Direct influences of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6) on the proliferation and cell-surface antigen expression of cancer cells / S. Kuninaka, T.Yano, H. Yokoyama et al. // *Cytokine.* - 2000. - Vol. 12, № 1. - P. 8-11.

106. Do steroids increase lymphoma risk? A case-control study of lymphoma risk in polymyalgia rheumatica/giant cell arteritis / J. Askling, L. Klareskog, H. Hjalgrim [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2005. – Vol. 64, № 12. – P. 1765-8.

107. Early myeloablative therapy for multiple myeloma / R. Alexanian, A. Dimopoulos, J. Hester et al. // *Blood.* - 1994. - Vol. 84, № 12. - P. 4278-4282.

108. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation / A. G. Wilson, J. A. Symons, T. L. McDowell et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 3195–3199.

109. Effects of interleukin-6 (IL-6) on chemotherapy-induced apoptosis in human ovarian cancer cell lines / S. Ishioka, C. Haaften-Day, S. Sagae et al. // *Int. J. Clin. Oncol.* - 1999. - Vol. 4. - P. 84-89.

110. Effects of stimulus and cell type on the expression of the –308

tumour necrosis factor promoter polymorphism / K. M. Kroeger, J. H. Steer, D. A. Joyce, L. J. Abraham // *Cytokine*. - 2000. - Vol. 12. - P. 110.

111. Epidemiologic, clinical and therapeutic aspects of chronic lymphoid leukemia: apropos of 120 cases / M. Khalifa, S. Chehata, M. A. Laatiri [et al.] // *Tunis Med*. - 2002. - Vol. 80, № 10. - P. 584-9.

112. Epidemiology and ethnic aspects of B cell chronic lymphocytic leukemia in Israel / L. Shvidel, M. Shtarlid, A. Klepfish [et al.] // *Leukemia*. - 1998. - Vol. 12, № 10. - P. 1612-7.

113. Evans, D. A. P. Genetic Factors in Drug Therapy: Clinical and Molecular Pharmacogenetics / D. A. P. Evans. - Cambridge : Cambridge University Press, 1993. - P.102.

114. Expression and functional role of tumor necrosis factor receptors on leukemic cells from patients with type B chronic lymphoproliferative disorders / L. Trentin, R. Zambello, C. Agostini et al. // *Blood*. - 1993. - Vol. 81. - P. 752.

115. Expression of a novel 3,5 - kb macrophage colonystimulating factor transcript in human myeloma cells / M. Nakamura, S. Merchav, A. Carter et al. // *J. Immunol*. - 1989. - Vol. 143. - P. 3543-3547.

116. Expression of membrane receptor for tumor necrosis factor on human blood lymphocytes / H. Zola et al. // *Immunol. Cell Biology*. - 1993. - Vol. 71. - P. 281-288.

117. Expression of multidrug resistant gene in human cancer / M.M. Gottesman, L.J. Goldstein, A. Fojo et al. // *Cancer Res*. - 1991. - Vol. 51. - P. 3486-3492.

118. Expression of P-glycoprotein in Human Placenta: Relation to genetic polymorphism of the Multidrug Resistance (MDR)-1 gene / M. Tanabe, I. Ieiri, N. Nagata et al. // *J. Pharm. Exper. Therapy*. - 2001. - Vol. 297. - P. 1137-1143.

119. Familial aggregation and heterogeneity of non-Hodgkin lymphoma in population-based samples / L.R. Goldin, O. Landgren, M.L. McMaster [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*. - 2005. - Vol. 14, № 10. - P. 2402-6.

120. Family history of hematopoietic malignancy and risk of lymphoma / E.T. Chang, K.E. Smedby, H. Hjalgrim [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst*. - 2005. - Vol. 97, № 19. - P. 1466-74.

121. Foos, T. M. The role of taurine in the central nervous system and

the modulation of intracellular calcium homeostasis / T. M. Foos, J. Y. Wu // *Neurochem Res.* - 2002. — Vol. 27, № 1-2. - P. 21-6.

122. Franceschi, S. Cancer epidemiology in the elderly / S. Franceschi, C. La Vecchia // *Crit. Rev. Oncol. Haematol.* - 2001. - Sep. — Vol 39 (3). - P. 219-26.

123. Frequence of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR 1 gene in wite subjects / Cascorbi I., Gerloff T., John A. et al. // *Clin. Pharmac. Ther.* - 2001. — Vol. 69 (3). - P. 169-174.

124. Fu Hua. Cancer mortality among shoe manufacturing workers: An analysis of two cohors / Fu Hua, Demers Paul A., Costantini Adele Seniori. et al. // *Accup. And Environ. Med.* - 1996. — Vol. 53, № 6. - P. 394-398.

125. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo / S. Hoffmeyer, O. Burk, O. von Richter et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* - 2000. — Vol. 97. - № 7. - P. 3473-8.

126. Functional significance of different human CYP1A1 genotypes / F. Crofts, E. Taioli, J. Trachman et al. // *Carcinogenesis.* - 1994. — Vol. 15. - P. 2961-2963.

127. Gahrton, G. Multiple mieloma / G. Gahrton, B.G.M. Durie. London etc. : Arnold. -1996. - 234 p.

128. Genetic metabolic polymorphisms and the risk of cancer, a review of the literature / A. d'Errico, E. Taioli, X. Chen, P. Vineis // *Biomarkers.* - 1996. -Vol. 1. - P.149.

129. Genetic Polymorphisms in the Tumor Necrosis Factor Locus Influence Non-Hodgkin's Lymphoma Outcome / K. Warzocha, P. Ribeiro, J. Bienvenu et al. // *Blood.* - 1998. - Vol. 91, № 10. - P. 3574-3581.

130. Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas / P. Soucek, J. Sarmanova, V. N. Kristensen et al. - Springer-Verlag, 2002 - P. 86-92.

131. Genetic variability in the TNF α promoter is not associated with type II diabetesmellitus (NIDDM) / A. Hamann, C. Mantzoros, A. Vidal-Puig et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1995. - Vol. 211. - P. 833.

132. Glutathione S-transferase enzyme expression in hematopoietic cell lines implies a differential protective role for T1 and A1 isoenzymes in erythroid and for M1 in lymphoid lineages / L. Wang, M.J. Groves, M.D. Hepburn et al. // *Haematologica*. – 2000. – Vol. 85. – P. 573–579.

133. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for oral leukoplakia in ethnic Indian betel quid/tobacco chewers / U. J. Nair, J. Nait, B. Mathew, H. Bartsch // *Carcinogenesis*. – 1999. – Vol. 20. – P. 743–748.

134. Gros, P. The mouse multidrug resistance gene family structure and functional analysis / P. Gros, E. Buschman // *Int. Rev. Cytol.* – 1993. – Vol. 137. – P. 169–197.

135. Hatagima, A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility / A. Hatagima // *Cad.Saude Publica, Rio de Janeiro*. – 2002. – Vol. 18, № 2. – P. 357–377.

136. Hayashi, S. I. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450 1A1 and mu-class glutathion S-transferase genes / S. I. Hayashi, J. Watanabe, K. Kawajiri // *Jpn. J. Cancer Res.* – 1992. – Vol. 8. – P. 866–870.

137. Hematological malignancies in the island of Sardinia, 1974–1993: age and sex distributions and temporal changes in incidence / G. Broccia, W. Deplano, P. Dessalvi [et al.] // *Hematol. Oncol.* – 2004. – Vol. 22, № 3. – P. 91–109.

138. Hematology. Basic Principles and Practice / R. Hoffman, E. B. Benz, S. J. Shattil, B. Furie. – 2nd ed. – 1995. – 323 p.

139. Hereditary differences in the expression of the human glutathion transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion / J. Seidegard, W. R. Vorachek, R. V. Pero, W. R. Pearson // *Proc. Natl. Sci. USA*. – 1988. – Vol. 85. – P. 7293–7297.

140. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus / C. O. Jacob, Z. Fronek, G. D. Lewis et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1990. – Vol. 87. – P. 1233–1237.

141. Herrinton L. Epidemiology of myeloma / L. Herrinton, N. S. Weiss, F. Olsan // *Myeloma biology and management* / J. S. Malpas, D. E. Bergsagel, R. A. Kyle et al. – Oxford med. publ., 1995. – P. 127–168.

142. High frequency of glutathion-S-transferase mu1 (GSTM1) null genotype in Brazilian patients with advanced multiple myeloma / M. M. Ortega, H. Nascimento, M. B. Melo et al. // International workshop on chronic lymphocytic leukemia. - 1999. - Abstr. 4960.

143. High incidence of translocations t (11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies / H. Avet-Loiseau, J. Y. Li, T. Facon et al. // Cancer Res.- 1998. - Vol. 58. - P. 5640-5645.

144. Higher frequency of Glutathion S—transferase deletions in black Children with acute lymphoblastic leukemia / Ch. L. Chen, Q. Liu, Ch. H. Pui et al. // Blood. - 1997. - Vol. 89, № 5. - P. 1701-1707.

145. High-Producer Haplotyper of Tumor Necrosis Factor Alpha and Lymphotoxin Alpha Are Associated With an Increased Risk of Myeloma and Have an Improved Progression-Free Survival After Treatment / F. E. Davies, S. J. Rollinson, A. C. Rawstron et al. // J. Clin. Oncol. - 2000. - Vol. 18. - P. 2843-2851.

146. Hussein, M.A. Multiple mueloma: present and future / M.A. Hussein, J.V. Juturi, I. Lieberman // Curr. Opin Oncol. - 2002. - Jan. - Vol. 14 (1). - P. 31-35.

147. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene / K. Kawajiri, K. Nakachi, K. Imai et al. // FEBS Lett. - 1990. - Vol. 263. - P. 131-133.

148. IL-13 has only a subset of IL-4 like activities on B chronic lymphocytic leukaemia cells / A. C. Fluckiger, F. Briere, G. Zurawski et al. // Immunology. - 1994. - Vol. 83, № 3. - P. 397-403.

149. Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme mu / G. Van Poppel, N. de Vogel, P. J. van Bladeren, F. J. Kok / Carcinogenesis. - 1992. - Vol. 13. - P. 303-305.

150. Increased drug accumulation ex vivo with cyclosporin in chronic lymphatic leukemia and its relationship to epitope masking of P-glycoprotein / P.M. Cumber, A. Jacobs, T. Hoy et al. // Leukemia. - 1991. - Vol. 5, № 12. -P. 1050-3.

151. Induced heteroduplex genotyping of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 polymorphisms associated with transcriptional regulation / H. R. Morse, O. O. Olomolaiye, N. A. P. Wood et al. // Cytokine. - 1999. - Vol. 11, № 10. - P. 789-795.

152. Indulski, J. A. Metabolic genotype in relation to individual susceptibility to environmental carcinogens / J. A. Indulski, W. Lutz // *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* - 2000. - Vol. 73. - P. 71-85.

153. Influence of TNF α and LT α single nucleotide polymorphisms on susceptibility to and prognosis in cutaneous malignant melanoma in the British population / W.M. Howell, S.J. Turner, A. Collins et al. // *Eur. J. Immunogenetics.* - 2002. - Vol. 29. - № 1. - P. 17-23.

154. Inhibition of SCF-induced proliferation of primitive murine hematopoietic progenitor cells signaled through the 75-kda TNF-receptor / T. W. Jacobsen et al. // *The j. of Immunol.* - 1995. - Vol. 154. - № 8. - P. 3732.

155. Interleukin 6 is essential for antibody secretion by human in vivo antigen-induced lymphoblastoid B cells / J. A. Brieva, R. A. Martin, O. Martinez-Maza et al. // *Cell Immunol.* - 1990. - Vol. 130, № 2. - P. 303-310.

156. Interleukin-6 and the prognosis of abdominal aortic aneurisms / K. G. Jones, D. J. Brull, L. C. Brown et al. // *Circulation.* - 2001. -Vol. 103. - P. 2260.

157. Interleukin-6 in human multiple myeloma / B. Klein, X. G. Zhang, Z. Y. Lu, R. Bataille // *Blood.* - 1995. - Vol. 85. - P.863.

158. Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumor necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukemia / J. E. Reittie, K. L. Yong, P. Panayiotidis, A. V. Hoffbrand // *Leuk.Lymphoma.* - 1996. - Vol. 22, № 1-2. - P. 83-90.

159. Interleukin-6 inhibits fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells / B. D. Chauhan, S. Kharbanda, A. Ogata et al. // *Blood.* - 1997. - Vol. 89, №1. - P. 227-234.

160. Interleukin-6 level in serum and ascites as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer / M. Plante, S. C. Rubin, G. Y. Wong et al. // *Cancer.* - 1994. -Vol. 73. - P. 1882-1888.

161. Interleukin-6, tumor necrosis factor α and lymphotoxin polymorphisms in monoclonal gammopathy of uncertain significance and multiple myeloma / A. M. Dring, F. E. Davies, S. J. Rollinsston et al. // *Br. J. Haematol.* - 2001. - Vol. 112. - P. 248-253.

162. Interleukin-6, tumor necrosis factor α , interleukin 1B and interleukin-1 receptor antagonist promoter or coding gene polymorphisms

in multiple myeloma / Ch.Y. Zheng, D.R. Huang, S. Bergenbrant et al. // Br. J. Haematol. - 2000. - Vol. 109. - P. 39-48.

163. International Myeloma Foundation. Concise Review. - USA Edition, 2003. -34p.

164. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma / Y. Tsujimoto, J. Cossman, E. Jaffe et al. // Science. – 1985. - Vol. 228. - P. 1440.

165. Joy, Ho P. Chromosomal and genetic abnormalities in myeloma / Ho P. Joy. // Clin. Lab. Haematol. - 2002. – Vol. 24, № 5. – P. 259-269.

166. Juranka, P. F. P-glicoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. / P. F. Juranka, L. Zastawnly, V. Ling // FASEB Journal. - 1989. – Vol. 3. – P. 2583-2592.

167. Kerber, R.A. A cohort study of cancer risk in relation to family histories of cancer in the Utah population database / R. A. Kerber, E. O'Brien // Cancer. – 2005. – Vol. 103, № 9. – P. 1906-15.

168. Kerr, J. F. R. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy / J.F.R. Kerr, C.M. Winterford, B.V. Harman // Cancer. -1993.- Vol.73. -P.2013-2026.

169. Khuder S.A. Meta-analyses of multiple myeloma and farming / S. A. Khuder, A. B. Mutgi // Amer .J. Ind. Med. – 1997. - Vol 5. – P. 510-516.

170. Kihara, M. Lung cancer risk of the GSTM1 null genotype is enhanced in the presence of the GSTP1 mutated genotype in male Japanese smokers / M. Kihara, M. Kihara, K. Noda // Cancer Lett .-1999. -Vol. 137, № 1. - P. 53 - 60.

171. Lauta, V. M. A review of the cytokine network in multiple myeloma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications / V. M. Lauta // Cancer. - 2003. – Vol. 97. - № 10. – P. 2440-52.

172. Ligand binding to FCgR induces c-myc-dependent apoptosis in IL-2 stimulated NK-cells / L. Azzoni, I. Anegon, B. Calabretta, B. Perussia // J. Immunol. – 1995. - Vol. 154. – № 2. - P. 491-9.

173. Ling, V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. / V. Ling, J. A. Endicott // Annu. Rev. Biochem. - 1989. – Vol. 58. - P. 137-171.

174. Long-term Follow up with conventional cytogenetics and b and 13q14 interphase/metaphase in situ hybridization monitoring in

monoclonal gammopathies of undetermined significance / P. Bernasconi, P. M. Cavigliano, M. Boni et al. // *Br. J. Haematol.* - 2002. - Vol. 118. - № 2. - P. 545-9.

175. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA / Mathew C.C. // *Methods in Molecular Biology* / Ed. J.M. Walker. - N.Y., London : Human Press, 1984. - Vol. 2. - P. 31-34.

176. MDR 1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 significantly influenced by ethnicity / M. M. Ameyaw, F. Regateiro, T. Li et al. // *Pharmacogenetics.* - 2001. - Vol. 11, № 3. - P. 217-221.

177. Meier C. Polyneuropathy in paraproteinaemia / C. Meier // *J. Neurol.* - 1985. - Vol. 232. - P. 204-214.

178. Messer, G. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: An NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production / G. Messer, U. Spengler, M. C. Jung // *J. Exp. Med.* - 1991. - Vol. 173. - P. 209-211.

179. Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility / G. Smith, L. A. Stanley, E. Sim et al. // *Cancer Surv.* - 1995. - Vol. 25. - P. 27-65.

180. Meyer, U. A. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism / U. A. Meyer, U. M. Zanger // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 1997. - Vol. 37. - P. 269-296.

181. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of indolent chronic lymphocytic leucemia are present in 3,5 % of adults with normal blood counts / A. Rawstron, M. J. Green, A. Kuzmicki [et al.] // *Blood.* - 2002. - Vol. 100. - P. 635-9.

182. Multiple Myeloma / W.S. Dalton, P.L. Bergsagel, W.M. Kuehl et al. // *Hematology (Am Soc Hematol. Educ Program)* - 2001. - P. 157-177.

183. Myeloma and the t (11; 14) (q13; q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients / R. Fonseca, E. A. Blood, M. M. Oken et al. // *Blood.* - 2002. Vol. 99, № 10. - P. 3735-41.

184. Multiple myeloma: an immunoclinical study of disease and response to treatment / P. W. Thavasu, R. K. Ganjoo, S. A. Maidment et al. // *Haematol. Oncol.* - 1995. - Vol. 91. - P. 69-82.

185. N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias / P. Corradini, M. Ladetto, G. Inghirami et al. // *Leuk. Lymphoma.* - 1994. - Vol. 15. - P. 17-20.

186. Nebert, D. W. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: What is their clinical relevance and Why do they exist? / D. W. Nebert // *Am. J. Hum. Genet.* - 1997. - Vol. 60. - P. 265-271.

187. New Untersuchung zum Zusammenhang zwischen Benzol-Exposition und Leukämie // *Endol. - Erdgas -Kohle.* - 1996. - Vol. 112, №3. - S. 96.

188. Occupation and risk of non-Hodgkins lymphoma and chronic lymphocytic leukemia / T. Zeng, A. Blair, Y. Zhang [et al.] // *J. Occup. Environ. Med.* - 2002. - Vol. 44, № 5. - P. 469-74.

189. P53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis / I. Cordone, S. Masi, F.R. Mauro et al. // *Blood.* - 1998. - Vol. 91. - P. 4342-4349.

190. Partanen R. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in patients who have asbestosis and develop cancer / R. Partanen, H. Koskinen, K. Hemminki // *Occup. Environ. Med.* -1995. -Vol. 52. - P. 316.

191. Patterns of autoimmunity and subsequent chronic lymphocytic leukemia in Nordic countries / O. Landgren, E. A. Engels, N. E. Caporaso [et al.] // *Blood.* - 2006. - Vol. 108, № 1. - P. 292-296.

192. Pearce Neil, Reif John S. // Epidemiologic studies of cancer in agricultural workers / *Amer. J. Ind. Med.* - 1990. - Vol. 18, № 2. - P. 133-148.

193. Polymorphism in the tumor necrosis factor- α promotor region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumours / L. Chouchane, S. Ben Ahmed, S. Baccouche, S. Remadi // *Cancer.* - 1997. - Vol. 80. - P. 1489.

194. Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects / M. Tanabe, S. Ito, I. Ieiri et al. // *Pharmacogenetics.* - 2001. - Vol. 11, № 2. - P. 175-84.

195. Polymorphism of the CYP1A1 and glutathione-S-transferase gene in Korean lung cancer patients / Y.S. Hong, J.H. Chang, O.J. Kwon et al. // *Exp. Mol. Med.* - 1998. - Vol. 30, № 4. - P. 192 - 198.

196. Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia / J. Demeter, T.F. Porzol, S. Ramisch et al. // *Br. J. Haematol.* - 1997. - Vol. 97. - P. 107.

197. Polymorphisms at CYP and GST gene loci / S. Buch, A. Kotekar,

D. Kawle, R. Bhisey // Eur. J. Clin. Pharmacol. - 2001. – Vol. 57. - P. 553-555.

198. Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter predict for outcome after thalidomide therapy in relapsed and refractory multiple myeloma / K. Neben, J. Mytilineos, T.M. Moehler et al. // Blood. - 2002. - Vol. 100. - P. 2263-2265.

199. Pratt, G. Molecular aspects of multiple myeloma / G. Pratt // Mol. Pathol. -2002. - Vol. 55, № 5. – P. 273-8.

200. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? / V. R. Arruda, C. E. Grignolli, M. S. Goncalves et al. // Clin. Genet. - 1998. - Vol. 54, № 3. - P. 210 - 214.

201. Production of interleukin-1 by bone marrow myeloma cells / F. Cozzolino, M. Torcia, D. Aldinucci et al. //Blood. - 1989. - Vol. 74. - P. 380-387.

202. Rai, K. R. Haematology / K. R. Rai, D. V. Patel. - N.Y., London, 1997. - P. 1308-1322.

203. Rawstron, A. Clonal lymphocytes in persons without known chronic lymphocytic leukemia (CLL): implications of recent findings in family members of CLL patients / A. Rawstron, P. Hillmen, R. Houlston // Semin. Hematol. – 2004. - Vol. 41, № 3. - P. 192-200.

204. Ray, A. On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion / A. Ray, K. S. La Forge, P. B. Sehgal // Mol. Cell.Biol. - 1990. - Vol. 10. - P. 5736-5746.

205. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy / P. Moreau, T. Facon, X. Leleu et al. // Blood. - 2002. - Vol. 100, № 5. – P. 1579-83.

206. Regular use of hair dyes and risk of lymphoma in Spain / Y. Benavente, N. Garcia, E. Domingo-Domenech [et al.] // Int. J. Epidemiol. – 2005. – Vol. 34, № 5. – P. 1118-22.

207. Sallah, S. Future Development of Lymphoproliferative Disorders in Patients with Autoimmune Hemolytic Anemia / S. Sallah, J. Y. Wan, L. R. Hanrahan // Clin. Cancer Res. - 2001. - Vol. 7. – P. 791-794.

208. Salles, G. Elevated circulating levels of TNF α and its p55 soluble receptor are associated with an adverse prognosis in lymphoma patients / G. Salles, J. Bienvenu, Y. Bastion // *Br. J. Hematol.* - 1996. - Vol. 93. - P. 352.

209. Second analysis of mortality of nuclear industry workers in Japan, 1986-1997 / Iwasaki T., Murata M., Ohshima S. et al. // *Radiat. Res.* - 2003. - Feb. - 159 (2). - P. 228-238.

210. Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer / J. S. Berek, C. Chung, K. Kaldi et al. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* - 1991. - Vol. 164. - P. 1038-1043.

211. Serum levels of interleukin-6 in multiple myeloma and other hematological disorders: correlation with disease activity and other prognostic parameters / D. M. Nachbaur, M. Herold, A. Maneschg et al. // *Ann. Hematol.* - 1991. - Vol. 62. - P. 54.

212. Serum levels of tumor necrosis factor (TNF), soluble receptors for TNF (55 and 75 kDa sTNFr), and soluble CD14 (sCD14) in epithelial ovarian cancer / A. Gadducci M., Fereghini, C. Castellani et al. // *Gynecol. Oncol.* - 1995. - Vol. 58. - P. 184.

213. Does benzene cause multiple myeloma? An analysis of the published case-control literature / Bezabeh Shewit, Engel Arnold, Morris Carolyn B., Lamm Steven H. // *Environ. Health Perspect.* - 1996. - P. 1393-1398.

214. Simon, S. M. Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. / S. M. Simon, M. Schindler // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1994. - Vol. 91. - P. 3497-3504.

215. Speer, S. A. Risk factors for acute myeloid leukemia and multiple myeloma: a combination of GIS and case-control studies / S. A. Speer, J. C. Semenza, T. Kurosaki, H. Anton-Culver // *J. Environ. Health.* - 2002. - Mar. - Vol. 64 (7). - P. 9-16.

216. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors / D. R. Bertolini, G. E. Nedwin, T. S. Bringman et al. // *Nature.* - 1986. - Vol. 319. - P. 516-518.

217. The -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter / F. Stuber, I. A. Udalova, M. Book et al. // *J. Inflamm.* - 1995/96. - Vol. 46, № 1. - P. 42-50.

218. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia / A. Redaelli, B.L. Laskin, J.M. Stephens [et al.] // *Eur. J. Cancer Care (Engl.)*. – 2004. – Vol. 13, № 3. – P. 279-87.

219. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 on IL-6 transcription and plasma levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis / D. Fishman, G. Faulds, R. Jeffery et al. // *J. Clin. Invest.* - 1998. - Vol. 102. - P. 1369–1376.

220. The Incidence and distribution of leukemia and lymphoma within Northern Ireland in the period 1989-1993 / Mc Nally R. J. Q., Cartwright R. A., Staines A. et al. // *Ulster Med. J.* – 1996. – Vol. 1. - P. 19-31

221. The tumor necrosis factor ligand-receptor system can predict treatment outcome in lymphoma patients / K. Warzocha, G. Salles, J. Bienvenu et al. // *J. Clin. Oncol.* - 1997. - Vol. 15. - P. 499.

222. Tobacco use, body mass index and the risk of malignant lymphomas--a nationwide cohort study in Sweden / P. Fernberg, A. Odenbro, R. Bellocco [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 118, № 9. – P. 2298-302.

223. Tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS) - stimulated whole blood cell culture in healthy humans / E. Louis, D. Franchimont, A. Piron et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 1998. – Vol. 113. – P. 401–406.

224. Tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genetic polymorphisms and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study of patients treated with BFM therapy / M. Stanulla, A. Schrauder, K. Welte, M. Schrappe // *BMC Blood Disorders.* – 2001. – Vol. 1. – P. 2.

225. Tumor necrosis factor as an autocrine tumor growth factor for chronic B-cell malignancies / F. T. Cordingley, A. Bianchi, A. V. Hoffbrand et al. // *Lancet.* – 1988. – Vol. 1. – P. 969-971.

226. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism and decreased insulin resistance / C. P. Day, J. Grove, A. K. Daly et al. // *Diabetologia.* – 1998. – Vol. 41. – P. 430–434.

227. Wiklund, K. Cancer risks among agricultural workers in Sweden / K. Wiklund. – Stockholm: Department of Cancer Epidemiology, Radium hemmet, Karolinska Hhsospital. - 1986. – 150 p.

228. Wong, O. Myelome multiple et exposition au benzene dans

une cohorte multinationale de plus de 250000 employés de l'industrie pétrolière / O. Wong, G. K. Raabe // *Energy*. – 1998. – Vol. 3. – P. 379-380

229. Zablotska, L. B. J Analysis of mortality among Canadian nuclear power industry workers after chronic low-dose exposure to ionizing radiation / L.B. Zablotska, J. P. Ashmore, G. R. Howe // *Radiat. Res.* – 2004. – Vol. 161, № 6. – P. 633-41.

230. Zhong, S. Chromosomal assignment and linkage analysis of the human glutathione S-transferase mu-gene (GSTM1) using intron specific polymerase chain reaction / S. Zhong, C. R. Wolf, N. K. Spurr // *Hum. Genet.* – 1992. – Vol. 90. – P. 435–439.