Исследование ассоциации полиморфных вариантов генов *IL8* и *IL10* с риском развития рака желудка

А. Х. Нургалиева[1*], Л. Ф. Юсупова[1], Э. К. Хуснутдинова[1,2]

[1]*Башкирский государственный университет*
Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

[2]*Институт биохимии и генетики УНЦ РАН*
Россия, Республика Башкортостан, 450075 г. Уфа, проспект Октября, 71.

**Email: alfiyakh83@gmail.com*

Проведено ассоциативное исследование полиморфных вариантов генов цитокинов интерлейкина-8 *IL8* (*rs4073*) и интерлейкина-10 *IL10* (*rs1800872*) у больных раком желудка и здоровых доноров из РБ. Выявлены ассоциации полиморфного варианта rs1800872 гена *IL10* с риском развития РЖ в этнических группах русских и татар.

Ключевые слова: рак желудка, гены цитокинов, полиморфный вариант, ассоциация.

Рак желудка (РЖ) – это злокачественная опухоль слизистой оболочки желудка человека, характеризующийся высоким метастатическим потенциалом и плохим прогнозом. Это заболевание многофакторное, в основе которого лежит наследственная предрасположенность. РЖ является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний, занимает четвертое место по частоте в мире среди злокачественных новообразований и второе место в ряду причин смертности от онкопатологии [1]. Около 5–10% случаев рака желудка имеет семейную историю. Молекулярной причиной предрасположенности к РЖ с высоким риском (70–83%) являются наследуемые мутации в ряде генов. Специфическим геном-супрессором семейного РЖ считают ген *CDH1*. Частота мутаций в этом гене варьирует от 0 до 10% от всех случаев семейного рака желудка в зависимости от этнической принадлежности изучаемой выборки [2]. Кроме этого известно, что большой вклад в патогенез злокачественных новообразований желудка вносят инфекция *Helicobacter pylori*, культурно-бытовые условия и диетические факторы [3]. Обнаружение других генов, ответственных за наследственную предрасположенность к раку желудка, создаст новые возможности для диагностики и профилактики при этом заболевании.

Хроническое воспаление при РЖ развивается в связи с нарушением защитных механизмов слизистой оболочки желудка и регуляции иммунных реакций цитокинами. Проведенные исследования отмечают устойчивый рост уровня провоспалительного цитокина интерлейкина-8 (*IL8*) при злокачественных новообразованиях желудка [4]. Также имеются данные о том, что при повреждении слизистой оболочки желудка,

наблюдается дефицит противовоспалительного цитокина интерлейкина-10 (*IL10*) [5]. Полиморфные варианты генов, кодирующих белки-иммуномедиаторы, могут определять вариабельность их структуры и экспрессии и, как следствие, реактивность иммунного ответа организма. В этой связи представляется актуальным исследование полиморфизма генов ключевых про- и противовоспалительных цитокинов для определения их роли в развитии РЖ.

Целью данной работы явилось изучение ассоциации полиморфных вариантов генов интерлейкина-8 *IL8* (*rs4073*) и интерелейкина-10 *IL10* (*rs1800872*) с РЖ в Республике Башкортостан (РБ).

Материалом для исследования послужили образцы ДНК больных РЖ и здоровых доноров в возрасте 18–80 лет, проживающих в г.Уфа РБ. Группу больных составили 221 человек различной этнической принадлежности (100 русских, 97татарина, 19 башкир и 5 метисов), находящихся на лечении в Республиканском онкологическом диспансере г.Уфы. В качестве контроля исследована группа здоровых доноров без каких-либо признаков заболеваний желудочно-кишечного тракта, состоящая из 277 человек различной этнической принадлежности (134 русских, 100 татар, 31 башкир и 12 метисов). Распределение по половому признаку среди больных было следующим: мужчин – 125, женщин – 96, среди индивидов контрольной группы: мужчин – 203, женщин – 74.

Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [6]. Амплификацию исследованных локусов ДНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на амплификаторе «GeneAmp PCR System 2720» производства компании «Applied Biosystems» (США). Определение нуклеотидных замен проводили методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ). Перечень исследованных локусов, последовательности праймеров, размеры амплифицируемых фрагментов, названия рестриктаз представлены в таблице 1 (Табл.1) [7, 8].

Таблица 1. Полиморфные варианты, последовательности праймеров, номенклатура аллелей анализируемых ДНК-локусов

Ген	Полиморфный вариант, dbSNP	Праймеры, 5’ – 3’	Рестриктаза, аллели (размер фрагментов)
IL8 4q13-q21	-251T>A rs4073	TTGGCTGGCTTATCTTCACC GAGGAAATTCCACGATTTGC	MfeI T – 350 п.н. A – 183+167 п.н.
IL10 1q31-q32	-627C>A rs1800872	CCTAGGTCACAGTGACGTGG GGTGAGCACTACCTGACTAGC	RsaI A – 236+176 C – 412

Результаты ПДРФ-анализа оценивали методом электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете. Статистическую обработку результатов исследования проводили с применением программного обеспечения MS Office Excel. При попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля применялся критерий χ^2 для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йейтса на непрерывность (http://www.biometrica.tomsk.ru/). При обнаружении статистически значимых различий ($p<0.05$) между исследуемыми выборками проводилась оценка показателя отношения шансов (odds ratio, OR), а также границ его 95% доверительного интервала (CI 95%) [9].

Интерлейкин-8 (хемотаксический фактор Т-клеток и фактор, активирующий нейтрофилы) является одним из важнейших провоспалительных цитокинов, играет ведущую роль в механизме воспалительного ответа на инфицирование *H.pylori* и считается одним из главных генов-кандидатов развития язвенной болезни и рака желудка [10]. На хромосоме 4 (4q12-q21) картирован кодирующий данный цитокин ген *IL8* [11], в промоторной области его расположен полиморфный локус –251T>A (rs4073), изучению которого уделяется пристальное внимание во всем мире, однако результаты исследований весьма противоречивы. Так в Бразилии было показано, что рисковым для развитии РЖ является генотип rs4073*A/T, а гомозиготный генотип rs4073*A/A выполняет протективную функцию, в то время как в популяции Польши не было обнаружено ассоциации данного полиморфизма с риском развития заболевания [12, 13].

В настоящей работе проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов однонуклеотидной замены rs4073 гена *IL8* у больных РЖ и здоровых доноров из РБ, результаты которого представлены в таблице 2.

С более высокой частотой во всех исследованных группах встречались аллель rs4073*T (на 48.72–61.11% хромосом в выборках больных различных этносов и на 52.04–62.90% хромосом – в соответствующих контрольных группах) и гетерозиготный генотип rs4073*T/A, среди пациентов носителями данного генотипа являлись 51.25–77.78% человек, среди здоровых доноров – 44.90–57.03%.

Разделение выборок на подгруппы в зависимости от этнической принадлежности и пола не выявило ассоциаций описываемого ДНК-локуса с риском развития ЯБ. Показано, что у татар и башкир гетерозиготный генотип rs4073*T/A гораздо чаще встречается в группе больных РЖ, чем у здоровых доноров, однако различия не достигли уровня статистической значимости ($p>0.05$).

Интерлейкин-10 обладает способностью ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов, путем угнетения Th1-лимфоцитов и стимулирования В-лимфоцитов и Th2-лимфоцитов, таким образом данный цитокин выполняет противовоспалительные

функции [14]. В нашем исследовании на выборках из РБ проведен анализ полиморфного варианта –627C>A (rs1800872) гена *IL10* (Табл.3).

Таблица 2. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *-251T>A* гена *IL8* у больных РЖ и здоровых доноров

		Генотипы			Аллели		N
		TT	*TA*	*AA*	*T*	*A*	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Больные РЖ	Русские	21 (26.25%)	41 (51.25%)	18 (22.50%)	83 (51.88%)	77 (48.13%)	80
	Татары	16 (20.51%)	44 (56.41%)	18 (23.08%)	76 (48.72%)	80 (51.28%)	78
	Башкиры	4 (22.22%)	14 (77.78%)	0 (0.00%)	22 (61.11%)	14 (38.89%)	18
	Мужчины	26 (25.24%)	51 (49.51%)	26 (25.24%)	103 (50.00%)	103(50.00%)	103
	Женщины	17 (21.79%)	50 (64.10%)	11 (14.10%)	84 (53.85%)	72 (46.15%)	78
	В целом	43 (23.76%)	101 (55.80%)	37 (20.44%)	187 (51.66%)	175(48.34%)	181
Контроль	Русские	33 (27.27)	69 (57.03)	19 (15.70)	135 (55.79)	107 (44.21)	121
	Татары	29 (29.59)	44 (44.90)	25 (25.51)	102 (52.04)	94 (47.96)	98
	Башкиры	11 (35.48)	17 (54.84)	3 (9.68)	39 (62.90)	23 (37.10)	31
	Мужчины	65 (32.66)	96 (48.24)	38 (19.10)	226 (56.78)	172 (43.22)	199
	Женщины	12 (18.75)	39 (60.94)	13 (20.31)	63 (49.22)	65 (50.78)	64
	В целом	77 (29.28)	135 (51.33)	51 (19.39)	289 (54.94)	237 (45.06)	263

Более распространенным оказался аллель rs1800872*C, выявленный на 63.16–81.00% хромосом у пациентов в различных этнических группах и на 64.89–75.00% хромосом – в контроле. Гомозиготный по частому аллелю генотип rs1800872*C/C и гетерозиготный генотип rs1800872*C/A встречались с примерно одинаковой частотой, гомозиготный по редкому аллею генотип rs1800872*A/A встречался редко, в целом среди больных распространенность его составила 1.00–10.53%, среди здоровых индивидов – 4.17–12.77%.

При разделении испытуемых на подгруппы согласно их этнической принадлежности установлены достоверные различия между контрольными группами русских, татар и башкир в распределении частот аллелей и генотипов ($p<0.05$). Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs1800872 между больными ЯБ и здоровыми индивидами согласно их этнической принадлежности выявил статистически достоверные различия у русских и татар. Для лиц русской этической принадлежности показано, что аллель rs1800872*C и образованный им гомози-

готный генотип rs1800872*C/C являются маркерами повышенного риска развития рака желудка (χ^2=12.13, p=0.0004; OR=2.23 и χ^2=11.01, p=0.0009; OR=2.59, соответственно), а аллель rs1800872*A, генотипы rs1800872*A/C и rs1800872*A/A – маркерами пониженного риска развития заболевания (χ^2=12.13, p=0.0004; OR=0.45; χ^2=4.81, p=0.02; OR=0.52 и χ^2=4.67, p=0.02; OR=0.11, соответственно). В 2013 г. Ding Qi с соавторами провели мета-анализ ассоциации полиморфного локуса rs1800872 с различными видами рака и смогли выяснить, что генотип rs1800872*A/A уменьшает риск возникновения многих типов онкопатологии. Интересно, что для представителей татарской этнической группы установлена противоположная закономерность: маркерами повышенного риска развития РЖ являются аллель rs1800872*A и генотип rs1800872*A/C (χ^2=9.57, p=0.002; OR=1.99; и χ^2=4.81, p=0.03; OR=1.89, соответственно), а аллель rs1800872*C и генотип rs1800872*C/C – маркерами пониженного риска РЖ (χ^2=9.57, p=0.002; OR=0.50; и χ^2=9.25, p=0.002; OR=0.42, соответственно).

Таблица 3. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *-627C>A* гена *IL10* у больных ЯБ и здоровых доноров

		Генотипы			Аллели		N
		CC	*CA*	*AA*	*C*	*A*	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Больные РЖ	Русские	63 (63.00%)	36 (36.00%)	1 (1.00%)	162(81.00%)	38 (19.00%)	100
	Татары	37 (38.14%)	52 (53.61%)	8 (8.25%)	126(64.95%)	68 (35.05%)	97
	Башкиры	7 (36.84%)	10 (52.63%)	2 (10.53%)	24 (63.16%)	14 (36.84%)	19
	Мужчины	65 (52.00%)	55 (44.00%)	5 (4.00%)	185(74.00%)	65 (26.00%)	125
	Женщины	46 (47.92%)	44 (45.83%)	6 (6.25%)	136(70.83%)	56 (29.17%)	96
	В целом	111(50.23%)	99 (44.80%)	11 (4.98%)	321(72.62%)	121(27.38%)	221
Контроль	Русские	67 (55.83)	46 (38.34)	7 (5.83)	180 (75.00)	60 (25.00)	120
	Татары	40 (42.55)	42 (44.68)	12 (12.77)	122 (64.89)	66 (35.11)	94
	Башкиры	13 (54.17)	10 (41.66)	1 (4.17)	36 (75.00)	12 (25.00)	24
	Мужчины	90 (51.14)	72 (40.91)	14 (7.95)	252 (71.60)	100 (28.40)	176
	Женщины	38 (52.05)	29 (39.73)	6 (8.22)	105 (71.92)	41 (28.08)	73
	В целом	128 (51.41)	101 (40.56)	20 (8.03)	357 (71.69)	141 (28.31)	249

Таким образом, проведено ассоциативное исследование полиморфных вариантов двух генов цитокинов у больных раком желудка и здоровых доноров из РБ. Выявлены ассоциации полиморфного варианта rs1800872 гена *IL10* с риском развития РЖ в этнических группах русских и татар.

Литература

1. Gonzalez C. A., Sala N., Roklcas T. Gastric cancer: epidemiologic aspects // Helicobacter. 2013. – V. 18. – №. S1.- P. 34–38.
2. Brooks-Wilson A. R. et al. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria // Journal of medical genetics. 2004. – V. 41. – №. 7.- P. 508–517.
3. Adamsson J et al. Immune Responses Against Helicobacter pylori in Gastric Cancer Patients and in Risk Groups for Gastric Cancer // Helicobacter. -2013.-18 (1). – P.73–820.
4. De Oliveira J. G. et al. Influence of functional polymorphisms in TNF-α, IL-8, IL-10 cytokine genes on mRNA expression levels and risk of gastric cancer //Tumor Biology. – 2015.- V.36. – №12.P-9159–9170.
5. Pan F. et al. Association of IL-10–1082 promoter polymorphism with susceptibility to gastric cancer: evidence from 22 case–control studies //Molecular biology reports. – 2012. – V. 39. – №. 6. – P. 7143–7154.
6. Mathew C. C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // Methods in molecular biology. 1984. – V.2.- P.31–34.
7. Hull J., Ackerman H., Isles K. et al. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus // Am. J. Hum. Genet. – 2001. V. 69. P. 413–419.
8. Hang L. W., Hsia T. C., Chen W. C., et al. Interleukin-10 gene -627 allele variants, not interleukin-I beta gene and receptor antagonist gene polymorphisms, are associated with atopic bronchial asthma // J Clin Lab Anal. 2003. V.17. №5. P. 168–173.
9. Schlesselman J. Case-Control Studies: Design, Conduct, Analysis: New York, Oxford: Oxford University Press. – 1982. – P.58–96
10. Yin Y-W., Hu A-M., Sun Q-Q. et. al. Association between interleukin-8 gene -251T/A polymorphism and the risk of peptic ulcer disease: A meta-analysis // Hum.Immunol. 2013. V.74. P.125–130.
11. Modi W. S., Dean M., Seuanez H. N. et al. Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily // Hum. Genet., 1990. V.84. P. 185–187.
12. Felipe A. V. et al. lnterleukin-8 gene polymorphism and susceptibility to gastric cancer in a Brazilian population //Biological research. – 2012. – V. 45. – №. 4. – P. 369–374.
13. Savage S. A. et al. Interleukin-8 polymorphisms are not associated with gastric cancer risk in a Polish population //Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. – 2006. – V. 15. – №. 3. – P. 589–591.
14. Ouyang W. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease //Annual review of immunology. – 2011. – V. 29. – P. 71–109.

15. Ding Q. et al. The interleukin-10 promoter polymorphism rs1800872 (-592C> A), contributes to cancer susceptibility: meta-analysis of 16 785 cases and 19 713 controls //PloS one. – 2013. – V 8. – №. 2. – P. e57246.

Статья рекомендована к печати кафедрой генетики и фундаментальной медицины БашГУ
(д.б.н., проф.Э. К Хуснутдиновой)

Association study of *IL8* and *IL10* genes polymorphisms in gastric cancer development

A. Kh. Nurgalieva[1]*, L. F. Yusupova[1], E. K. Khusnutdinova[1,2]

[1]*Bashkir State University*
32 Zaki Validi Street, 450074 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

[2]*Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences*
71 Prospekt Oktyabrya, 450075 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

**Email: alfiyakh83@gmail.com*

An associative study of cytokine gene polymorphisms of interleukin-8 *IL8* (rs4073) and interleukin-10 *IL10* (rs1800872) in gastric cancer patients and healthy donors from the Bashkortostan Republic. There were been found associations of a polymorphic variant rs1800872 of *IL10* gene with the risk of gastric cancer in Russians and Tatars.

Keywords: gastric cancer, cytokine genes, polymorphisms, association.