**Ассоциации антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону с полиморфными вариантами генов цитокинов у женщин в постменопаузе**

**Введение**

В экспериментах по иммунизации животных конъюгатами полициклических ароматических углеводородов или стероидных гормонов с макроносителями показано образование гаптен-специфических антител и модуляция биологических эффектов этих химических соединений [6, 7, 8, 10, 11]. В естественных условиях у человека индукторами специфических антител могут быть аддукты метаболитов указанных веществ с ДНК [5, 14, 15]. Были обнаружены ассоциации антител, специфичных к бензо[а]пирену (Вр), эстрадиолу (Es) и прогестерону (Pg) с раком молочной железы (РМЖ) у женщин в постменопаузе [1, 9].

С другой стороны, некоторыми исследователями обнаружены ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов с РМЖ [12, 13].

Учитывая общеизвестное влияние цитокинов на антителогенез, предоставляется целесообразным изучить взаимосвязи уровней антител к химическим канцерогенам и стероидным гормонам с генетическим полиморфизмом цитокинов и особенности таких взаимосвязей при онкологических заболеваниях.

Цель настоящей работы – выявить предполагаемые ассоциации уровней антител, специфичных к Bp, Es и Pg, с вариантами генов цитокинов *IL1RN* (rs4251961)*, IL1B* (rs16944)*, IL6* (rs1800795, rs1800796, rs1554606), *IL8* (rs4073)*, TNFA* (rs1800629), и гена поверхностного рецептора В-лимфоцитов *CD40* (rs6074022) у здоровых женщин и больных РМЖ в постменопаузе.

**Материалы и методы**

В обследовании приняли участие 1465 женщин в постменопаузе. Из них – 995 с диагнозом инвазивная карцинома молочной железы, которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз РМЖ в каждом случае был подтвержден гистологически. У большинства женщин была выявлена I и II стадии заболевания (37,3% и 43,6%), III и IV стадии составили 18,2% и 0,9% соответственно. Медиана возраста женщин в исследуемой группе – 63 года (интерквартильный размах 58-69).

В группу сравнения были включены 470 условно здоровых женщин, проживающих на территории Кемеровской области, и доноры Кемеровского центра крови, без патологии молочной железы. Медиана возраста женщин в группе сравнения – 57 лет (интерквартильный размах 53-61).

Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинской декларацией 1975 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Все женщины, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем. Образцы сыворотки крови обследуемых забирались в аликвоты и хранились при -70ºС.

Исследование АТ классов А и G к Bp, Es и Pg проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа в собственной модификации [2]. В качестве антигена на полистирольные иммунологические планшеты были иммобилизованы конъюгаты Bp, Es и Pg с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Конъюгат Bp-BSA был получен согласно ранее описанной методике. Конъюгат Es-BSA был синтезирован путем присоединения BSA к эстрадиолхинонам, полученным окислением Es солью Фреми. Коньюгат Pg-BSA был получен путем конъюгации гемиглутарата 21-гидроксипрогестерона и BSA карбодиимидным способом. Cвязавшиеся АТ выявляли с помощью козьих АТ против IgА(G) человека, меченных пероксидазой хрена (Novex, США) в разведении 1:10000. Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводили с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметилбензидин (TMB, США), на фотометре (Униплан, Россия) при длине волны 450 нм. Уровень АТ к гаптенам выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

IgА(G)-Х=(ODХ-BSA-ODBSA)/ODBSA

где Х=Bp, Es, Pg; ODХ- BSA – связывание АТ с конъюгатом гаптен-BSA, ODBSA – фоновое связывание АТ с BSA. Величина уровня IgA(G)-Х показывала во сколько раз связывание с гаптеном превышает связывание с белком-носителем.

Образцы ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови с помощью метода фенол – хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом, образцы ДНК хранили при -20°C.

Типирование полиморфизма гена *IL6* rs1800795 осуществляли с помощью метода ассимметричной ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченого олигонуклеотидного зонда. Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: начальная денатурация (96◦С – 3 мин); затем 54 цикла, включающих денатурацию при 96◦С – 6 сек, отжиг праймеров при 56◦С – 6 сек и последующую элонгацию при 72◦С – 6 сек; регистрировали кривые плавления в диапазоне температур 35–85°С, повышая температуру на 0,5 °С в каждом цикле от начальной температуры, каждый шаг сопровождался регистрацией флуоресцентного сигнала в диапазоне, соответствующему интервалу флуорофора. Общий объем реакционной смеси составил 20 мкл: 10 mM Трис-HCl (рН 8,9), 55 mM KCl; 2,5 mM MgCl2, 0,05% Tween 20, 0,2 mM dNTP, 20-100 ng ДНК, 1 ед. акт. Klentaq-ДНК-полимеразы, растворы олигонуклеотидных праймеров и зонда в следующих концентрациях: лимитирующий праймер – 0,1 mM (5’-TGGGGCTGATTGGAAACCT-3’), избыточный праймер – 1 mM (5’-AGGAAGAGTGGTTCTGCTTCT-3’) и зонд – 0,1 mM (5’-R6G-CTTTAGCATcGCAAGACA-BHQ-3’).

Полиморфизм гена *IL1RN* (rs2234663) детектировали с помощью электрофоретического разделения продуктов амплификации [3]. VNTR аллели в гене *IL1RN* обозначали следующим образом: аллель *IL1RN\*1* содержал четыре тандемных повтора по 86 н. п.; аллель *IL1RN\*2* – два тандемных повтора; аллель *IL1RN\*3* – пять тандемных повтора; аллель *IL1RN\*4* – три тандемных повтора. Амплификацию проводили с помощью термоциклера «Терцик» (НПФ «ДНК-Технология», Россия).

Генотипирование остальных полиморфных локусов *IL1B* (rs16944), *IL1RN* (rs4251961), *IL6* (rs1800796, rs1554606), *IL8* (rs4073), *IL10* (rs1800896), *TNFA* (rs1800629) и *CD40* (rs6074022) выполняли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов. Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: начальная денатурация (96◦С – 3 мин); затем 50 циклов, включающих денатурацию при 96◦С – 8 сек, отжиг праймеров при 58◦С – 40 сек и последующую элонгацию при 72◦С – 8 сек. Общий объем реакционной смеси был 20 мкл. Смесь содержала: 65 mM Трис-HCl (рН 8,9), 24 mM (NH4)2SO4; 3,0 mM MgCl2, 0,05% Tween 20, 0,2 mM dNTP, 20-100 ng ДНК; 300 mM каждого праймера; 100-200 nM TaqMan-зондов (таблица 1); 0,5 ед. акт. термостабильной Taq-полимеразы. Амплификацию проводили с помощью термоциклера CFX-96 (Bio-Rad, США).

Табл.1

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета статистических программ Statistica 8.0, (StatSoftInc., USA), он-лайн калькуляторов <http://gen-exp.ru/calculator_or.php>, <https://www.snpstats.net/start.htm>. Соответствие частот генотипов изучаемых генов равновесию Харди-Вайнберга (HWE) оценивали с помощью критерия χ2 Пирсона. Нулевую гипотезу отвергали при *р*<0,05. Ненормальный характер распределения количественных показателей определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка и в дальнейшем статистически значимые различия между группами выявляли с помощью непараметрического критерия χ2 с поправкой Йейтса (Yates) на непрерывность вариации. За критический уровень значимости принималось значение *p*<0,05. Силу ассоциации АТ и полиморфных вариантов изучаемых генов у здоровых женщин и больных РМЖ оценивали с помощью величины отношения шансов (oddsratio, OR) с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости. В качестве базовой модели использовали аддитивную модель наследования признака.

**Результаты и обсуждение**

Сначала отдельно для каждой из исследуемых групп рассчитали медианы (Ме) уровней антител классов А и G, специфичных к Bp, Es и Pg, а также Ме индивидуальных соотношений антител Bp/Pg и Es/Pg. Затем провели анализ частот встречаемости низких (≤Ме) и высоких (>Ме) значений уровней антител и их соотношений у носителей отдельных генотипов и аллелей исследуемых цитокинов у здоровых женщин и у больных РМЖ. Рассчитали отношение шансов (OR) обнаружения высоких уровней антител и высоких значений их соотношений у носителей отдельных аллелей исследуемых генов цитокинов.

В таблице 2 приведено распределение здоровых женщин по частоте встречаемости низких и высоких значений уровней исследуемых антител и их индивидуальных соотношений в ассоциации с отдельными генотипами и аллелями генов цитокинов и гена поверхностного рецептора В-лимфоцитов *CD40*. Представлены только выявленные статистически значимые (*р*<0,05) взаимосвязи.

Табл. 2

Обнаружены искомые ассоциации генетического полиморфизма *IL1RN* (rs4251961) c уровнями IgA-Bp, а также с соотношениями IgA-Bp/IgA-Pg, IgG-Bp/IgG-Pg, IgG-Es/IgG-Pg. Высокие уровни IgA-Bp и высокие значения указанных соотношений были взаимосвязаны с аллелем C (OR=1,4-1,9) гена *IL1RN*.

Генетический полиморфизм *IL1B* (rs16944) был статистически значимо взаимосвязан с соотношениями IgA-Es/IgA-Pg и IgG-Es/IgG-Pg (*р*=0,03-0,04). Повышенные значения указанных соотношений чаще встречались у носителей аллеля T гена *IL1B*.

Полиморфные локусы в гене *IL6* были статистически значимо ассоциированы с IgG-Es (rs1800795, *р*=0,007; и rs1554606, *p*=0,03). И в том, и другом случае высокие уровни IgG-Es были взаимосвязаны с аллелем G (OR=1,5-1,3 соответственно).

Полиморфизм гена *TNFA* (rs1800629) был взаимосвязан с IgA-Pg (*p*=0,008). У носителей аллеля А чаще встречались высокие уровни IgA-Pg (OR=1,8).

Полиморфизм гена *CD40* (rs607022) ассоциирован с IgG-Es (*p*=0,005). Высокие уровни IgG-Es были взаимосвязаны с аллелем С (OR=1,5).

У больных РМЖ (таблица 3) обнаружены статистически значимые взаимосвязи полиморфизма в генах *IL1RN* (rs2234663)*, IL6* (rs1800795)*, IL8* и *CD40* с IgA-Pg, IgG-Es, и с соотношениями IgA-Es/IgA-Pg и IgG-Es/IgG-Pg (*p*=0,02-0,04). В то же время полиморфизм гена *CD40* оказался ассоциированным с IgG-Es (*p*=0,007). Высокие уровни IgG-Es выявлялись чаще у больных РМЖ с аллелем Т (OR=1,3).

Табл. 3

Таким образом, впервые выявлены ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов с образованием антител, специфичных к химическим канцерогенам окружающей среды и эндогенным стероидным гормонам. Несмотря на схожесть химической структуры этих низкомолекулярных соединений (особенно Es и Pg), влияние цитокинов на образование специфических антител проявлялось по-разному.

Например, у здоровых женщин полиморфные локусы генов *IL6* (rs1800795, rs1554606) и *CD40* были ассоциированы с уровнями антител к Es, но не к Pg и к Bp. Полиморфизм гена *TNFA* оказался взаимосвязанным с уровнями антител к Pg, но не к Es и Bp. При этом указанные полиморфизмы были ассоциированы только с одним из классов антител –A или G.

Также у здоровых женщин полиморфизм *IL1RN* был ассоциирован с уровнями только IgA-Bp, но не с IgA или IgG к Pg. При этом сильные взаимосвязи имели место с индивидуальными соотношениями IgA-Bp/IgA-Pg, IgG-Bp/IgG-Pg, IgG-Es/IgG-Pg.

У больных РМЖ искомые ассоциации оказались значительно слабее, чем у здоровых женщин (с низким уровнем статистической значимости), за исключением *CD40*, который был взаимосвязан с образованием IgG-Es.

Причины перечисленных особенностей, как у здоровых женщин, так и у больных РМЖ, остаются неизвестными. Поскольку в образовании антител любой специфичности участвует весь спектр цитокинов и поверхностных рецепторов лимфоцитов (в том числе, система *HLA*, очевидно обеспечивающая распознавание низкомолекулярных гаптенов в составе макромолекулярных аддуктов), дальнейшие исследования генетических основ образования антител против химических канцерогенов и стероидных гормонов целесообразно проводить с использованием методов многофакторного регрессионного анализа на больших выборках.

**Финансирование**

*Работа выполнена в рамках проекта VI.59.1.1 Программы фундаментальных научных исследований СО РАН (гос.задание № 0352-2019-0011).*