

АССОЦИАЦИИ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ, ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ С ПОЛИМОРФНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ У ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

Поленок Е.Г.¹, Гордеева Л.А.¹, Мун С.А.¹, Воронина Е.Н.²,
Колпинский Г.И.³, Луценко В.А.⁴, Брежнева Е.В.⁴, Костянко М.В.⁵,
Вафин И.А.⁶, Глушков А.А.⁷

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

² ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», г. Новосибирск, Россия

³ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

⁴ ГБУЗ Кемеровской области «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия

⁵ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

⁶ ГКУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия

⁷ ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. Ранее были обнаружены ассоциации антител классов А и G, специфичных к бензо[а]пирену (Bp), эстрадиолу (Es) и прогестерону (Pg), с раком молочной железы (РМЖ) у женщин в постменопаузе. Индивидуальные соотношения IgA-Bp/IgA-Pg, IgG-Bp/IgG-Pg, IgG-Es/IgG-Pg и IgG-Es/IgG-Pg также были взаимосвязаны с риском возникновения РМЖ. Предположили, что образование антител к химическим канцерогенам и стероидным гормонам обусловлено генетическим полиморфизмом цитокинов.

Цель исследования — выявить предполагаемые ассоциации антител к Bp, Es и Pg и их индивидуальных соотношений с полиморфизмом в генах *IL1RN* (rs4251961), *IL1B* (rs16944), *IL6* (rs1800795), *rs1800796*, *rs1554606*), *IL8* (rs4073), *TNFA* (rs1800629) и *CD40* (rs6074022) у здоровых женщин и больных РМЖ в постменопаузе.

Исследовали сывороточные антитела классов А и G к Bp, Es и Pg у 470 здоровых женщин и 995 больных РМЖ с помощью неконкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве адсорбированных на пластике антигенов использовали конъюгаты Bp, Es и Pg с бычьим сывороточным альбумином. Для выявления связавшихся с гаптенами антител использовали меченные пероксидазой хрена козьи антитела против IgA и IgG человека. Генетические полиморфизмы цитокинов исследовали с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Адрес для переписки:

Мун Стелла Андреевна
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля
и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук»
650065, Россия, г. Кемерово, Ленинградский пр., 10.
Тел.: 8 (3842) 57-50-79.
E-mail: stellamun@yandex.ru

Address for correspondence:

Mun Stella A.
Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian
Branch, Russian Academy of Sciences
650065, Russian Federation, Kemerovo,
Leningradsky ave., 10.
Phone: 7 (3842) 57-50-79.
E-mail: stellamun@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Поленок, Л.А. Гордеева, С.А. Мун, Е.Н. Воронина,
Г.И. Колпинский, В.А. Луценко, Е.В. Брежнева,
М.В. Костянко, И.А. Вафин, А.А. Глушков «Ассоциации
антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону
с полиморфными вариантами генов цитокинов
у женщин в постменопаузе» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 171-180.
doi: ?????????????????????????????????

© Поленок Е.Г. и соавт., 2020

For citation:

E.G. Polenok, L.A. Gordeeva, S.A. Mun, E.N. Voronina,
G.I. Kolpinsky, V.A. Lutsenko, E.V. Brezhneva,
M.V. Kostyanko, I.A. Vafin, A.A. Glushkov "Association of
antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone with
gene polymorphisms of cytokines in postmenopausal women",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2020, Vol. 22, no. 1, pp. 171-180.
doi: ?????????????????????????????????

DOI: ?????????????????????????????????

У здоровых женщин обнаружены ассоциации исследуемых антител и их соотношений с полиморфизмом в генах *IL1RN* (rs4251961), *IL6* (rs1800795), *TNFA* (rs1800629) и *CD40* (rs6074022). Высокие значения индивидуальных соотношений IgA-Bp/IgA-Pg ($p = 0,0001$), IgG-Bp/IgG-Pg ($p < 0,0001$), IgG-Es/IgG-Pg ($p = 0,0003$) были ассоциированы с аллелем С гена *IL1RN*. Повышенные уровни IgG-Es чаще встречались у носителей аллеля G гена *IL6* ($p = 0,007$) и у носителей аллеля С гена *CD40* ($p = 0,005$). Повышенные уровни IgA-Pg были ассоциированы с аллелем А гена *TNFA* ($p = 0,008$). У больных РМЖ выявлены ассоциации антител только с полиморфизмом в гене *CD40* (rs6074022). Повышенные уровни IgG-Es чаще встречались у носителей аллеля Т гена *CD40* ($p = 0,007$).

Таким образом, впервые подтвердили участие цитокинов в регуляции образования антител, специфичных к химическим канцерогенам и стероидным гормонам у здоровых людей и больных раком. Дальнейшие исследования антител к Bp, Es и Pg в сочетании с анализом полиморфизма в генах цитокинов позволят оптимизировать диагностику индивидуальных рисков возникновения гормонозависимых злокачественных опухолей у человека.

Ключевые слова: цитокины, антитела, бензо[а]пирен, эстрадиол, прогестерон, рак молочной железы

ASSOCIATION OF ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE, ESTRADIOL AND PROGESTERONE WITH GENE POLYMORPHISMS OF CYTOKINES IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

Polenok E.G.^a, Gordeeva L.A.^a, Mun S.A.^a, Voronina E.N.^b,
Kolpinsky G.I.^c, Lutsenko V.A.^d, Brezhneva E.V.^d, Kostyanko M.V.^e,
Vafin I.A.^f, Glushkov A.A.^g

^a Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

^b Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

^c Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

^d Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^e Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

^f Regional Center of Blood, Kemerovo, Russian Federation

^g Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Previous studies reported some associations between IgA and IgG antibodies specific to benzo[a]pyrene (Bp), estradiol (Es) and progesterone (Pg), and breast cancer (BC) in postmenopausal women. Likewise, the individual ratios of these antibodies (IgA-Bp/IgA-Pg, IgG-Bp/IgG-Pg, IgG-Es/IgG-Pg, IgG-Es/IgG-Pg) were associated with BC. It was suggested that development of antibodies to chemical carcinogens and steroid hormones was determined by functional polymorphisms of cytokine genes. The purpose of this study was to identify the suggested associations of antibodies to Bp, Es, Pg, and their individual ratios to the following gene polymorphisms: *IL1RN* (rs4251961), *IL1B* (rs16944), *IL6* (rs1800795, rs1800796, rs1554606), *IL8* (rs4073), *TNFA* (rs1800629) and *CD40* (rs6074022) detected in postmenopausal healthy women and BC patients.

The serum IgA and IgG antibodies specific to Bp, Es and Pg were studied in 470 healthy women and 995 BC patients by non-competitive solid phase immunoassay. The conjugates of Bp, Es, Pg with bovine serum albumin were used as adsorbed antigen. The goat antibodies against human IgA or IgG conjugated with horseradish peroxidase were used for the detection of bound hapten-specific antibodies. Cytokine gene polymorphisms were analyzed by the real-time PCR.

Associations between the studied antibodies and their ratios with the gene polymorphisms in *IL1RN* (rs4251961), *IL6* (rs1800795), *TNFA* (rs1800629) and *CD40* (rs6074022) were found in healthy women. Higher individual ratios of IgA-Bp/IgA-Pg ($p = 0.0001$), IgG-Bp/IgG-Pg ($p < 0.0001$), IgG-Es/IgG-Pg ($p = 0.0003$) were associated with the allele C gene *IL1RN*. The higher IgG-Es levels were more common in the persons with allele G gene *IL6* ($p = 0.007$), and with C allele of *CD40* gene ($p = 0.005$). The high IgA-Pg levels were

associated with A allele gene of *TNFA* ($p = 0.008$). Associations of antibodies were found only with genes polymorphisms in *CD40* (rs6074022) in BC patients. Higher IgG-Es levels were more common in persons with allele T gene *CD40* ($p = 0.007$).

In conclusion, we revealed the participation of cytokines in immune regulation of antibody genesis for environmental chemical carcinogens and endogenous steroid hormones in healthy women and cancer patients. The future investigations of antibodies specific to Bp, Es and Pg combined with the analysis genes polymorphisms in cytokines will be useful for detection of the individual hormone-dependent cancer risks in humans.

Keywords: cytokines, antibodies, benzo[a]pyrene, estradiol, progesterone, breast cancer

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

Введение

В экспериментах по иммунизации животных конъюгатами полициклических ароматических углеводородов или стероидных гормонов с макронесителями 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 (Bp), 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, представляется 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 Хельсинкской 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 -70°C .

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. Конъюгат Pg-BSA был получен путем конъюгации гемиглутарата 21-гидроксипрогестерона и BSA карбодимидным способом. Связавшиеся АТ выявляли с помощью козьих АТ против IgA(G) человека, меченных пероксидазой хрена (Novex, США) в разведении 1:10000. Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводили с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметилбензидин (ТМБ, США), на фотометре (Униплан, Россия) при длине волны 450 нм. Уровень АТ к гаптенам выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

$$\text{IgA(G)-X} = (\text{OD}_{\text{X-BSA}} - \text{OD}_{\text{BSA}}) / \text{OD}_{\text{BSA}}$$

где X = Bp, Es, Pg; OD_{X-BSA} — связывание **АТ** с конъюгатом гаптен-BSA, OD_{BSA} — фоновое связывание **АТ** с BSA. Величина уровня IgA(G)-X показывала во сколько раз связывание с гаптен-превышает связывание с белком-носителем.

Генотипирование

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 *IL6rs1800795* осуществляли с помощью метода асимметричной ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченого олигонуклеотидного зонда. Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: начальная денатурация

(96 °C — 3 мин); затем 54 цикла, включающих денатурацию при 96 °C — 6 с, отжиг праймеров при 56 °C — 6 с и последующую элонгацию при 72 °C — 6 с; регистрировали кривые плавления в диапазоне температур 35-85 °C, повышая температуру на 0,5 °C 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 (pH 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'-AGGAAGAGTG

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ, ИСПОЛЗУЕМЫХ В ИССЛЕДОВАНИИ

TABLE 1. SEQUENCE OF PRIMERS AND PROBES USED IN THE STUDY

Полиморфизм Polymorphism	Праймеры Primers	Последовательность праймеров Primer sequence	Последовательность зондов Probe sequence
-511T>C <i>IL1B</i> (rs16944)	прямой direct	5'-ccccagccaagaaagggtca-3'	5'-R6G-ctctgcctcGggagctctc-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-ttgagggtgtgggtctctac-3'	5'-Fam-ctctgcctcAggagctctc-BHQ-3'
+1018T>C <i>IL1RN</i> (rs4251961)	прямой direct	5'-cggtgagccctaagtctaag-3'	5'-R6G-atggacctgGtgctatctgc-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-cttcagacctcattttgacagc-3'	5'-Fam-atggacctgAtgctatctgc-BHQ-3'
g.4481G>C <i>IL6</i> (rs1800796)	прямой direct	5'-catctgagttctctgtgtctg-3'	5'-R6G-caacagccCctcacagg-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-cgagacgccttgaagtaactg-3'	5'-Fam-caacagccGctcacagg-BHQ-3'
g.6942T>G <i>IL6</i> (rs1554606)	прямой direct	5'-caactgtcaaatgtttaaactcc-3'	5'-Fam-ccctgAgagtacctttccc-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-ccaggggagccagagag-3'	5'-Hex-ccctgCgagtacctttccc-BHQ-3'
-251A>T <i>IL8</i> (rs4073)	прямой direct	5'-tgttctaacacctgccactct-3'	5'-Fam-aagcatataAttgataattc-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-acatttaaaatactgaagctccaca-3'	5'-Hex-aagcatataTttgataattc-BHQ-3'
-1082A>T <i>IL10</i> (rs1800896)	прямой direct	5'-cacaatccaagacaacactact -3'	5'-R6G-cttccccCtcccaaagaagc -BHQ-3'
	обратный reverse	5'-gataggagggtccctactttcc -3'	5'-Fam-cttccccTtcccaaagaagc -BHQ-3'
-308G>A <i>TNFA</i> (rs1800629)	прямой direct	5'-gtcctacacacaaatcagtcagt-3'	5'-Fam-tcctccctgctcTgattc-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-ttggggacacacaagcatca-3'	5'-R6G-tcctccctgctcCgattc-BHQ-3'
g.46111557C>T <i>CD40</i> (rs6074022)	прямой direct	5'-ccctgcactgtctccagg-3'	5'-FAM-ctgccatgtcAtgaggacac-BHQ-3'
	обратный reverse	5'-atacggacttctcataggctg-3'	5'-R6G-ctgccatgtcGtaggacac-BHQ-3'

GTTCTGCTTCT-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 tandemных повтора по 86 н. п.; аллель *IL1RN*2* — два tandemных повтора; аллель *IL1RN*3* — пять tandemных повтора; аллель *IL1RN*4* — три tandemных 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 °C — 3 мин); затем 50 циклов, включающих денатурацию при 96 °C — 8 с, отжиг праймеров при 58 °C — 40 с и последующую элонгацию при 72 °C — 8 с. Общий объем реакционной смеси был 20 мкл. Смесь содержала: 65 mM Трис-HCl (pH 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 (табл. 1); 0,5 ед. акт. термостабильной Taq-полимеразы. Амплификацию проводили с помощью термоциклера CFX-96 (Bio-Rad, США).

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США), онлайн-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 χ^2 Пирсона. Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$. Ненормальный характер распределения количественных показателей определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка и в дальнейшем статистически значимые различия между группами выявляли с помощью непараметрического критерия χ^2 с поправкой Йейтса (Yates) на непрерывность вариации. За критический уровень значимости принималось значение $p < 0,05$. Силу ассоциации **AT** 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 (Me) уровней антител классов А и G, специфичных к Bp, Es и Pg, а также Me индивидуальных соотношений антител Bp/Pg и Es/Pg. Затем провели анализ частот встречаемости низких ($\leq$ Me) и высоких ($>$ Me) 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.

Ассоциации антител к Bp, Es и Pg с полиморфизмом генов исследуемых цитокинов у здоровых женщин

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 ($p < 0,05$) взаимосвязи.

Обнаружены искомые ассоциации генетического полиморфизма *IL1RN* (rs4251961) с 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 С (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 ($p = 0,03-0,04$). Повышенные значения указанных соотношений чаще встречались у носителей аллеля Т гена *IL1B*.

Полиморфные локусы в гене *IL6* были статистически значимо ассоциированы с IgG-Es (rs1800795, $p = 0,007$ 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).

Ассоциации антител к Bp, Es и Pg с полиморфными вариантами генов исследуемых цитокинов у больных РМЖ

У больных РМЖ (табл. 3) обнаружены статистически значимые взаимосвязи полиморфизма

ТАБЛИЦА 2. ЧИСЛО СЛУЧАЕВ (n) И ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ (%) НИЗКИХ ($\leq Me$) И ВЫСОКИХ УРОВНЕЙ ($> Me$) ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИТЕЛ И ИХ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СООТНОШЕНИЙ У ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН ПРИ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНОТИПАХ И АЛЛЕЛЯХ ЦИТОКИНОВ

TABLE 2. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF THE LOW ($\leq Me$) AND HIGH ($> Me$) STUDIED ANTIBODIES LEVELS AND INDIVIDUAL ANTIBODIES RATIOS IN HEALTHY WOMEN IN RELATION TO CYTOKINES GENOTYPES AND ALLELES

Гены Генотипы Аллели Genes Genotypes Alleles	Антитела и их соотношения Antibodies, ratios		p-value
	n/%	n/%	OR (95%CI)
+1018T>C <i>IL1RN</i> (rs4251961) TT TC CC T C	IgA-Bp $\leq 2,5$	IgA-Bp $> 2,5$	0,01
	133/55,6 87/36,4 19/8,0	104/45,0 99/42,9 28/12,1	
	353/74,0 125/26,0	307/66,0 155/34,0	
			0,7 (0,5-0,9) 1,4 (1,1-1,9)
+1018T>C <i>IL1RN</i> (rs4251961) TT TC CC T C	IgA-Bp/IgA-Pg $\leq 1,0$	IgA-Bp/IgA-Pg $> 1,0$	0,0001
	139/59,1 79/33,6 17/7,2	98/41,7 107/45,5 30/12,8	
	357/76,0 113/24,0	303/64,0 167/36,0	
			0,6 (0,4-0,8) 1,7 (1,3-2,3)
+1018T>C <i>IL1RN</i> (rs4251961) TT TC CC T C	IgG-Bp/IgG-Pg $\leq 1,2$	IgG-Bp/IgG-Pg $> 1,2$	< 0,0001
	144/60,5 78/32,8 16/6,7	93/40,1 108/46,5 31/13,4	
	366/77,0 110/23,0	294/63,0 170/37,0	
			0,5 (0,4-0,7) 1,9 (1,5-2,6)
+1018T>C <i>IL1RN</i> (rs4251961) TT TC CC T C	IgG-Es/IgG-Pg $\leq 1,4$	IgG-Es/IgG-Pg $> 1,4$	0,0003
	141/58,3 83/34,3 18/7,4	96/42,1 103/45,2 29/12,7	
	365/75,0 119/25,0	295/65,0 161/35,0	
			0,6 (0,5-0,8) 1,7 (1,3-2,2)
-511T>C <i>IL1B</i> (rs16944) CC CT TT C T	IgA-Es/IgA-Pg $\leq 1,1$	IgA-Es/IgA-Pg $> 1,1$	0,04
	123/50,0 103/41,9 20/8,1	90/40,2 110/49,1 24/10,7	
	349/71,0 143/29,0	290/65,0 158/35,0	
			0,8 (0,6-0,99) 1,3 (1,01-1,8)
-511T>C <i>IL1B</i> (rs16944) CC CT TT C T	IgG-Es/IgG-Pg $\leq 1,4$	IgG-Es/IgG-Pg $> 1,4$	0,04
	121/50,0 102/42,1 19/7,8	92/40,0 111/48,7 25/11,0	
	344/71,0 140/29,0	295/65,0 161/35,0	
			0,8 (0,6-0,98) 1,3 (1,02-1,8)

Гены Генотипы Аллели Genes Genotypes Alleles	Антитела и их соотношения Antibodies, ratios		p-value
	n/%	n/%	OR (95%CI)
-174G>C <i>IL6</i> (rs1800795) GG GC CC G C	IgG-Es ≤ 5,8	IgG-Es > 5,8	0,007
	54/25,0 116/53,7 46/21,3	61/33,9 99/55,0 20/11,1	
	224/52,0 208/48,0	221/61,0 139/39,0	
			1,5 (1,1-1,96) 0,7 (0,5-0,9)
g.6942T>G <i>IL6</i> (rs1554606) GG GT TT G T	IgG-Es ≤ 5,8	IgG-Es > 5,8	0,03
	58/24,4 128/53,8 52/21,9	71/30,6 129/55,6 32/13,8	
	244/51,0 232/49,0	271/58,0 193/42,0	
			1,3 (1,03-1,7) 0,8 (0,6-0,97)
-308G>A <i>TNFA</i> (rs1800629) GG GA AA G A	IgA-Pg ≤ 2,5	IgA-Pg > 2,5	0,008
	200/85,5 33/14,1 1/0,4	178/75,4 56/23,7 2/0,8	
	433/93,0 35/7,0	412/87,0 60/13,0	
			0,6 (0,4-0,9) 1,8 (1,2-2,8)
g.46111557C>T <i>CD40</i> (rs6074022) TT CT CC T C	IgG-Es ≤ 5,8	IgG-Es > 5,8	0,005
	145/60,9 84/35,3 9/3,8	120/51,7 88/37,9 24/10,3	
	374/79,0 102/21,0	328/71,0 136/29,0	
			0,7 (0,5-0,9) 1,5 (1,1-2,0)

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).

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* оказал-ся взаимосвязанным с уровнями антител к Pg, но не к Es и Bp. При этом указанные полиморфизмы были ассоциированы только с одним из классов антител – А 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 взаимосвя-зан 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

ТАБЛИЦА 3. ЧИСЛО СЛУЧАЕВ (n) И ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ (%) НИЗКИХ ($\leq Me$) И ВЫСОКИХ УРОВНЕЙ ($> Me$) ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИТЕЛ И ИХ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СООТНОШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНОТИПАХ И АЛЛЕЛЯХ ЦИТОКИНОВ

TABLE 3. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF THE LOW ($\leq Me$) AND HIGH ($> Me$) STUDIED ANTIBODIES LEVELS AND INDIVIDUAL ANTIBODIES RATIOS IN BREAST CANCER PATIENTS IN RELATION TO CYTOKINES GENOTYPES AND ALLELES

Гены Генотипы Аллели Genes Genotypes Alleles	Антитела и их соотношения Antibodies, ratios		p-value
	n/%	n/%	OR (95%CI)
IL1RN (rs2234663) rs2234663 *1/*1 *1/*2 *2/*2 *1/*3+*2/*3+*1/*5 *1 *2	IgA-Pg $\leq 2,0$	IgA-Pg $> 2,0$	0,04
	99/48,7 87/42,9 15/7,4 2/1,0	112/58,3 59/30,7 12/6,3 9/4,7	
	286/70,1 118/2,9	289/75,3 86/22,4	
			1,4 (1,01-1,9) 0,7 (0,5-0,99)
174G>C IL6 (rs1800795) GG GC CC G C	IgA-Pg $\leq 2,0$	IgA-Pg $> 2,0$	0,03
	146/29,7 235/47,8 111/22,6	175/34,8 239/47,5 89/17,7	
	527/54,0 457/46,0	589/59,0 417/41,0	
			1,2 (1,03-1,5) 0,8 (0,7-0,97)
-251A>T IL8 (rs4073) TT AT AA T A	IgG-Es/IgG-Pg $\leq 1,6$	IgG-Es/IgG-Pg $> 1,6$	0,02
	167/33,3 235/46,9 99/19,8	115/27,6 197/47,2 105/25,2	
	569/57,0 433/43,0	427/51,0 407/49,0	
			0,8 (0,7-0,96) 1,3 (1,04-1,5)
g.46111557C>T CD40 (rs6074022) TT CT CC T C	IgA-Es/IgA-Pg $\leq 1,4$	IgA-Es/IgA-Pg $> 1,4$	0,03
	289/55,0 206/39,2 30/5,7	290/61,7 160/34,0 20/4,3	
	784/75,0 266/25,0	740/79,0 200/21,0	
			1,3 (1,02-1,69) 0,8 (0,7-0,98)
g.46111557C>T CD40 (rs6074022) TT CT CC T C	IgG-Es $\leq 5,8$	IgG-Es $> 5,8$	0,007
	273/53,9 205/40,4 29/5,7	306/62,7 161/33,0 21/4,3	
	751/74,0 263/26,0	773/79,0 203/21,0	
			1,3 (1,08-1,64) 0,8 (0,6-0,9)

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.

Список литературы / References

1. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Костянко М.В., Антонов А.В., Титов В.А., Вержбицкая Н.Е., Вафин И.А. Иммунологический дисбаланс при раке молочной железы и раке легкого у женщин в постменопаузе // Медицинская иммунология, 2018. Т.20, № 6. С. 927-934. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Titov V.A., Verzhbitskaya N.E., Vafin I.A. Immunological imbalance in breast cancer and lung cancer in postmenopausal women. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 927-934. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-927-934.
2. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Мун С.А., Гордеева Л.А., Костянко М.В., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е., Вафин И.А. Индивидуальный иммунологический фенотип и риск рака молочной железы у женщин в постменопаузе // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13, № 22. С. 44-52. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Mun S.A., Gordeeva L.A., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E., Vafin I.A. Personal immunological phenotype and breast cancer risk in postmenopausal women. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 22, pp. 44-52. (In Russ.)]
3. Гордеева Л.А., Глушкова О.А., Воронина Е.Н. Ассоциации материнских полиморфизмов генов цитокинов (*IL1B, IL1RN, TNF, IL4, IL6*) с врожденными пороками развития у плода и новорожденного // Иммунология, 2013. Т. 34, № 6. С. 298-304. [Gordeeva L.A., Glushkova O.A., Voronina E.N. Association of maternal polymorphisms of cytokine gene (*IL1B, IL1RN, TNF, IL4, IL6*) with congenital malformations in fetus and newborn. *Immunologiya = Immunology*, 2013, Vol. 34, no. 6, pp. 298-304. (In Russ.)]
4. Шевченко А.В., Голованова О.В., Коломейчук М.Ю., Коненков В.И., Гарбуков Е.Ю., Стахеева М.Н. Полиморфизм промоторного региона генов *IL-4, IL-6* и *IL-10* у пациенток с раком молочной железы // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 1 С. 21-28. [Shevchenko A.V., Golovanova O.V., Kolomejchuk M.Yu., Konenkov V.I., Garbukov E.Yu., Stakheeva M.N. Promotor polymorphism of *IL-4, IL-6, and IL-10* genes among patients with breast cancer. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 1, pp. 21-28. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2009-1-21-28.
5. Ambrosone C.B., Abrams S.M., Gorlewska-Roberts K., Kadlubar F.F. Hair dye use, meat intake, and tobacco exposure and presence of carcinogen-DNA adducts in exfoliated breast ductal epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, Vol. 464, no. 2, pp. 169-175.
6. Bourtourault M., Shacoori V., Guerin J., Saiag B., Rault B. Effects of simultaneous active immunization against 17 beta-estradiol and testosterone on pituitary and ovarian activity in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1991, Vol. 72, no. 3, pp. 273-284.
7. Caldwell B.V., Tillson S.A., Esber H., Thorneycroft I.H. Survival of tumors after immunization against oestrogens. *Nature*, 1971, Vol. 231, no. 5298, pp. 118-119.
8. Černohorská H., Klimešová S., Lepša L., Jinoch P., Milcová A., Schmuczerová J., Topinka J., Lábaj J. Influence of immunization with non-genotoxic PAH-KLH conjugates on the resistance of organisms exposed to benzo[a]pyrene. *Mut. Res.*, 2012, Vol. 742, no. 1-2, pp. 2-10.
9. Glushkov A., Polenok E., Kostyanko M., Antonov A., Verzhbitskaya N., Vafin I., Ragozhina S. Postmenopausal breast cancer risk in relation to antibodies specific to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone. *Iran J. Cancer Prev.*, 2016, Vol. 9, no. 2, e4212. doi: 10.17795/ijcp-4212.
10. Grova N., Prodhomme E.J., Schellenberger M.T., Farinelle S., Muller C.P. Modulation of carcinogen bioavailability by immunisation with benzo[a]pyrene – conjugate vaccines. *Vaccine*, 2009, Vol. 27, no. 31, pp. 4142-4151.
11. Hillier S.G., Groom G.V., Boyns A.R., Cameron E.H. Effects of active immunisation against steroids upon circulating hormone concentrations. *J. Steroid Biochem.*, 1975, Vol. 6, no. 3-4, pp. 529-535.
12. Li H.H., Zhu H., Liu L.S., Huang Y., Guo J., Li J., Sun X.P., Chang C.X., Wang Z.H., Zhai K. Tumour necrosis factor- α gene polymorphism is associated with metastasis in patients with triple negative breast cancer. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, e10244. doi: 10.1038/srep10244.
13. Peng X., Shi J., Sun W., Ruan X., Guo Y., Zhao L., Wang J., Li B. Genetic polymorphisms of *IL-6* promoter in cancer susceptibility and prognosis: a meta-analysis. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, no. 15, pp. 12351-12364.
14. Pruthi S., Yang L., Sandhu N.P., Ingle J.N., Beseler C.L., Suman V.J., Cavalieri E.L., Rogan E.G. Evaluation of serum estrogen-DNA adducts as potential biomarkers for breast cancer risk. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2012, Vol. 132, no. 1-2, pp. 73-79.
15. Sagiv S.K., Gaudet M.M., Eng S.M., Abrahamson P.E., Shantakumar S., Teitelbaum S.L., Bell P., Thomas J.A., Neugut A.I., Santella R.M., Gammon M.D. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and survival among women with breast cancer. *Environ. Res.*, 2009, Vol. 109, no. 3, pp. 287-291.

Авторы:

Поленок Е.Г. — к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Гордеева Л.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Мун С.А. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Воронина Е.Н. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», г. Новосибирск, Россия

Колпинский Г.И. — д.м.н., профессор кафедры лучевой диагностики, лучевой терапии и онкологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Луценко В.А. — к.м.н., главный врач ГБУЗ Кемеровской области «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия

Брежнева Е.В. — заведующая маммологическим отделением ГБУЗ Кемеровской области «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия

Костянко М.В. — ведущий инженер кафедры органической химии Института фундаментальных наук ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

Вафин И.А. — главный врач ГКУЗ Кемеровской области «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия

Глушков А.А. — студент Института медицины и психологии В. Зельмана ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Polenok E.G., PhD (Pharmacy), Leading Research Associate, Immunochimistry Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Gordeeva L.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Mun S.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Voronina E.N., PhD (Biology), Research Associate, Pharmacogenomics Laboratory, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Kolpinsky G.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Radiology, Radiotherapy and Oncology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Lutsenko V.A., PhD (Medicine), Chief Physician, Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Brezhneva E.V., Head, Mammology Department, Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Kostyanko M.V., Leading Engineer, Organic Chemistry Department, Institute of Fundamental Sciences, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

Vafin I.A., Chief Physician, Regional Center of Blood, Kemerovo, Russian Federation

Glushkov A.A., Student, V. Zelman Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 26.06.2019

Отправлена на доработку 13.09.2019

Принята к печати 03.12.2019

Received 26.06.2019

Revision received 13.09.2019

Accepted 03.12.2019