

УДК 577.21:577.2

*В.Г. НИГМАТОВА, Г.К. АБУГАЛИЕВА, Т.Н. МИРОШНИК,
Е.Е. АШИРБЕКОВ, Т.С. БАЛМУХАНОВ, Н.А. АЙТХОЖИНА*

**ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА 1398 A>G
ГЕНА РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-13 (*IL-13RA1*)
С ЗАБОЛЕВАНИЕМ РАКА ТЕЛА МАТКИ В ПОПУЛЯЦИИ КАЗАХСТАНА**

**Институт молекулярной биологии и биохимии
им. М.А. Айтхожина КН МОН РК, г. Алматы**

Проведено исследование распределения генотипов и частот аллелей в 3' нетранслируемой области рецептора гена интерлейкина *IL-13RA1* в позиции 1398 A>G у пациентов, страдающих раком тела матки (РТМ) в двух этнических группах (казахи, русские), проживающих в Казахстане. Распределение генотипов в изученных группах соответствует равновесию Харди-Вайнберга. Статистически достоверных различий в распределении генотипов и частотой аллелей между онкологическими больными и здоровыми в русской и казахской этнических группах не было выявлено. Обнаружены достоверные и значительные различия в распределении генотипов ($\chi^2=31,52$; $p<0,0001$) и частотах аллелей ($\chi^2=22,59$; $p<0,0001$) локуса 1398 A>G гена *IL-13RA1* между группами здоровых представителей казахской и русской национальности.

Введение

В настоящее время интенсивно обсуждается представление, согласно которому снижение функциональности иммунной системы способствует возникновению онкологических заболеваний, а гиперфункция провоцирует аутоиммунные процессы. Показано, что лица, предрасположенные к аллергическим заболеваниям, имеют сниженную частоту большинства онкологических заболеваний по сравнению с популяцией в целом [1, 2]. Интерлейкины (ИЛ) являются участниками сложных процессов, протекающих как при онкологических, так и аллергических и аутоиммунных заболеваниях. Интерлейкины входят в группу генов медиаторов внутриклеточных взаимодействий - цитокинов и взаимодействуют с клетками-мишениями через специфические рецепторы на их поверхности. Ген *IL-13* расположен на хромосоме 5q31-33 tandemно в одном кластере с генами *IL-4*, *IL-5*, *IL-9* и ответственен за синтез белка, который продуцируется активированными Т-лимфоцитами и макрофагами. Белок IL-13 является мощным модулятором активности макрофагов и В-клеток, подобно IL-4, но, в отличие от IL-4, не имеет прямого биологического влияния на Т-клетки. IL-13 оказывает ингибирующий эффект на продукцию других цитокинов, стимулирующих начало воспалительного процесса и изучен в значительно меньшей степени по сравнению с *IL-4*. Действие цитокинов осуществля-

ется путем их взаимодействий со специфическим мембранным рецептором клетки-мишени. Важность полиморфизма генов рецепторов в детерминации иммунного ответа впервые описана при изучении миссенс-мутации Gln551Arg гена альфа-цепи рецептора *IL-4*, *IL4RA* [3].

В связи с участием продукта гена *IL-13* в иммунологических реакциях существует возможность того, что генетические вариации в гене его рецептора *IL-13RA1*, могут также влиять на развитие заболеваний, связанных как с онкологическими, так и с аутоиммунными нарушениями.

Проблемы в изучении мультифакторных заболеваний, к которым относится рак тела матки (РТМ), определяются участием в их развитии сочетания внешних факторов (окружающая среда, питание, образ жизни, вредные привычки, токсические экзогенные воздействия) и генетической предрасположенности. Сложность исследования генетической предрасположенности определяется разнообразием полиморфных вариантов многих изучаемых генов, вовлеченных в развитие патологии, среди представителей различных национальностей и этнических групп. Определение роли первой группы факторов риска проводится путем эпидемиологических исследований. Исследование генетической предрасположенности осуществляется в настоящее время двумя способами. Первый заключается в проведении полного анализа генома с целью обнаружения

участков хромосом, сцепленных с заболеванием. Второй подход основан на сравнении частот полиморфных вариантов генов-кандидатов, отобранных на основании их функций в группе пациентов и в группе здоровых индивидуумов. Обязательным требованием, исполнение которого гарантирует адекватность полученных результатов, является репрезентативность выборки контроля, т.е. максимальное соответствие в группах сравниваемых здоровых лиц и тестируемыми больными по таким параметрам как пол, возраст и этническая принадлежность. Необходимо отметить, что этническая принадлежность является одной из основных составляющих разнообразия характерных полиморфных вариантов. В настоящее время сформировался новый раздел генетики - этногеномика, описывающий, в частности, распространенность и своеобразие генотипов, специфичных и характерных для конкретных расовых, национальных и этнических групп.

В настоящей работе представлены результаты исследования ассоциации полиморфизма 1398 A>G гена рецептора *IL-13RA1* с раком тела матки в казахской и русской группах, а также сравнение частот полиморфизма среди здоровых лиц представителей двух основных национальностей, проживающих в РК - казахов и русских методом «случай-контроль».

Материалы и методы

В качестве материала исследования использована венозная кровь, полученная от 82 пациентов городского онкологического диспансера г. Алматы с диагнозом рака тела матки (РТМ) и от 137 здоровых доноров г. Алматы без клинических проявлений семейного анамнеза по онкологическим заболеваниям. ДНК выделяли с использованием китов «Axygen», США. Последовательность олигонуклеотидных праймеров к исследуемому участку подбирали при помощи программы Primer-Express, в соответствии данным геномных баз ENSEMBL и NCBI. Тестирование полиморфизма гена *IL-13RA1* проводили с использованием варианта полимеразой цепной реакции (ПЦР-ПДРФ) - анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Реакция амплификации проходила согласно следующему протоколу: первичная денатурация 2 мин при 94°C, 35 циклов по схеме: 40 сек при 95°C, 40 сек при 55°C, 50 сек при 72°C, конечная элонгация в течение 10 мин при 72°C. Использованы праймеры

следующих нуклеотидных последовательностей: 5'-GAA AGC CTC TCA GTG ATG GAG-3' (прямой) и 5'-GAG GTG CCT GTT AAA TGG-3' (обратный). После амплификации и рестрикции, проведенной с использованием рестриктазы *MseI* (аналог *Tru9I*), проводили электрофоретическое разделение продуктов в 8% полиакриламидном геле при силе тока 40 mA в течение 2-3 часов. Достоверность различий оценивали с помощью критерия χ^2 . Рассчитывали отношение шансов – odds ratio (OR) для наблюдаемых аллелей и генотипов. Распределение частот генотипов в исследуемых популяциях проверяли на соответствие уравнению Харди-Вайнберга. Для обработки данных и использовали программу Microsoft Excel и Statistica 2005.

Результаты и обсуждение

В результате амплификации фрагмента гена рецептора *IL-13RA1* синтезируется ампликон длиной 140 п. н. Синтезированный продукт имеет два сайта узнавания для рестриктазы *MseI* (*Tru9I*). В результате полной рестрикции образуются и электрофоретически детектируются фрагменты, размером 17, 29, 94 п.н., которые соответствуют генотипу AA. Гомозиготы по аллелю G после рестрикции формируют два фрагмента 17 и 123 п.н. Гетерозиготный вариант представлен комбинацией всех приведенных выше фрагментов - 17, 29, 94, 123 п.н.

В таблице 1 приведены данные по распределению аллелей и генотипов в русской этнической группе.

Данные расчеты описывают мультиплективную и общую модель наследования, так как в наших выборках выполнялись условия равновесия Харди-Вайнберга и для случаев, и для контролей. Достоверных различий обнаружено не было, более того группы, пациентов и контроля совпадали полностью по распределению аллелей и генотипов в данном полиморфном локусе.

В казахской этнической группе отклонения от равновесия Харди-Вайнберга между контрольной выборкой и пациентами также не было обнаружено. Для повышения достоверности анализа генотипов были дополнительно использованы мультиплективная и общая модели наследования. Результаты статистической обработки, полученные с использованием данных моделей, приведены в таблице 2. Использование теста Кохрана (расширенный вариант теста Мак-

Таблица 1. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма 1398 A>G гена *IL-13RA1* у больных РТМ в русской этнической группе

Аллели/ генотипы	Частота встречаемости		OR	CI (95%)	χ^2	P
	Пациенты	Контроль				
A	0,909	0,907	1,02	0,41 – 2,56	0,00	0,97
G	0,091	0,093	0,98	0,39 – 2,46		
AA	0,855	0,852	1	0,35 – 2,95	0,00	1,02
AG	0,109	0,111	0,98	0,30 – 3,25		
GG	0,036	0,037	0,98	0,13 – 7,23		

Таблица 2. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма 1398 A>G гена *IL-13RA1* у больных РТМ в казахской этнической группе

Аллели/ генотипы	Частота встречаемости		OR	CI (95%)	χ^2	P
	Пациенты	Контроль				
A	0,571	0,589	0,93	0,40 – 2,15	0,03	0,86
G	0,429	0,411	1,08	0,47 – 2,49		
AA	0,429	0,321	1,58	0,48 – 5,25	3,15 (0,03)	0,21 (0,86)
0,286	0,536	0,35	0,10 – 1,24			
GG	0,286	0,143	2,40	0,60 – 9,54		

• – данные χ^2 и P, приведенные в скобках, отражают аддитивную модель расчета

Таблица 3. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма 1398 A>G гена *IL-13RA1* в казахской и русской этнических группах (здоровые)

Аллели/ генотипы	Частота встречаемости		χ^2	P
	Казахи	Русские		
A	0,589	0,917	40,70	< 0,0001
G	0,411	0,083		
AA	0,321	0,872	43,19	< 0,0001
AG	0,536	0,090		
GG	0,143	0,038		

Немара) [4] еще более снижает статистическую значимость наблюдаемых различий, отражая аддитивную модель наследования.

Исследования полиморфизмов в генах интерлейкина 6 и параконазы 1, проведенные нами ранее [5, 6], наряду с исследованиями ряда авторов, посвященных анализу этнических особенностей структурной геномной организации популяций, демонстрируют достоверные различия в распределении некоторых полиморфных вариантов генов.

Согласно данным, приведенным в таблице 3, максимальные значения χ^2 наблюдаются между женщинами. Между мужчинами достоверных различий обнаружено не было (данные не представлены). Разделение группы контроля по признаку пола проводилось в связи с тем, что изучаемый полиморфный сайт расположен на X-хромосоме и мужчины являются носителями гемизиготного аллеля.

Замена в позиции 1398A>G относительно кодона инициации трансляции, расположенная в 3' нетранслируемой области гена *IL-13RA1*, в некоторых работах имеет обозначение 1365A>G. Показано, что ген *IL-13RA1* кодирует низкоафинную субединицу рецептора IL-13, посредством которого происходит взаимодействие IL-13 с клетками-мишениями [7]. При исследовании английской и японской популяций замена в позиции 1398A>G [7] продемонстрировала её связь с повышением уровня иммуноглобулина Е (IgE) в плазме в британской мужской популяции. Так как IgE осуществляет антпаразитарную функцию, обуславливая аллергические реакции, обнаруженная закономерность логически объяснима. В нашем исследовании зависимостей полиморфного сайта с заболеванием не выявлено. Ассоциации локуса 1398A>G с аллергическими заболеваниями и астмой в ранее проведенных зарубежных исследованиях также не обнаружено [7, 10]. Меж-

ду тем, белок IL-13RA1 экспрессируется в гематопоэтических и негематопоэтических клетках, включая базофилы, эозинофилы, В-клетки, фибробласты, эндотелиальные клетки, клетки гладкой мускулатуры и некоторые другие [8, 9]. В результате его опосредованного действия происходит активация сигнальных молекул (сигнального трансдуктора, активатора транскрипции 6, субстратов рецептора инсулина 1 и 2), которые могут перемещаться к ядру и связываться со специфическими мотивами промоторных регионов соответствующих генов (главного комплекса гистосовместимости II, CD23 и IL-4RA) [9, 11].

При проведении поиска полиморфных маркеров генопосредованных заболеваний, связанных с нарушениями иммунного ответа, необходим выбор генов цитокинов в соответствии с их направленностью в регуляции иммунного процесса: либо формирование провоспалительных, гиперчувствительных, либо - пониженных проонкогенных реакций, а выявление маркеров, характерных для конкретной этнической группы, является условием повышения достоверности гено-диагностики. Исследования в области популяционной генетики в Казахстане необходимо для выявления маркеров, специфичных для населения РК с целью использования полиморфных участков генов в предиктивной медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beaglehole R., Bonita R., Kjellstram T. In: Basic Epidemiology, 1993.-P.78.- Publisher: World Health Organization, 183 p.
2. Linos E., Raine T., Alonso A. et al. Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis // Natl Cancer Inst.-2007.- V.17.- P.1544-50., Epub.
3. Hershey G. K. K., Friedrich M. F., Esswein L. A. et al. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the a-subunit of the interleukin-4 receptor // New Eng. J. Med. – 1997. – V. 337. – P. 1720-1725.
4. www.statsoft.ru/Nonparametrics/Kochren.htm
5. Нигматова В.Г., Хансеитова А.К., Мендеш М.А., Черущева А.С., Балмукhanov Т.С., Айтхожина Н.А. Полиморфизм промоторной области гена интерлейкина-6 при рассеянном склерозе в казахской и русской этнических группах Казахстана // Известия НАН РК. Серия биол. -2010.-№4.-С.67-71.
6. Хансеитова А.К., Нигматова В.Г., Чиркин А.П., Мирошиник Т.Н., Айтхожина Н.А. Предрасположенность к рассеянному склерозу и вариабельность гена параоксаназы 1 в Казахстане. Известия НАН РК, 2007, №6.
7. Heinzmann A., Mao X.Q., Akaiwa M., et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy // Hum. Mol. Genet.- 2000.- V.9.- P.549–559.
8. Wiemels J.L., Wiencke J.K., Sison J.D. History of allergies among adults with glioma and controls. Int J Cancer.- 2002.- V.1,98(4).-P.609-15., Epub.
9. Wills-Karp M. IL-12/IL-13 axis in allergic asthma // J. Allergy Clin. Immunol.- 2001.- V.107.- P. 9-18.
10. Ahmed S., Ihara K., Sasaki Y., et al. Novel polymorphism in the coding region of the IL-13 receptor 6' gene: association study with atopic asthma in the Japanese population // Exp. Clin. Immunogenet.- 2000.- V.17.- P.18-22.
11. Nelms K., Keegan A.D., Zamorano J. et al. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions // Ann. Rev. Immunol.- 1999.-V.17.- P.701-738.

References

1. Beaglehole R., Bonita R., Kjellstram T. *Basic Epidemiology*, 1993, p.78.
2. Linos E., Raine T., Alonso A. *Natl Cancer Inst.*, 2007, 17, 1544-1550.
3. Hershey G. K. K., Friedrich M. F., Esswein L. A. *New Eng. J. Med.* 1997, 337, 1720-1725.
4. www.statsoft.ru/Nonparametrics/Kochren.htm
5. Нигматова В.Г., Хансеитова А.К., Мендеш М.А., Черущева А.С., Балмукханов Т.С., Айтхожина Н.А. *Izvestia NAN RK. Seriya biol.*, 2010, 4, 67-71 (in Russ.).
6. Хансеитова А.К., Нигматова В.Г., Чиркин А.П., Мирошиник Т.Н., Айтхожина Н.А. *Izvestia NAN RK*, 2007, 6 (in Russ.).
7. Heinzmann A., Mao X.Q., Akaiwa M. *Hum. Mol. Genet.*, 2000, 9, 549-559.
8. Wiemels J.L., Wiencke J.K., Sison J.D. *Int. J. Cancer*, 2002, 1, 98(4), 609-615.
9. Wills-Karp M. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, 107, 9-18.
10. Ahmed S., Ihara K., Sasaki Y. *Exp. Clin. Immunogenet.*, 2000, 17, 18-22.
11. Nelms K., Keegan A.D., Zamorano J. *Ann. Rev. Immunol.*, 1999, 17, 701-738.

Резюме

Қазақстанда тұратын екі этникалық (казак, орыс) топтарындағы жатыр денесінің рагымен (ЖДР) ауыратын адамдардың интерлейкин IL-13RA1 рецептор гені 1398 A>G позициясының 3' тасымалданбайтын облысындағы генотиптері мен аллельдердің таралу жиіліктеріне зерттеу жүргізілді. Зерделенген топтарда генотиптердің таралуы Харди-Вайнберг тәпеп-тәндігіне сәйкес келеді. Дені сау орыс және қазақ этникалық топтары және обырмен ауыратын адамдар топтары арасында генотиптері мен аллельдерінің таралу жиіліктерінде нақты статистикалық айырмашылықтары анықталынбады. Дені сау орыс және қазақ топтары арасында IL-13RA1 гені 1398 A>G локусының генотиптері ($\chi^2=31,52$; $p<0,0001$) мен аллельдердің таралуында ($\chi^2=22,59$; $p<0,0001$) нақты айырмашылықтары айқындалды.

Summary

The investigation of genotypes distribution and alleles frequency in 3'nontranslated region of gene interleukin's receptor IL-13RA1 in 1398 A>G position in carcinoma of uterus patients of two ethnic groups (Kazakhs and Russians) inhabiting Kazakhstan was performed. The genotypes distribution in investigated groups was found to be in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium. The statistically significant differences in genotypes distribution and allele's frequency between oncological patients and healthy persons in Kazakh and Russian groups were not observed. The significant and considerable differences were found in genotypes distribution ($\chi^2=31,52$; $p<0,0001$) and alleles frequency ($\chi^2=22,59$; $p<0,0001$) of IL-13RA1 gene's 1398 A>G locus between groups of healthy persons of Kazakh and Russian nationality.