

УДК 577.21:577.2

В.Г. НИГМАТОВА, М.А. МЕНДЕШ,
А.С. ЧЕРУШЕВА, Т.С. БАЛМУХАНОВ, Н.А. АЙТХОЖИНА

ПОЛИМОРФИЗМ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 ПРИ РАКЕ ТЕЛА МАТКИ В РУССКОЙ И КАЗАХСКОЙ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУППАХ КАЗАХСТАНА

Проведено исследование полиморфизма промоторной области гена интерлейкина-6 (*ИЛ-6*) в позиции -634 G/C у пациентов, страдающих раком тела матки в русской и казахской этнических группах. Обнаружены статистически достоверные различия в распределении частот аллелей ($\chi^2=8,43$; $p=0,0036$) и генотипов ($\chi^2=6,82$; $p=0,0090$) между онкологическими больными и здоровыми в русской этнической группе. Показаны достоверные различия в распределении частот аллелей ($\chi^2=15,09$; $p=0,0001$) и генотипов ($\chi^2=14,24$; $p=0,0008$) в группах здоровых русских и казахов по полиморфному сайту -634 G/C гена *ИЛ-6*.

Введение. Злокачественные опухоли репродуктивных органов являются одними из наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований у женщин. Наиболее распространенными формами злокачественных новообразований являются рак шейки матки и рак тела матки (РТМ) [1]. Следует отметить, что возникновение рака шейки матки связано с наличием вируса папилломы человека. В то время как, РТМ наблюдается чаще у женщин старше 50 лет и в его развитии большое значение придают нарушению гормонального баланса (снижению содержания эстрогенов, связанного с наступлением менопаузы) являющегося генетически-детерминированным показателем.

В сложном каскаде иммунологических процессов, определяющих развитие онкопатологии, значимую роль выполняет интерлейкин 6 (*ИЛ-6*), обозначаемый так же как интерферон бета-2 – один из наиболее активных цитокинов, участвующих в реализации иммунного ответа и воспалительной реакции [2]. На начальных этапах опухолевой трансформации *ИЛ-6* выступает в роли провоспалительного цитокина, поддерживающего процесс, позднее секретируется самими опухолевыми клетками, кроме того, *ИЛ-6* является фактором роста для некоторых опухолей [3,4]. Регуляция транскрипции гена *ИЛ-6* локализованного на коротком плече 7-й хромосомы, и состоящего из 5 экзонов и 4 инtronов, довольно сложна [5]. В промоторной области гена расположены сайты связывания нескольких транскрипционных факторов (NFIL6, NFkB, Fos/Jun, CRBP). В процессе регуляции транскрипции принимают участие также стероидные гормоны (глюкокор-

тикоиды и эстрогены), которые путем образования комплексов, взаимодействующих с транскрипционными факторами, регулируют экспрессию гена. Имеются также данные, указывающие на то, что вблизи участка -634 промотора гена *ИЛ-6* находится потенциальный сайт связывания для онкобелка c-myc, который также может изменять транскрипцию гена [6]. Кроме этого, экспрессия гена определяется аллельными вариантами (полиморфизмами), расположенными в промоторе, что в свою очередь обуславливает индивидуальные различия в восприимчивости или устойчивости к заболеванию [7]. Участок -634 области гена *ИЛ-6* выбран в качестве объекта исследования в связи с тем, что он расположен в промоторной области и замены, происходящие в нем, могут оказывать влияние на функциональную активность гена.

Целью настоящей работы является исследование полиморфизма гена *ИЛ-6* в позиции – 634 у больных РТМ в казахской и русской этнических группах.

Материалы и методы

Материалом в исследовании была венозная кровь, полученная от 137 здоровых доноров г. Алматы без клинических проявлений семейного анамнеза по онкологическим заболеваниям, и от 82 пациентов, с диагнозом РТМ (городской онкологический диспансер г. Алматы). ДНК выделяли из крови, используя наборы производства компании «Axygen» (США). Последовательность олигонуклеотидных праймеров к исследуемому участку подбирали при помощи программы Primer-Express, согласно последовательностям,

Таблица 1. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма rs 1800796 гена ИЛ-6 у больных раком тела матки в русской этнической группе

Аллели/генотипы	Частота встречаемости		OR	CI (95%)	χ^2	P
	Онкологические больные	Контроль				
G	0,889	0,753	2,564	1,318 – 4,988	8,431	0,0036
C	0,111	0,247	0,390	0,200 – 0,759		
GG	0,778	0,545	2,852	1,366 – 5,951	6,820	0,0090
GC	0,222	0,416	0,410	0,196 – 0,858		
CC	0,000	0,039	0,168	0,008 – 3,307		

полученным из геномных баз данных ENSEMBL и NCBI. Анализ вариабельных участков гена осуществляли с использованием разновидности метода на основе полимеразой цепной реакции (ПЦР) – RFLP (restriction fragments length polymorphism). Реакцию амплификации проводили согласно следующему протоколу: первичная денатурация -95°C -3 мин, затем 40 циклов по схеме: 95°C – 45 сек., 48°C – 45 сек., 72°C- 1мин, конечная элонгация 72°C – 10 мин. В амплификации нами использованы прямой праймер с нуклеотидной последовательностью: 5'-GAGACGCCTTGAAGTAAGT-3' и обратный праймер следующего состава: 5'-AACCAAAGATGTTCTGAAGT-3'. После амплификации и рестрикции *BsrBI* проводили электрофоретическое разделение продуктов в 8 % акриlamидном геле при средних силах тока 40 мА и напряжении 150 В в течение 2-3 часов. Достоверность различий оценивали с помощью критерия χ^2 . Наблюдаемое распределение частот генотипов исследуемых популяций проверяли соответственно распределения Харди-Вайнберга. Для обработки данных и получения графического изображения использовали программу Microsoft Excel и Statistic 2005.

Результаты и обсуждение

Полиморфный вариант гена ИЛ-6 – rs 1800796 (согласно номенклатуре базы данных NCBI) впервые одновременно обнаружен двумя группами ученых и имеет поэтому в литературе обозначения -634 C/G, по месту расположения относительно ATG кодона первого экзона [7] и -573 G/C, так как нумерация проводилась относительно начала сайта транскрипции [6]. В результате амплификации синтезируется фрагмент дли-

ной 180 пн, который содержит, кроме полиморфизма rs 1800796, отобранного нами для исследования, еще четыре однонуклеотидные замены: rs1800797, rs 75095200, rs56077270 и rs 36215461. Специфический сайт рестрикции GAGⁿCGG рестриктазы *BsrBI* присутствует только в районе полиморфизма rs 1800796, в связи с чем, в результате электрофоретического анализа рестрированных фрагментов формируются однозначные паттерны или сочетания полос. В исследованных образцах ДНК здоровых и больных лиц выявлены гомозиготные по наличию сайта рестрикции носители аллеля G, представленные двумя фрагментами (размерами 120 и 60 пн), носители аллеля C – гомозиготные по отсутствию сайта рестрикции (один фрагмент размером 180 пн) и гетерозиготные носители C и G аллелей (три фрагмента размерами 180, 120 и 60 пн). Данные, описывающие распределение частот аллелей и генотипов в русской подгруппе, представлены в таблице 1, распределение частот генотипов укладывается в равновесие Харди-Вайнберга.

Полученные результаты демонстрируют повышение частоты аллеля G у онкологических больных в сравнении с группой здоровых. Статистическая достоверность этих различий подтверждается рассчитанными значениями χ^2 и P. Значение отношения шансов (OR – odds ratio) указывает на двукратное увеличение статистического риска развития РТМ для носителей аллеля G, а гомозиготность по G аллелю повышает данный показатель до 2,8. Генотип CC не обнаружен в группе онкологических больных, а доля гомозиготных носителей G аллеля в этой группе повышена по сравнению с группой здоровых. В группе онкологических больных отмечено почти двукратное уменьшение доли гетерозигот в срав-

Таблица 2. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма rs 1800796 у больных раком тела матки в казахской этнической группе

Аллели/генотипы	Частота встречаемости аллелей и генотипов		OR	CI (95%)	χ^2	P
	Онкологические больные	Контроль				
G	0,579	0,673	0,669	0,314-1,426	1,080	0,2965
C	0,421	0,327	1,495	0,701-3,188		
GG	0,263	0,491	0,370	0,117-1,170	2,388	0,1223
GC	0,632	0,364	3,000	1,017-8,852		
CC	0,105	0,145	1,447	1,279-7,502		

нении с контрольной группой, что, может быть, связано с преимуществом гетерозиготного генотипа в отношении вероятности возникновения РТМ.

Проведение популяционно-генетических исследований, одним из условий достоверности которых является этническая гомогенность, в г. Алматы затрудняется национальным разнообразием и большим количеством смешанных браков. В исследовании при составлении выборки больных казахской этнической группы количество пациентов, у которых родители являлись казахами, было недостаточным для того, чтобы распределение генотипов укладывалось в равновесие Харди-Вайнберга. Поэтому с целью увеличения размеров выборки в группу казахов включены потомков смешанных браков, у которых один из родителей – казах. Результаты определения распределения генотипов и частот аллелей, полученных для данной выборки, представлены в таблице 2. В казахской этнической группе статистически значимые различия между больными РТМ и здоровыми не обнаружены, что подтверждается значениям χ^2 и P.

В некоторых мировых популяциях, так же как, вероятно, и в казахской этнической группе, G аллель не является единственным маркером заболевания и имеет прогностическую ценность в сочетании с дополнительными параметрами. Так, у женщин из популяции Китая, присутствие G аллеля трехкратно повышает риск возникновения онкологических заболеваний у страдающих астмой, но не увеличивает частоту возникновения рака легких у здоровых [8]. Исследование, проведенное среди японских женщин, показало связь аллеля G с риском развития эндометриоза только у гомозиготных носителей ЕЕ аллеля гена ICAM-1(intracellular adhesion molecule-1) [9]. Отсутствие связи частот аллеля G с РТМ в группе казахов может быть связано с тем, что изучас-

тый полиморфный сайт находится в неравновесном сцеплении с другим(и) генетическими маркерам(и). Данные, полученные при анализе полиморфизмов в казахской группе, являются предварительными и обуславливают необходимость как увеличения размеров testируемой выборки для больных РТМ, так и поиском возможной связи данного полиморфизма с другими маркерами, ассоциированными с развитием РТМ.

Группа контроля в нашей работе, в соответствии с правилами исследований «случай-контроль», состояла только из женщин. Для изучения популяционных особенностей в распределении аллельных вариантов гена ИЛ-6 мы включили в группы контроля здоровых мужчин и сравнили полученные выборки. Частоты встречаемости аллелей и генотипов статистически достоверно различаются между исследованными этническими группами ($\chi^2=15,092$; $p=0,0001$ для аллелей, $\chi^2=14,237$; $p=0,0008$ для генотипов). Существование различий такого рода подразумевает необходимость учёта этнических особенностей при диагностике заболевания, а также при терапевтическом использовании и клинических испытаниях фармацевтических препаратов, создаваемых на основе широко используемого интерлейкина 6 (бета-интерферона-2).

Тестирование полиморфных сайтов генов, ассоциированных с мультигенными, в том числе онкологическими заболеваниями, признано перспективным и является необходимым направлением исследований в современной молекулярной генетике. Исследования, описывающие генетическую гетерогенность населения, особенно важны для Казахстана в связи с многонациональным характером его населения и, в соответствии с этим, необходимостью обязательного учёта национальных генетических особенностей, как при диагностике заболеваний, так и при выборе индивидуальных подходов к лечению.

Авторы выражают искреннюю благодарность специалистам Городского онкологического диспансера г. Алматы – главному врачу Д.Р. Кайдаровой, зав. отделением С.М. Акимжановой, врачу высшей категории Т.А. Югай, благодаря участию которых стало возможным проведение представленного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Двойрин В., Аксель Е., Трапезников Н. Заболеваемость от злокачественных новообразований населения России и некоторых других стран СНГ в 1993 г. М.: Медицина, 1995. 15 с.
2. Heinrich P., Castell J., Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response // Biochem J. 1990. № 265. P.621–636.
3. Akira S., Taga T., Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine // Adv. Immunol. 1993. № 54. P.1–78.
4. Bukowski R. Natural history and metastatic RC // Cancer. 1997. Vol. 80, P. 1198–1220.
5. Sehgal P. Regulation of IL6 gene expression // Res Immunol. 1992 №143. P.724–734.
6. Osiri M., McNicholl J., Moreland LW., et al. A novel single nucleotide polymorphism and five probable haplotypes in the 5' flanking region of the IL-6 gene in African-Americans // Genes Immun. 1999. Nov; 1(2), P.166–167.
7. Nakajima T., Ota N., Yoshida H., et al. Allelic variants in the interleukin-6 gene and essential hypertension in Japanese women // Genes Immun. 1999. Nov; 1(2) P.115–119.
8. Seow A., PK Ng D., Choo S., et al. Joint effect of asthma/atopy and an IL-6 gene polymorphism on lung cancer risk among lifetime non-smoking Chinese women // Carcinogenesis. 2006. Vol.27 (6), P.1240–1244.
9. Kitawaki J., Kiyomizu M., Obayashi H., et al. Synergistic effect of interleukin-6 promoter (IL6 -634C/G) and intercellular

adhesion molecule-1 (ICAM-1 469K/E) gene polymorphisms on the risk of endometriosis in Japanese women // Am J Reprod Immunol. 2006. Oct; 56(4). P.267–274.

Резюме

Қазақ және орыс этникалық топтарында жатыр денесі рагымен ауыратын адамдарының интерлейкин 6 (*IL-6*) гені промоторлық аймағы полиморфизміне -634 C/G позициясы бойынша зерттеу жүргізілді. Орыс этникалық тобының онкологиялық дерптке шалдықкан және дені сау адамдар арасындағы аллельдері ($\chi^2 = 8,43$; $p=0,0036$) мен генотиптері ($\chi^2 = 6,82$; $p=0,0090$) тарапу жиіліктерінің статистикалық нақты айырмашылықтары анықталынды. *IL-6* гені -634 C/G полиморфтық сайты бойынша дені сау қазақ және орыс топтарының аллельдері мен генотиптері тарапу жиіліктерінің нақты айырмашылықтары көрсетілді.

Summary

The polymorphism of promoter region of interleukin-6 (*IL-6*) gene in the position -634 G/C was investigated in cancer of uterus patients in Kazakh and Russian ethnic groups. The statistically significant differences were found in the distribution of alleles frequencies ($\chi^2 = 8,43$; $p = 0,0036$) and genotypes between oncological and healthy patients in Russian ethnic group. The significant differences were shown in the distribution of alleles frequencies ($\chi^2 = 15,09$; $p = 0,0001$) and genotypes of polymorphic site -634 G/C of *IL-6* gene in groups of healthy Russians and Kazakhs.

*Институт молекулярной биологии
и биохимии им. М.А. Айтхоясина
г. Алматы*

Поступила 30.07.2010 г.