

АНТИТЕЛА К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ И ЭСТРАДИОЛУ И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ ПРИ РАКЕ ЛЁГКОГО У МУЖЧИН

© 2018 г. А. Н. Глушков^{1,2*}, Е. Г. Поленок¹, Л. А. Гордеева¹, С. А. Мун¹, М. В. Костянко²,
В. А. Титов³, Е. Н. Воронина⁴, А. И. Рогозин²,
А. И. Волошина², И. И. Вафин⁵, С. Е. Рагожина⁵

*E-mail: ihe@list.ru

¹ФГБНУ Федеральный исследовательский центр угля и углехимии
СО РАН (Институт экологии человека), Кемерово, Россия;

²ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия;

³ГБУЗ КО Областной клинический онкологический диспансер, Кемерово, Россия;

⁴ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия;

⁵ГКУЗ КО Кемеровский областной центр крови, Кемерово, Россия

Поступила: 14.02.2017. Принята: 25.12.2017

Исследовали особенности образования антител к бензо[а]пирену и эстрадиолу (IgG-Вр, IgG-Es) у носителей полиморфных вариантов генов *IL1B*(rs1143634, rs16944), *IL1RN*(VNTR, интрон 2), *IL4* (VNTR, интрон 3), *IL6* (rs1800795), *IL10* (rs1800896) и *TNFA* (rs1800629, rs361525) у 228 курящих здоровых мужчин и 657 больных немелкоклеточным раком лёгкого (НМРЛ). Искомые взаимосвязи с НМРЛ обнаружены только с полиморфизмом гена *TNFA* (rs1800629). Риск НМРЛ у носителей генотипа GG оказался повышенным (OR = 1,1–2,3; p = 0,007), а у носителей генотипа GA – пониженным (OR = 0,4–0,9; p = 0,01). При одновременном отсутствии IgG-Вр и IgG-Es риск НМРЛ был пониженным (OR = 0,5; p = 0,0002), а при одновременном образовании IgG-Вр и IgG-Es риск НМРЛ возрастал (OR = 2,8; p = 0,0001). Образование IgG-Вр и IgG-Es было ассоциировано с полиморфизмом гена *TNFA*(rs361525) у здоровых мужчин (p = 0,007), а у больных НМРЛ – с полиморфизмом генов *IL1RN*(VNTR) (p = 0,003) и *IL1B*(rs16944) (p = 0,007). Впервые обнаружены взаимосвязи специфических иммунных реакций на химические канцерогены и эндогенные стероиды с генетическими полиморфизмами цитокинов. Показана высокая информативность иммуноанализа IgG-Вр и IgG-Es в сочетании с молекулярно-генетическим анализом цитокинов.

Ключевые слова: рак легкого, антитела, бензо[а]пирен, эстрадиол, полиморфизмы генов

DOI:

Адрес: 650065, г. Кемерово, пр. Ленинградский, д.10. Тел./факс: (3842)575079, Глушков Андрей Николаевич.

E-mail: ihe@list.ru

Авторы:

Глушков А.Н., д.м.н., профессор, директор Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, Кемерово, Россия;

Поленок Е.Г., к.фарм.н., заведующая лабораторией иммунохимии Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, Кемерово, Россия;

Гордеева Л.А., к.б.н., заведующая лабораторией иммуногенетики Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, Кемерово, Россия;

Мун С.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, Кемерово, Россия;

Костянко М.В., ведущий инженер кафедры органической химии Института фундаментальных наук ФГБОУ ВО “Кемеровский государственный университет”, Кемерово, Россия.

Титов В.А., заведующий торакальным отделением в ГБУЗ КО “Областной клинический онкологический диспансер”, Кемерово, Россия;

Воронина Е.Н., к.б.н., научный сотрудник лаборатории фармакогеномики ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН”, Новосибирск, Россия;

Рогозин А.И., магистр кафедры генетики Института биологии, экологии и природных ресурсов ФГБОУ ВО “Кемеровский государственный университет”;

Волошина А.И., магистр кафедры генетики Института биологии, экологии и природных ресурсов ФГБОУ ВО “Кемеровский государственный университет”, Кемерово, Россия;

Вафин И.А., главный врач ГКУЗ КО “Кемеровский областной центр крови”, Кемерово, Россия;

Рагожина С.Е., заместитель главного врача по медицинской части ГКУЗ КО “Кемеровский областной центр крови”, Кемерово, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно классической модели химического канцерогенеза [1] злокачественная трансформация клеток происходит при совместном воздействии генотоксикантов окружающей среды, частности, бензо[а]пирена (Вр) и эндогенных промоторов, в частности эстрадиола (Es). Известно, что полициклические ароматические углеводороды, в том числе, и Вр проявляют эффекты, схожие с эстрогенами [2]. Показана важная роль эстрогенов в возникновении немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) [3, 4]. В связи с этим роль антител (АТ) против Вр и Es (IgG-Вр, IgG-Es) в патогенезе НМРЛ представляет определённый интерес. Экспериментами *in vitro* и *in vivo* установлено, что указанные АТ способны модулировать канцерогенные эффекты Вр и Es [5–10]. Однако, особенности образования IgG-Вр и IgG-Es у больных НМРЛ изучены недостаточно. Остаются неизвестными генетические механизмы иммунных реакций на указанные химические соединения в норме и при патологии, в том числе при НМРЛ. Очевидными регуляторами образования АТ против Вр и Es представляются цитокины. Ассоциация последних с онкологическими заболеваниями изучались ранее [11–15]. В то же время, влияние генетического полиморфизма цитокинов на содержание АТ против экзогенных химических канцерогенов и эндогенных стероидных гормонов за рамками этих исследований.

Цель настоящей работы – исследовать особенности образования IgG-Вр и IgG-Es у носителей полиморфных вариантов генов *IL1B*(rs1143634, rs16944), *IL1RN*(VNTR, интрон 2), *IL4* (VNTR, интрон 3), *IL6* (rs1800795), *IL10* (rs1800896) и *TNFA* (rs1800629, rs361525) у курящих здоровых мужчин и больных НМРЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами были обследованы 885 курящих мужчин. В исследуемую группу были включены 657 мужчин с диагнозом немелкоклеточный РЛ, которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз РЛ в каждом случае был подтвержден морфологически, рентгенологически и эндоскопически. В группу сравнения были включены 228 условно здоровых мужчин с Кемеровского центра крови, не болеющие РЛ и другими заболеваниями дыхательных путей. Все обследуемые мужчины были старше 40 лет.

Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинской декларацией 2000 г. и “Правилами клинической практики в Российской Федерации”, утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем.

Иммуноанализ АТ к Вр и Es (IgG-Вр, IgG-Es) проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа, подробная методика описана в работе [15]. В качестве антигенов на полистирольные иммунологические планшеты были иммобилизованы конъюгаты Вр и Es с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Конъюгат Вр- BSA был синтезирован по методике, описанной ранее [15]. Конъюгат Es-BSA был синтезирован путем присоединения BSA к эстрадиолхинонам, полученным окислением Es солью Фреми. Иммунологические планшеты сенсibilizировали конъюгатами гаптен-BSA в течение ночи при комнатной температуре. Образцы сыворотки крови в разведении 1:100 вносили по 100 мкл. в лунки планшета в дублях, инкубировали 1 ч. при 37 °С на шейкере. Связавшиеся АТ выявляли с помощью козьих АТ против IgG человека, меченных пероксидазой хрена (Novex, США), разведение конъюгата 1:10000. Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводили с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметилбензидин (ТМБ, США), на фотометре (Пикон, Россия) при длине волны 450 нм. Уровни АТ выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

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

где X = Вр, Es, $\text{OD}_{X\text{-BSA}}$ – связывание АТ с конъюгатом гаптен-BSA, OD_{BSA} – фоновое связывание с BSA.

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

В работе исследовали содержащиеся однонуклеотидные замены (SNP) варианты генов: *IL1B*+3953C > T (rs1143634), *TNFA*-308G > A (rs1800629), *TNFA*-238G > A (rs361525), *IL6*–174G > C (rs1800795), *IL10*–1082G > A (rs1800896), и минисателлитные маркеры, характеризующиеся различным числом tandemных повторов (VNTR), во 2 интроне гена *IL1RN* и в 3 интроне гена *IL4*.

Таблица 1. Праймеры и зонды для определения нуклеотидной последовательности полиморфизма в генах *TNFA* (rs361525) и *IL10* (rs1800896)

полиморфизм	праймеры	последовательность праймеров	последовательность зондов
<i>TNFA</i> (rs361525)	прямой	5'-GTCCTACACACAAATCAGTCAGT-3'	5'-Fam-TCCTCCCTGCTCtGATTC-BHQ-3'
	обратный	5'-TTGGGGACACACAAGCATCA-3'	5'-R6G-TCCTCCCTGCTCcGATTC-BHQ-3'
<i>IL10</i> (rs1800896)	прямой	5'-CACAAATCCAAGACAACAАСТАСТ-3'	5'-R6G-CTTCCCCcTCCCAAAGAAGC -BHQ-3'
	обратный	5'-GATAGGAGGTCCCTTACTTTCC -3'	5'-FAM-CTTCCCCtTCCCAAAGAAGC -BHQ-3'

Типирование полиморфных локусов *TNFA* (rs361525) и *IL10* (rs1800896) проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (RealTime) с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК. Каждый образец амплифицировался с использованием пары специфических праймеров и двух зондов (табл. 1), несущих “гаситель” на 3'-конце и флуоресцентные красители (FAM и R6G) на 5'-конце.

Детальное описание типирования полиморфизма генов *IL1B* (rs1143634), *IL1RN* (VNTR интрона 2), *IL6* (rs1800795), *IL4* (VNTR интрона 3) и *TNFA* (rs1800629) представлено в работе [16]. VNTR аллели гена *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. VNTR аллели гена *IL4* обозначали как: 2R – два tandemных повтора по 70 н.п., 3R – три tandemных повтора.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета статистических программ Statistica 8.0, (StatSoft Inc., USA), GenABEL, Genetics программного обеспечения R-project (www.r-project.org). Соответствие частот генотипов изучаемых генов цитокинов равновесию Харди-Вайнберга (HWE) оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона. Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$. Ненормальный характер распределения количественных показателей определили с помощью критерия Шапиро-Уилка и в дальнейшем статистически значимые различия между группами выявляли с помощью U-критерия Манна-Уитни для независимых выборок и непараметрического критерия χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность вариации. При расчете критерия χ^2 исследуемые показатели группировались в четырехпольную таблицу (d.f. = 1). За критический

уровень значимости принималось значение $p < 0,05$. Для выявления пороговых значений уровней АТ (cut-off) был проведен ROC-анализ [17]. Силу ассоциации АТ и генотипов с НМРЛ оценивали с помощью величины отношения шансов (oddsratio, OR) с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости, полученными на основе логистического регрессионного анализа (функция “glm” программы R). В качестве базовой модели исследовали аддитивную модель наследования признака.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ассоциации полиморфизма генов цитокинов IL1RN, IL1B, IL4, IL6, IL10, TNFA с НМРЛ у курящих мужчин

Распределение частот генотипов для полиморфных локусов *IL1B*(rs1143634, rs16944), *IL1RVNTR*, *IL4 VNTR*, *IL6* (rs1800795), *IL10* (rs1800896) и *TNFA*(rs1800629, rs361525) у здоровых мужчин и больных НМРЛ соответствовало равновесию Харди-Вайнберга ($p > 0,05$). Ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов с предрасположенностью к НМРЛ у курящих мужчин отсутствовали за исключением полиморфизма гена *TNFA*(rs1800629) (табл. 2). Аллель G гена *TNFA* (–308 G > A) был ассоциирован с риском развития НМРЛ (OR = 1,6; 95% CI:1,14–2,32).

Ассоциации антител к бензо[а]пирену и эстрадиолу (IgG-Vp, IgG-Es) с НМРЛ у курящих мужчин

Из всей когорты мужчин с определенными генотипами цитокинов случайным образом выделили группы, в которых исследовали IgG-Vp и IgG-Es, используя полуколичественный метод ИФА (158 здоровых мужчин и 381 больных НМРЛ). С помощью ROC-анализа рассчитали пороговые значения уровней IgG-Vp

Таблица 2. Ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов с предрасположенностью к немелкоклеточному раку легкого (НМРЛ) у курящих мужчин (аддитивная модель)

Полиморфизм	Генотипы	Больные НМРЛ n(f)	Здоровые мужчины n(f)	OR (95%CI); p-value
<i>IL1B</i> (rs1143634)	CC	373 (0,568)	120 (0,566)	0,87
	CT	247 (0,376)	78 (0,368)	
	TT	37 (0,056)	14 (0,066)	
<i>IL1B</i> (rs16944)	CC	298 (0,454)	103 (0,452)	0,97
	CT	276 (0,420)	97 (0,425)	
	TT	83 (0,126)	28 (0,123)	
<i>IL1RN</i> VNTR	*1/*1	325 (0,495)	103 (0,493)	0,82
	*1/*2	254 (0,388)	76 (0,364)	
	*2/*2	58 (0,088)	18 (0,086)	
	*1/*3	13 (0,020)	8 (0,038)	
	*2/*3	6 (0,009)	4 (0,019)	
<i>IL4</i> VNTR	3R/3R	373 (0,586)	106 (0,582)	0,82
	2R/3R	224 (0,352)	63 (0,346)	
	2R/2R	40 (0,063)	13 (0,071)	
<i>IL6</i> (rs1800795)	CC	144 (0,219)	42 (0,185)	0,37
	GC	331 (0,479)	119 (0,524)	
	GG	182 (0,277)	66 (0,291)	
<i>IL10</i> (rs1800896)	AA	226 (0,344)	71 (0,311)	0,36
	GA	315 (0,479)	113 (0,496)	
	GG	116 (0,117)	44 (0,193)	
<i>TNFA</i> (rs1800629)	GG	517 (0,787)	164 (0,725)	1,63 (1,14–2,32); 0,007 (cor 0,035)
	GA	113 (0,202)	58 (0,257)	
	AA	7 (0,011)	4 (0,018)	
<i>TNFA</i> (rs361525)	GG	600 (0,922)	108 (0,931)	0,66
	GA	49 (0,075)	7 (0,069)	
	AA	2 (0,003)	0	

и IgG-Es, по которым сравниваемые группы имели наибольшее различие. Таковыми оказались IgG-Bp = 5; для IgG-Es = 6. Учитывая то, что в каждом образце сыворотки крови возможны различные комбинации низких и высоких уровней исследуемых АТ, сопоставили частоту обнаружения четырёх возможных комбинаций IgG-Bp и IgG-Es у здоровых мужчин и больных НМРЛ. Рассчитали значения OR для каждой из этих комбинаций. Результаты представлены в **табл. 3**.

Выяснилось, что одновременное отсутствие или низкие уровни исследуемых АТ (комбинация 1) у больных НМРЛ встречалось реже, чем у здоровых доноров ($p = 0,0002$). При этом OR снижался до 0,5. Не выявили различий по частоте обнаружения высоких уровней только одного из исследуемых АТ при отсутствии или низком содержании другого (комбинация 2 и 3). Одновременно повышенные уровни

IgG-Bp и IgG-Es (комбинация 4) чаще встречались у больных НМРЛ, чем у здоровых мужчин ($p < 0,0001$). При этом OR возрастал до 2,8.

Таким образом, риск НМРЛ у курящих мужчин оказался сниженным при одновременном отсутствии или низких уровнях и повышенном при одновременном образовании IgG-Bp и IgG-Es.

Ассоциации антител к бензо[а]пирену и эстрадиолу (IgG-Bp, IgG-Es) с полиморфными вариантами генов цитокинов IL1RN, IL1B, IL4, IL6, IL10, TNFA у здоровых мужчин и больных НМРЛ

Рассчитали частоты распределения обнаруженных четырёх комбинаций IgG-Bp и IgG-Es у носителей отдельных полиморфных вариантов генов исследованных цитокинов

Таблица 3. Риски (OR) НМРЛ у курящих мужчин при различных комбинациях низких (\leq) и высоких ($>$) уровней антител против бензо[а]пирена (IgG-Bp) и эстрадиола (IgG-Es)

Комбинации антител	Здоровые мужчины N = 158		Больные НМРЛ N = 381		χ^2 (p)	OR (95%CI)
	n/%	n/%	n/%	n/%		
1. IgG-Bp \leq 5 IgG-Es \leq 6	79/50,0	123/31,3			14,2 (0,0002)	0,5 (0,3–0,7)
2. IgG-Bp $>$ 5 IgG-Es \leq 6	28/17,7	65/17,1			1,9 (0,17)	
3. IgG-Bp \leq 5 IgG-Es $>$ 6	13/8,2	29/7,6			0,7 (0,41)	
4. IgG-Bp $>$ 5 IgG-Es $>$ 6	38/24,1	164/43,0			19,3 (< 0,0001)	2,8 (1,8–4,4)

в сравниваемых группах. Результаты представлены в табл. 4–6.

Искомые ассоциации обнаружены:

– в группе здоровых мужчин с полиморфизмом гена *TNFA* (–238 G > A) с уровнем статистической значимости $p = 0,007$;

– в группе больных НМРЛ с полиморфными вариантами *IL1RN*, *IL1B* (–511 C > T) с $p = 0,003$ и $p = 0,007$ соответственно.

Во всех остальных случаях искомые взаимосвязи не были выявлены. Таким образом, впервые показано, что образование АТ против химических канцерогенов и эндогенных

стероидов может быть детерминировано генетическим полиморфизмом цитокинов.

Ассоциации антител к бензо[а]пирену и эстрадиолу (IgG-Bp, IgG-Es) с НМРЛ у носителей полиморфных вариантов генов IL1RN, IL1B, IL4, IL6, IL10, TNFA

В табл. 4–6 представлены рассчитанные значения OR при сопоставлении частот обнаружения четырёх возможных комбинаций IgG-Bp и IgG-Es у носителей полиморфных вариантов генов исследуемых цитокинов в сравниваемых группах. Выяснилось, что

Таблица 4. Ассоциации низких (\leq) и высоких ($>$) уровней антител против бензо[а]пирена (IgG-Bp) и эстрадиола (IgG-Es) в комбинациях с полиморфными вариантами гена *TNFA* (rs361525) в сравниваемых группах, риски (OR) НМРЛ при сочетании иммуноанализа антител с молекулярно-генетическим анализом

Комбинации антител	Здоровые мужчины N = 157			Больные НМРЛ N = 376			χ^2 (p) OR (95%CI)		
	GG	GA	AA	GG	GA	AA	GG	GA	AA
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%			
1. IgG-Bp \leq 5 IgG-Es \leq 6	75/50,7	3/39,3	1/100	109/31,4	9/32,1	1/100	15,7 (0,0001) 0,4 (0,3–0,7)	0,1 (0,73)	0
2. IgG-Bp $>$ 5 IgG-Es \leq 6	27/18,2	1/11,1	0/0	60/17,3	5/17,9	0/0	2,0 (0,16)	0,0 (0,84)	0
3. IgG-Bp \leq 5 IgG-Es $>$ 6	9/6,1	4/44,4	0/0	27/7,8	2/7,1	0/0	2,5 (0,11)	1,4 (0,23)	0
4. IgG-Bp $>$ 5 IgG-Es $>$ 6	37/25,0	1/11,1	0/0	151/43,5	12/42,9	0/0	18,6 (< 0,0001) 2,8 (1,8–4,5)	0,4 (0,53)	0
χ^2 (p)	17,62 (0,007)			2,19 (0,90)					

Таблица 5. Ассоциации низких (\leq) и высоких ($>$) уровней антител против бензо[а]пирена (IgG-Bp) и эстрадиола (IgG-Es) в комбинациях с полиморфными вариантами гена *ILIRNVNTR* в сравниваемых группах, риски (OR) НМРЛ при сочетании иммуноанализа антител с молекулярно-генетическим анализом IL

Комбинации антител	Здоровые мужчины N = 153			Больные НМРЛ N = 380			χ^2 (p) OR (95%CI)		
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*1	*1/*2	*2/*2
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%			
1. IgG-Bp \leq 5 IgG-Es \leq 6	40/56,3	23/45,1	2/22,2	66/36,5	52/31,7	2/10,5	7,5 (0,006) 0,4 (0,3–0,8)	2,5 (0,11)	0,1 (0,80)
2. IgG-Bp $>$ 5 IgG-Es \leq 6	9/12,7	13/25,5	1/11,1	27/14,9	27/16,5	10/52,6	1,4 (0,24)	0,0 (0,99)	1,0 (0,31)
3. IgG-Bp \leq 5 IgG-Es $>$ 6	7/9,9	1/2,0	2/22,2	13/7,2	13/7,9	0/0	0,0 (0,98)	2,2 (0,14)	0,1 (0,76)
4. IgG-Bp $>$ 5 IgG-Es $>$ 6	15/21,1	14/27,5	4/44,4	75/41,4	72/43,9	7/36,8	9,7 (0,002) 3,0 (1,5–6,0)	3,9 (0,048) 2,3 (1,1–4,8)	0,0 (0,91)
χ^2 (p)	12,24 (0,057)			19,54 (0,003)					

Таблица 6. Ассоциации низких (\leq) и высоких ($>$) уровней антител против бензо[а]пирена (IgG-Bp) и эстрадиола (IgG-Es) в комбинациях с полиморфными вариантами гена *IL1B* (rs16944) в сравниваемых группах, риски (OR) НМРЛ при сочетании иммуноанализа антител с молекулярно-генетическим анализом IL

Комбинации антител	Здоровые мужчины N = 158			Больные НМРЛ N = 378			χ^2 (p) OR (95%CI)		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%			
1. IgG-Bp \leq 5 IgG-Es \leq 6	38/53,5	31/44,9	10/55,6	69/36,7	38/25,5	13/31,7	5,3 (0,02) 0,5 (0,3–0,9)	7,4 (0,007) 0,4 (0,2–0,8)	2,1 (0,15)
2. IgG-Bp $>$ 5 IgG-Es \leq 6	9/12,7	16/23,2	3/16,7	24/12,8	27/18,1	14/34,1	0,4 (0,51)	0,4 (0,54)	1,9 (0,17)
3. IgG-Bp \leq 5 IgG-Es $>$ 6	6/8,5	7/10,1	0/0	14/7,4	15/10,1	0/0	0,0 (0,83)	0,7 (0,40)	0
4. IgG-Bp $>$ 5 IgG-Es $>$ 6	18/25,4	15/21,7	5/27,8	81/43,1	69/46,3	14/34,1	7,0 (0,008) 2,5 (1,3–4,7)	11,9 (0,0005) 3,8 (1,8–7,8)	0,7 (0,41)
χ^2 (p)	4,9(0,56)			17,73(0,007)					

выше описанные ассоциации IgG-Bp и IgG-Es с НМРЛ (табл. 3) характерны только для носителей отдельных генотипов цитоккинов. Например, снижение OR до 0,4–0,1 имело место при одновременном отсутствии исследуемых АТ (комбинация 1) только у гомозигот СС и ТТ, но не

у гетерозигот СТ гена *IL1B* (+3953С > Т). Значительное превышение частот одновременного образования IgG-Bp и IgG-Es (комбинация 4) имело место только у гомозигот СС и ТТ – больных НМРЛ (39,6% и 48,0%) по сравнению со здоровыми (20,5% и 0%), но не у гетерозигот СТ гена *IL1B*. В некоторых случаях

(например, при анализе *IL6*) высокое содержание IgG-Vp и IgG-Es у больных НМРЛ превышало таковое у здоровых доноров независимо от генетического полиморфизма цитокина.

Не представилось возможным сделать аналогичные заключения при малых количествах наблюдений по редко встречающимся генотипам, например, по гомозиготам *AATNFA* (-308G > A).

Исследованию ассоциаций генетического полиморфизма цитокинов со злокачественными опухолями человека (в том числе с раком лёгкого) посвящено большое количество работ. Одним авторам удаётся обнаружить искомые взаимосвязи [11, 15], другие не подтверждают наличие таких ассоциаций [12–14]. В большинстве опубликованных статей обсуждается роль цитокинов в иммунных реакциях, направленных на опухолевые клетки и связанных с развитием онкологических заболеваний, то есть в фазе прогрессии канцерогенеза. Участие цитокинов в образовании АТ против экзогенных химических канцерогенов и эндогенных стероидов в фазе инициации/промоции ранее не изучалось.

В настоящей работе ассоциации генетических полиморфизмов *IL1RN*, *IL1B*, *IL4*, *IL6*, *IL10* с НМРЛ у курящих мужчин не выявлены. Частота встречаемости полиморфных вариантов указанных генов не различалась в сравниваемых группах. Искомые взаимосвязи обнаружены только с полиморфизмом гена *TNFA* (-308 G > A). Гомозиготы GG у больных НМРЛ встречались чаще, а гетерозиготы GA реже, чем у здоровых мужчин ($p = 0,007$). Однако взаимосвязи полиморфизма гена *TNFA* (-308G > A) с образованием IgG-Vp и IgG-Es не выявлено ни у здоровых доноров, ни у пациентов с НМРЛ. По-видимому, ассоциации полиморфизма гена *TNFA* (-308G > A) с НМРЛ обусловлены иными иммунологическими механизмами. Вместе с тем, образование IgG-Vp и IgG-Es оказалось взаимосвязанным с полиморфизмом гена *TNFA* (-238 G > A) у здоровых мужчин, а также с полиморфными маркерами *IL1RN* и *IL1B* (-511C > T) у больных НМРЛ.

Впервые обнаружили, что одновременное отсутствие IgG-Vp и IgG-Es ассоциировано с низким риском НМРЛ (OR = 0,3–0,7), а одновременное образование указанных антител – с высоким риском НМРЛ (OR = 1,8–4,4). Эти закономерности были характерны только для гомозиготного генотипа GG, но не для генотипов AA и GA гена *TNFA* (-238G > A);

только для гомозиготного генотипа 4R/4R, но не для генотипов 2R/2R и 2R/4R гена *IL1RN*; только для генотипов CC и CT, но не для гомозиготного генотипа TT гена *IL1B* (-511C > T).

Полученные результаты подтверждают предполагаемое участие цитокинов в фазе инициации/промоции канцерогенеза путём влияния на образование АТ против экзогенных химических канцерогенов и эндогенных стероидных гормонов. Развитие данного направления исследований с увеличением количества наблюдений позволит выполнить анализ межгенных взаимодействий различных цитокинов в регуляции иммунных реакций на низкомолекулярные органические соединения, участвующих в злокачественной трансформации клеток.

Иммуноанализ АТ к бензо[а]пирену и эстрадиолу (IgG-Vp, IgG-Es) в сочетании с молекулярно-генетическим анализом полиморфных вариантов цитокинов целесообразно использовать для определения индивидуальных рисков НМРЛ у курящих мужчин ввиду их большей информативности, чем каждого из них по-отдельности.

Работа выполнена в рамках проекта № 59.1.1. Программы фундаментальных научных исследований СО РАН.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы благодарят академика Л.Н. Иванову за содействие в развитии выбранного направления исследований; сотрудников лаборатории иммунохимии ИЭЧ СО РАН Аносову Т.П., Аносова М.П., Красильникову К.С., Гурова Е.А., Аверьянова А.В. за техническую поддержку настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Худoley В.В. Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия. Санкт-Петербург: НИИ Химии СПбГУ, 1990, 419 с. [*Khudoley V.V. Carcinogens: characteristics, patterns, mechanisms of action. SRI of Chemistry St. Petersburg 1990, 419.*]
2. Wenger D., Gerecke A.C., Heeb N.V., Schmid P., Hueglin C., Naegeli H., Zenobi R. In vitro estrogenicity of ambient particulate matter: contribution of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Appl. Toxicol.* 2009, 29(3), 223–232.
3. Богуш Т.А., Дудко Е.А., Беме А.А., Богуш Е.А., Ким А.И., Полоцкий Б.Е., Тюляндин С.А.,

- Давыдов М.И. Эстрогеновые рецепторы, антиэстрогены и немелкоклеточный рак легкого. Биохимия 2010, 75(12), 1633–1641. [Bogush T.A., Dudko E.A., Veme A.A., Bogush E.A., Kim A.I., Polotsky B.E., Tjuljandin S.A., Davydov M.I. Estrogen receptors, antiestrogens, and non-small cell lung cancer. Biochemistry (Moscow) 2010, 75(12), 1633–1641.]
4. Fucic A., Gamulin M., Ferencic Z., Rokotov D.S., Katic J., Bartonova A., Lovasic I.B., Merlo D.F. Lung cancer and environmental chemical exposure: a review of our current state of knowledge with reference to the role of hormones and hormone receptors as an increased risk factor for developing lung cancer in man. Toxicol. Pathol. 2010, 38(6), 849–855.
 5. De Buck S.S., Augustijns P., Muller C.P. Specific antibody modulates absorptive transport and metabolic activation of benzo[a]pyrene across Caco-2 monolayers. J. Pharmacol. Experim. Therap. 2005, 313(2), 640–646.
 6. Grova N., Prodhomme E.J., Schellenberger M.T., Farinelle S., Muller C.P. Modulation of carcinogen bioavailability by immunization with benzo[a]pyrene – conjugate vaccines. Vaccine, 2009, 27(31), 4142–4151.
 7. Moolten F.L., Capparel N., Boger E. Reduction of respiratory tract binding of benzo(a)pyrene in mice by immunization. J. Natl. Cancer Inst. 1978, 61(5), 347–349.
 8. Peck R.M., Peck E.B. Inhibition of chemically induced neoplasia by immunization with an antigenic carcinogen- protein conjugate. Cancer Res. 1971, 31(11), 1550–1554.
 9. Silbart L.K., Keren D.F. Reduction of intestinal carcinogen absorption by carcinogen-specific immunity. Science, 1989, 243(4897), 1462–1464.
 10. Caldwell B.V., Tillson S.A., Esber H., Thorneycroft I.H. Survival of tumors after immunization against estrogens. Nature 1971, 231(14), 118–119.
 11. Kiyohara C., Horiuchi T., Takayama K., Nakanishi Y. IL1B rs1143634 polymorphism, cigarette smoking, alcohol use, and lung cancer risk in a Japanese population. J. Thorac. Oncol. 2010, 5(3), 299–304.
 12. Peng W., He Q., Yang J., Wang B., Lu M., Wang S., Wang J. Meta-analysis of association between cytokine gene polymorphism and lung cancer risk. Mol. Biol. Rep. 2012, 39(5), 5187–5194.
 13. Xu J., Yin Z., Cao S., Gao W., Liu L., Yin Y., Liu P., Shu Y. Systematic Review and Meta-Analysis on the Association between IL-1B Polymorphisms and Cancer Risk. PLoS One 2013, 8(5), e63654.
 14. Wang W., Chen J., Zhao F., Zhang Y.H. Lack association between a functional polymorphism (rs 1800796) in the interleukin –6 gene promoter and lung cancer. Diagn. Pathol. 2014, 9, 134.
 15. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Савченко Я.А., Баканова М.Л., Минина В.И., Мун С.А., Ларин С.А., Костянюк М.В. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные аберрации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия. Российский иммунологический журнал 2011, 5(14), 1, 39–44. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Anosova T.P., Savchenko Ya.A., Bakanova M.L., Minina V.I., Mun S.A., Larin S.A., Kost'anko M.V. Serum antibodies to benzo[a]pyrene and chromosomal aberrations in lymphocytes peripheral blood at the workers of coal processing enterprise. Russian Immunological Journal 2011, 5(14), 1, 39–44.]
 16. Гордеева Л.А., Глушкова О.А., Воронина Е.Н., Шаталина И.В., Шутров А.Е., Попова О.С., Гарева Ю.В., Симонова Т.А., Сутулина И.М., Филипенко М.Л., Глушков А.Н. Ассоциации материнских полиморфизмов генов цитокинов (IL-1B, IL-1RN, TNF, IL-4, IL-6) с врожденными пороками развития у плода и новорожденного. Иммунология 2013, 34(6), 298–304 [Gordeeva L.A., Glushkova O.A., Voronina E.N., Shatalina I.V., Shutrov A.E., Popova O.S., Gareeva Yu.V., Simonova T.A., Sutulina I.M., Filipenko M.L., Glushkov A.N. Association of maternal polymorphisms of cytokine gene (IL1B, IL1RN, TNF, IL4, IL6) with congenital malformations in fetus and newborn. Immunology 2013, 34(6), 298–304.]
 17. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. Caspian J. Intern. Med. 2013, 4(2), 627–635.

ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE AND ESTRADIOL AND THE GENE POLYMORPHISMS OF CYTOKINES AT MALE LUNG CANCER

A. N. Glushkov^{1,2*}, E. G. Polenok¹, L. A. Gordeeva¹, S. A. Mun¹, M. V. Kostyanko², V. A. Titov³,
E. N. Voronina⁴, A. I. Rogozin², A. I. Voloshina², I. A. Vafin⁵, S. E. Ragozhina⁵

*E-mail: ihe@list.ru

¹The Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SBRAS (Institute of Human Ecology), Kemerovo, Russia;

²Kemerovo State University, Kemerovo, Russia;

³Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russia;

⁴Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia;

⁵Regional Center of Blood, Kemerovo, Russia

Received: 14.02.2017. Accepted: 25.12.2017

The associations of antibodies to benzo[a]pyrene and estradiol (IgG-Bp, IgG-Es) with *IL1B*(rs1143634, rs16944), *IL1RN*(VNTR, intron 2), *IL4* (VNTR, intron3), *IL6* (rs1800795), *IL10* (rs1800896), *TNFA* (rs1800629, rs361525) gene polymorphisms in 228 smoking healthy men (NM) and 657 lung cancer patients (LCP) were studied. There was revealed association of gene polymorphism only of *TNFA* (rs1800629) with LC, but not others cytokines. LC risk in GG carriers was high (OR = 1,1–2,3; p = 0,007) and in GA carriers was low (OR = 0,4–0,9; p = 0,01). LC risk was low (OR = 0,3–0,7; p = 0,0002) when both IgG-Bp and IgG-Es were absent. LC risk was high (OR = 1,8–4,4; p = 0,0001) when levels both IgG-Bp and IgG-Es were increased. IgG-Bp and IgG-Es formation was associated with *TNFA* (rs361525) gene polymorphism in HM (p = 0,007), and with *IL1RN*VNTR genopolymorphism (p = 0,003) and *IL1B*(rs16944) (p = 0,007) in LCP. There have first reported a relationship between cytokines gene polymorphisms and specific immune responses on chemical carcinogens and endogenous steroids in healthy donors and lung cancer patients. Immunoassays of IgG antibodies to Bp and Es combined with molecular-genetic studies of *TNFA* (rs361525), *IL1RN*VNTR and *IL1B* (rs16944) are recommended for the lung cancer risk assessment.

Key words: lung cancer, antibodies, benzo[a]pyrene, estradiol, gene polymorphisms

Authors:

Glushkov A.N.  MD, Professor, Director of Institute of Human Ecology of Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia;

650065 Kemerovo, avenue Leningradsky, 10. Phone/fax: (3842)575079. E-mail: ihe@list.ru;

Polenok E.G., PhD (Pharmacy), Chief of Immunochemistry Laboratory of Institute of Human Ecology of Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia;

Gordeeva L.A., PhD (Biology), Chief of Immunogenetics Laboratory of Institute of Human Ecology of Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia;

Mun S.A., PhD (Medicine), Senior Research Fellow of the Immunogenetics Laboratory of Institute of Human Ecology of Federal Research Center of Coal and Coal chemistry SB RAS, Kemerovo, Russia;

Kostyanko M.V., Leading Engineer of the Organic Chemistry Chair of Institute of Fundamental Sciences of Kemerovo State University, Kemerovo, Russia;

Titov V.A., Chief of Thoracic Department of Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russia;

Voronina E.N., PhD (Biology), Research Fellow of Pharmacogenomics Laboratory of Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia;

Rogozin A.I., Master of Genetics Chair of Institute of Biology, Ecology and Natural Resources of Kemerovo State University, Kemerovo, Russia;

Voloshina A.I., Master of Genetics Chair of Institute of Biology, Ecology and Natural Resources of Kemerovo State University, Kemerovo, Russia;

Vafin I.A., Main Physician of Regional Center of Blood, Kemerovo, Russia;

Ragozhina S.E., Assistant of Main Physician on Medicine of Regional Center of Blood, Kemerovo, Russia.