

**А. Е. Благодатских¹, О. В. Голованова¹, А. В. Шевченко¹, В. И. Коненков¹,
М. В. Завьялова², С. В. Вторушин², М. И. Воевода³**

¹ Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной лимфологии СО РАМН
ул. Акад. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117, Россия

² Научно-исследовательский институт онкологии Томского научного центра СО РАМН
пер. Кооперативный, 5, Томск, 634050, Россия

³ Научно-исследовательский институт терапии СО РАМН
ул. Бориса Богаткова, 175/1, Новосибирск, 630089, Россия

E-mail: blagodatskikh@gmail.com

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИЛ-10 ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Проанализирована ассоциированность между генотипами С-592А ИЛ-10 и предрасположенностью к раку молочной железы (РМЖ) и особенностями течения заболевания. Выделена ДНК у группы женщин с РМЖ ($n = 395$) и у здоровых лиц ($n = 295$) сопоставимого возраста. Генотипирован ген ИЛ-10 в точке полиморфизма С-592А методом ПДРФ анализа. Показано, что генотип -592АА является фактором риска возникновения РМЖ, ассоциирован с низкой экспрессией прогестероновых рецепторов и с высокой встречаемостью сопутствующей акушерско-гинекологической патологии. Генотип -592СС ассоциирован с высокой вероятностью лимфогенного метастазирования и с низким эффектом от неoadъювантной химиотерапии. Также генотип ассоциирован с высокой степенью экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов и является протективным в отношении сопутствующей акушерско-гинекологической патологии при РМЖ. Выявленные закономерности позволят использовать полиморфизм С-592А в клинической практике для донозологической диагностики и коррекции методов лечения больных с РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, цитокины, интерлейкин-10, полиморфизм.

Рак молочной железы (РМЖ) – это наиболее часто встречающаяся опухоль, представляющая значительную угрозу для здоровья женщины. Число заболевших за последние несколько лет постоянно увеличивается, несмотря на прогресс в лечении этого заболевания [1].

Биологические механизмы, приводящие к развитию РМЖ, недостаточно изучены, но роль цитокинов в противоопухолевом иммунитете и канцерогенезе не подлежит сомнению [2; 3]. Наиболее перспективным и изучаемым цитокином является интерлейкин-10 (ИЛ-10) [2] – важный иммунорегуляторный цитокин, продуцируемый, главным образом, активированными Т-клетками, моноцитами, В-клетками и тимоцитами. Являясь модулятором иммунного ответа, ИЛ-10 может как

стимулировать, так и подавлять иммунный ответ [3]. Ряд исследований показали, что ИЛ-10 может участвовать в процессах канцерогенеза, но результаты этих изысканий зачастую разноречивы. С одной стороны, увеличение концентрации ИЛ-10 в плазме может способствовать развитию рака за счет подавления экспрессии МНС как I, так и II классов и предотвращения презентации опухолевых антигенов, защищая их от CD8-цитотоксических лимфоцитов. С другой стороны, антиангиогенные эффекты ИЛ-10 оказывают протективное и превентивное действие против возникновения и роста злокачественных опухолей [4].

Недавно полученные данные показывают, что полиморфизм в промоторных участках гена ИЛ-10 может влиять на его экс-

прессию и, следовательно, играть важную роль в предрасположенности к РМЖ и определять особенности его течения [5; 6]. Ген ИЛ-10 состоит из 5 экзонов, длиной около 5 200 п. н., расположен на первой хромосоме в регионе 1q31–1q32. В данном гене в настоящий момент известно около 49 вариантов полиморфизма [7], из которых 46 представляют собой мононуклеотидные полиморфизмы, 2 являются полиморфизмами микросателлитов, и одна – трехнуклеотидная делеция. В промоторной зоне гена находится 28 полиморфизмов, 20 – полиморфизмы в некодирующих интронных участках, либо синонимические замены, из которых один тем не менее вызывает изменение аминокислотной последовательности в белке и одна точка полиморфизма находится в 3'-некодирующем регионе [8].

В роли кандидатов регуляции транскрипции рассматриваются 13 мононуклеотидных полиморфизмов, из которых наиболее исследованными являются G-1082A, T-819C и C-592A. Доказано, что гаплотипы -1082, -819 и -592 GCC увеличивают продукцию ИЛ-10, а АТА – уменьшает продукцию в культурах мононуклеаров периферической крови [9]. Считается, что в большей степени на продукцию ИЛ-10 влияет полиморфизм C-592A. Поскольку эти три полиморфизма наследуются сцепленно, то ряд исследователей считает целесообразным определять только полиморфизм C-592A, так как полиморфный аллель А является маркером для низкопродуцирующего гаплотипа АТА [10; 11]. Поскольку АТА связан с рядом патологий, то полиморфизм C-592A ИЛ-10 является биомаркером предрасположенности к некоторым заболеваниям [12]. В частности, в литературе имеются сведения о его влиянии на заболеваемость и особенности течения РМЖ [13].

Цель исследования – провести анализ ассоциированности генотипов ИЛ-10 C-592A с развитием и особенностями течения РМЖ у женщин.

Материал и методы

В исследование включены две группы женщин; 1-я группа состояла из 395 больных с инфильтрирующим операбельным РМЖ T₁₋₄N₀₋₃M₀. Диагноз РМЖ устанавливался согласно «Гистологической классификации опухолей молочной железы» (ВОЗ,

2003). Средний возраст женщин 1-й группы на момент заболевания составил 51,5 (20–79) лет. В качестве 2-й группы (популяционного контроля) сформирована сопоставимая по возрасту выборка из 295 женщин – жительниц Новосибирска, на основе данных банка ДНК НИИ терапии СО РАМН и ИЦиГ СО РАН. В исследование включены здоровые по клиническим и параклиническим данным лица европеоидной расы. Критерии идентификации европеоидного происхождения обследованных женщин соответствовали требованиям антропологической секции Международных рабочих совещаний по гистосовместимости. Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности.

У всех исследуемых произведен забор периферической венозной крови, из клеток крови выделена геномная ДНК. Анализ полиморфных вариантов специфических участков генома проводили с использованием методов ПЦР и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, используя специфическую структуру праймеров и эндонуклеазу рестрикции Rsa I («СибЭнзим», Россия). Методика анализа опубликована нами ранее в [6].

При сравнении частот встречаемости генотипов полиморфных вариантов ИЛ-10 между анализируемыми группами использовали критерий χ^2 с поправкой Мантеля – Хензеля на непрерывность и / или точный критерий Фишера. Для оценки силы ассоциации генотипов ИЛ-10 с РМЖ или с особенностями течения заболевания рассчитывали значение критерия отношения шансов (ОШ) и его 95 % доверительный интервал (95 % ДИ) при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Распределение частот встречаемости генотипов изученных полиморфных вариантов гена ИЛ-10 в обеих группах соответствовало распределению в европеоидных популяциях и составило 59,8 % для генотипа -592CC, 32,5% – для генотипа -592CA и 7,6% – для генотипа -592AA в выборке больных с РМЖ. Во 2-й группе генотипы распределились с частотами 63,3, 34,1 и 2,5 % соответственно. Выявлено, что в группе больных с РМЖ носительство генотипа

-592AA с низкой промоторной активностью достоверно выше, чем у здоровых доноров (ОШ = 3,22; ДИ = 1,32–8,21; $p = 0,004$).

Группа больных с РМЖ стратифицирована по следующим критериям: наличие либо отсутствие лимфогенного метастазирования, степень эффекта от неoadъювантной химиотерапии (прогрессирование, стабилизация, ремиссия), уровень экспрессии рецепторов к женским половым гормонам (эстрогеновые, прогестероновые и Her2-рецепторы), наличие либо отсутствие рецидивирования, сопутствующего акушерско-гинекологической патологии.

Получены следующие данные: генотип -592CC ассоциирован с высокой вероятностью лимфогенного метастазирования (ОШ = 1,62; ДИ = 1,04–2,54; $p = 0,02$). Также этот генотип достоверно чаще встречался в группе больных с низким эффектом от неoadъювантной химиотерапии (ОШ = 1,91; ДИ = 0,95–3,87; $p = 0,04$).

При анализе ассоциированности с рецепторным статусом и патологией репродуктивной сферы обнаружено, что генотип -592CC ассоциирован с высокой степенью экспрессии («+» – «+++») эстрогеновых (ОШ = 1,86; ДИ = 1,10–3,14; $p = 0,01$) и прогестероновых (ОШ = 1,83; ДИ = 1,10–3,06;

$p = 0,01$) рецепторов (табл. 1). Кроме того, этот генотип существенно реже встречался в группе женщин с РМЖ и сопутствующей гинекологической патологией (ОШ = 0,62; ДИ = 0,40–0,95; $p = 0,02$).

Считается, что генотип -592AA ИЛ-10 понижает уровень продукции ИЛ-10 [8; 9] при онкологических заболеваниях и является фактором риска возникновения некоторых злокачественных опухолей. В проведенном нами исследовании обнаружено, что генотип -592AA ассоциирован с повышенным риском возникновения РМЖ, что согласуется с результатами других публикаций [12; 13].

Гетерозиготный генотип -592CA снижен в группе пациентов с низкой экспрессией эстрогеновых рецепторов (ОШ = 0,58; ДИ = 0,34–0,99; $p = 0,03$). При сравнении группы женщин с РМЖ и сопутствующей акушерско-гинекологической патологией с группой здоровых лиц обнаружено, что генотип -592AA значительно чаще встречался у женщин с патологией репродуктивной сферы (ОШ = 4,12; ДИ = 1,40–12,63; $p = 0,003$), а если рассматривать отдельные заболевания, то у женщин с миомой матки в сочетании с РМЖ (ОШ = 5,75; ДИ = 1,80–18,89; $p = 0,0003$) (табл. 2, 3).

Таблица 1

Распределение генотипов ИЛ-10 у женщин с РМЖ при стратификации по менструальному и рецепторному статусу

Признак	Генотип	n_1	n_2	ОШ	95 % ДИ	p	
Менструальный статус		Сохраненный цикл	Менопауза				
	$n_1 = 138$	CC	79	149	0,82	0,52–1,28	0,35
	$n_2 = 240$	CA	48	74	1,20	0,75–1,91	0,43
	AA	11	17	1,23	0,52–2,89	0,60	
Экспрессия Eг		Eг+	Eг-				
	$n_1 = 187$	CC	119	48	1,86	1,10–3,14	0,01 *
	$n_2 = 99$	CA	56	42	0,58	0,34–0,99	0,03 *
	AA	12	9	0,69	0,26–1,84	0,41	
Экспрессия Pг		Pг+	Pг-				
	$n_1 = 169$	CC	108	57	1,83	1,10–3,06	0,01 *
	$n_2 = 115$	CA	53	45	0,76	0,45–1,28	0,27
	AA	8	13	0,39	0,14–1,05	0,04	
Экспрессия Her2		Her 2 +	Her 2 -				
	$n_1 = 77$	CC	38	95	0,59	0,33–1,07	0,06
	$n_2 = 153$	CA	32	48	1,56	0,85–2,85	0,12
	AA	7	10	1,43	0,47–4,30	0,48	

Примечание: * – $p < 0,05$.

Таблица 2

Распределение генотипов ИЛ-10 у женщин с РМЖ при стратификации по наличию сопутствующей гинекологической патологии

Признак	Генотип	n_1	n_2	ОШ	95 % ДИ	p
Гинекологические заболевания		Есть	Нет			
$n_1 = 144$	СС	75	90	0,58	0,35–0,96	0,02 *
$n_2 = 138$	СА	57	40	1,61	0,95–2,72	0,06
	АА	12	8	1,48	0,54–4,11	0,40
РМЖ и миома матки		Есть	Нет			
$n_1 = 80$	СС	42	123	0,71	0,41–1,24	0,19
$n_2 = 192$	СА	29	68	1,12	0,63–1,99	0,68
	АА	9	11	2,20	0,80–6,02	0,08

Примечание: * – $p < 0,05$.

Таблица 3

Распределение генотипов ИЛ-10 у женщин с РМЖ с сопутствующей гинекологической патологией

Генотип	РМЖ с СГЗ	РМЖ без СГЗ	Здоровые лица	ОШ (1 / 3)	ОШ (2 / 3)
	1	2	3		
-592	$n = 144$	$n = 138$	$n = 278$		
СС	75	90	177	0,62 *	1,07
СА	57	40	95	1,40	0,87
АА	12	8	6	4,12 **	2,79
	РМЖ с ММ	РМЖ без ММ			
-592	$n = 80$	$n = 192$	$n = 278$		
СС	42	123	177	0,63	0,89
СА	29	68	95	1,10	0,98
АА	9	11	6	5,75 **	2,61

Примечание: СГЗ – сопутствующие гинекологические заболевания; ММ – миома матки; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,005$.

По-видимому, это происходит за счет иммуносупрессивного действия ИЛ-10 и подавления экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости. В то же время генотип -592СС, который большинство исследователей связывают с нормальным или повышенным уровнем продукции ИЛ-10 [5; 9], ассоциирован с более тяжелым клиническим течением заболевания, в частности с высоким риском лимфогенного метастазирования и низким эффектом от неoadьювантной химиотерапии. Сходные данные представлены в публикации ученых из клиники Charite [16], показавших связь повышенного уровня ИЛ-10 в сыворотке крови

с неблагоприятным исходом противоопухолевой терапии и низкой общей выживаемостью пациентов с опухолями различной локализации. В случае с лимфогенным метастазированием наблюдали расхождение с результатами зарубежных исследований, где показано, что высокий риск лимфогенного метастазирования связан с низкопродуцирующим гаплотипом АТА (-1082, -819, -592) и некоторыми низкопродуцирующими генотипами ИЛ-10, в частности -1082АА [14]. Низкий эффект от неoadьювантной химиотерапии может быть обусловлен проявлением антиангиогенных свойств ИЛ-10: замедление неоангиогенеза

в опухоли приводит к снижению ее перфузии, соответственно уменьшается поступление химиотерапевтического агента из кровотока в опухолевую ткань.

Итак, впервые изучено влияние ИЛ-10 на рецепторный статус у женщин европеоидной расы, проживающих в Новосибирске. Показано, что генотип -592СС ассоциирован с высокой экспрессией как эстрогеновых, так и прогестероновых рецепторов в клетках опухоли, что может являться предиктором значительного эффекта от гормональной терапии антиэстрогенами и антигестагенами. Генотип -592АА ассоциирован с высокой частотой возникновения сопутствующей акушерско-гинекологической патологии и, в особенности, миомы матки. Поскольку и РМЖ, и миома матки являются дисгормональными заболеваниями, существенную долю в их патогенезе занимает дисбаланс эстрогенов и прогестерона [15], можно выдвинуть предположение о том, что полиморфизм промоторного участка гена ИЛ-10 связан с дисбалансом экспрессии рецепторов (Ег и Pr) и может являться предиктором возникновения дисгормональных заболеваний у женщин.

Заключение

Показана связь полиморфизма промотора гена ИЛ-10 с предрасположенностью к возникновению РМЖ и особенностям клинического течения заболевания. Выяснено, что низкопродуцирующий генотип -592АА является фактором риска возникновения РМЖ, ассоциирован и является фактором предрасположенности к возникновению акушерско-гинекологической патологии, в особенности миомы матки. Выдвинута гипотеза о влиянии ИЛ-10 на рецепторный статус (Ег, Pr, Her2) и о его роли в возникновении дисгормональных заболеваний. Показана связь генотипа -592СС с более тяжелым течением РМЖ, а именно более высокой вероятностью лимфогенного метастазирования и низким ответом на неоадьювантную терапию. Установленные закономерности позволят рассматривать полиморфизм С-592А ИЛ-10 в качестве биомаркера предрасположенности к РМЖ и учитывать особенности течения заболевания. Эти сведения могут быть использованы в клинической практике для донозологической диаг-

ностики РМЖ и разработке новых методов лечения пациентов.

Список литературы

1. Kamangar F., Dores G. M., Anderson W. F. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World // *J. Clin. Oncol.* 2006. Vol. 24, № 14. P. 2137–2150.
2. Smyth M. J., Cretney E., Kershaw M. H., Hayakawa Y. Cytokines in Cancer Immunity and Immunotherapy // *Immunol. Rev.* 2004. Vol. 202. P. 275–293.
3. Mocellin S., Marincola F. M., Young H. A. Interleukin-10 and the Immune Response Against Cancer: a Counterpoint // *J. Leukoc. Biol.* 2005. Vol. 78. P. 1043–1051.
4. Matsuda M., Salazar F., Petersson M., Masucci G., Hansson J., Pisa P. Interleukin 10 Pretreatment Protects Target Cells from Tumor- and Allospecific Cytotoxic T Cells and Downregulates HLA Class I Expression // *J. Exp. Med.* 1994. Vol. 180. P. 2371–2376.
5. Turner D. M., Williams D. M., Sankaran D., Lazzarus M., Sinnott P. J., Hutchinson I. V. An Investigation of Polymorphism in the Interleukin-10 Gene Promoter // *Eur. J. Immunogenet.* 1997. Vol. 24. P. 1–8.
6. Mock C. C., Lanchbury J. S., Chan D. W., Lau C. S. Interleukin-10 Promoter Polymorphisms in Southern Chinese Patients with Systemic Lupus Erythematosus // *Arthritis Rheum.* 1998. Vol. 41. P. 1090–1095.
7. Eskdale J., Kube D., Tesch H., Gallagher G. Mapping of the Human IL-10 Gene and Further Characterisation of the 5' Flanking Sequence // *Immunogenetics.* 1997. Vol. 46. P. 120–128.
8. Howell W. M., Rose-Zerilli M. J. Interleukin-10 Polymorphisms, Cancer Susceptibility and Prognosis // *Fam. Cancer.* 2006. Vol. 5, № 2. P. 143–149.
9. Crawley E., Kay R., Sillibourne J., Patel P., Hutchinson I., Woo P. Polymorphic haplotypes of the Interleukin-10 5' Flanking Region Determine Variable Interleukin-10 Transcription and are Associated with Particular Phenotypes of Juvenile Rheumatoid Arthritis // *Arthritis Rheum.* 1999. Vol. 42. P. 1101–1108.
10. Lowe P. R., Galley H. F., Abdel-Fattah A., Webster N. R. Influence of Interleukin-

10 Polymorphisms on Interleukin-10 Expression and Survival in Critically Ill Patients // *Crit. Care Med.* 2003. Vol. 31. P. 34–38.

11. *Eder T., Mayer R., Langsenlehner U., Renner W., Krippel P., Wascher T. C., Pummer K., Kapp K. S.* Interleukin-10 [ATA] Promoter Haplotype and Prostate Cancer Risk: a Population-Based Study // *Eur. J. Cancer.* 2007. Vol. 43. P. 472–475.

12. *Chung E. Y., Liu J., Zhang Y., Ma X.* Differential Expression in Lupus-associated IL-10 Promoter Single-nucleotide Polymorphisms is Mediated by Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 // *Genes. Immun.* 2007. Vol. 8. P. 577–589.

13. *Gerger A., Renner W., Langsenlehner T., Hofmann G., Knechtel G., Szkandera J.,*

Samonigg H., Krippel P., Langsenlehner U. Association of Interleukin-10 Gene Variation with Breast Cancer Prognosis // *Breast. Cancer Res. Treat.* 2010. Vol. 119, № 3. P. 701–705.

14. *Kong F., Liu J., Liu Y., Song B., Wang H., Liu W.* Association of Interleukin-10 Gene Polymorphisms with Breast Cancer in a Chinese Population // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2010. Vol. 29. P. 72–79.

15. *Chia Y. H., Ellis M. J., Ma C. X.* Neoadjuvant Endocrine Therapy in Primary Breast Cancer: Indications and Use as a Research Tool // *Br. J. Cancer.* 2010. Vol. 103. P. 759–764.

Материал поступил в редколлегию 25.06.2011

**A. E. Blagodatskikh, O. V. Golovanova, A. V. Shevchenko, V. I. Kononov, M. V. Zavjyalova,
S. V. Vtorushin, M. I. Voevoda**

FUNCTIONAL POLYMORPHISM OF IL-10 IN BREAST CANCER

The aim of the study was of analysis of association between genotypes of C-592A IL-10 and susceptibility to breast cancer and course of the disease. We have collected DNA from a group of women with breast cancer and a control group of women of comparable age. The IL-10 gene was genotyped at the C-592A polymorphism using RFLP method. It was demonstrated that the genotype-592AA is a risk factor for breast cancer and it is associated with low expression of progesterone receptors and the high incidence of concomitant obstetrical and gynecological pathology. -592CC genotype was associated with a high probability of lymphatic metastasis and low-effect of neoadjuvant chemotherapy. Also, this genotype was associated with a high expression of estrogen and progesterone receptors, and is a protective against concomitant obstetrical and gynecological pathology in breast cancer. The revealed regularities allow the use of C-592A polymorphism in clinical practice for prenatal diagnosing and correcting treatment of breast cancer.

Keywords: breast cancer, cytokines, interleukin-10, polymorphism.