



УДК 591.151.615.2:616.351-006.6

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ IL-10\_G1082A, IL-17A\_G197A И TLR4\_A896G НА РИСК РАЗВИТИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

А.Г. Кутихин<sup>1</sup>, А.Е. Южалин<sup>2</sup>, А.С. Животовский<sup>1</sup>, А.Н. Волков<sup>1,2</sup>,  
А.Д. Еникеева<sup>1,2</sup>, Ю.А. Попова<sup>1</sup>, Е.Б. Брусиная<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия», <sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет»

Кутихин Антон Геннадьевич – e-mail: antonkutikhin@gmail.com

Известно, что полиморфизмы IL-10\_G1082A, IL-17A\_G197A и TLR4\_A896G модулируют экспрессию генов IL-10, IL-17A и TLR4 и выраженность опосредованного ими иммунного ответа и воспаления, которое может играть важную роль в развитии колоректального рака. С целью выявления влияния указанных полиморфизмов на вероятность возникновения колоректального рака было прогенотипировано 83 больных раком толстой кишки, 89 пациентов со злокачественными опухолями прямой кишки и 300 здоровых доноров крови, спаренных с онкобольными по полу и возрасту. Обнаружено, что гетерозиготный генотип по полиморфизму IL-10\_G1082A статистически достоверно ассоциирован с повышенным риском развития рака толстой кишки (ОШ=2,11, 95%ДИ=1,12–3,99, P=0,0215), гетерозиготный генотип по полиморфизму TLR4\_A896G с высокой степенью достоверности ассоциирован с повышенной вероятностью возникновения рака прямой кишки (ОШ=1,82, 95%ДИ=0,98–3,4, P=0,0576), а носители аллеля А по полиморфизмам IL-10\_G1082A и IL-17A\_G197A имеют статистически достоверно сниженный риск развития колоректального рака в возрасте до 55 лет включительно (ОШ=0,42, 95%ДИ=0,19–0,95, P=0,037 и ОШ=0,38, 95%ДИ=0,19–0,79, P=0,009, соответственно).

**Ключевые слова:** колоректальный рак, полиморфизмы, риск, генетика, генотип, аллель.

It is known that IL-10\_G1082A, IL-17A\_G197A and TLR4\_A896G gene polymorphisms affect expression of IL-10, IL-17A, and TLR4 genes, consequently, leading to modulation of immune response and inflammation mediated by them and playing a possible role in colorectal cancer development. To determine the association of these gene polymorphisms with colorectal cancer, we genotyped 83 colon cancer patients, 89 rectal cancer subjects and 300 healthy age- and sex-matched controls and compared their genotype and allele frequencies. We found heterozygous genotype of the IL-10\_G1082A gene polymorphism being significantly associated with increased colon cancer risk (OR=2,11, 95%CI=1,12–3,99, P=0,0215), heterozygous genotype of the TLR4\_A896G gene polymorphism being associated with elevated rectal cancer risk with borderline significance (OR=1,82, 95%CI=0,98–3,4, P=0,0576), and carriage of A allele of the IL-10\_G1082A and IL-17A\_G197A gene polymorphisms being significantly associated with lower colorectal cancer risk up to 55 years inclusive (OR=0,42, 95%CI=0,19–0,95, P=0,037, and OR=0,38, 95%CI=0,19–0,79, P=0,009, respectively).

**Key words:** colorectal cancer, polymorphisms, risk, genetics, genotype, allele.

### Введение

Колоректальный рак продолжает оставаться одним из наиболее распространенных видов злокачественных опухолей человека. Согласно результатам последнего общемирового эпидемиологического анализа, он занимает третье ранговое место по заболеваемости среди мужчин и второе – среди женщин [1–3]. В 2008 году было зарегистрировано более 1,2 миллиона новых случаев и около 609,000 смертей от злокачественных опухолей толстой и прямой кишки [1–3]. Между различными географическими регионами отмечают-

ся почти десятикратная разница в частоте колоректального рака [1], что позволяет говорить о различной распространенности и силе влияния факторов риска на заболеваемость. Факторы риска развития злокачественных опухолей толстой и прямой кишки делят на две группы: корригируемые (курение, малая физическая активность, избыточный вес и ожирение, злоупотребление алкоголем и превышение красного и жареного мяса в пищевом рационе [4–6]) и некорригируемые (наследственные генетические и эпигенетические изменения [5, 6]). Выявление некорригируемых факторов

риска развития колоректального рака представляет особый интерес, поскольку они менее изучены и это необходимо для составления систем определения групп риска и программ профилактики этого заболевания. Для этой цели в 2011 году был создан Российский консорциум по молекулярной эпидемиологии рака, объединивший усилия практически всех кафедр эпидемиологии медицинских академий и университетов России, заинтересованных в развитии данного научного направления. Из некорректируемых факторов риска развития злокачественных новообразований толстой и прямой кишки приоритет был отдан геномным факторам. Совокупность всех генов-кандидатов высокой вероятности возникновения колоректального рака была разделена на несколько блоков, в каждом из которых были определены конкретные гены для изучения:

- гены систем апоптоза,
- гены систем контроля клеточного цикла,
- гены систем репарации ДНК,
- гены систем трансформации ксенобиотиков,
- гены систем иммунного ответа и антиоксидантной защиты,
- гены систем метаболизма гормонов.

Результаты данной работы предваряют серию запланированных исследований по изучению роли некоторых изменений (полиморфизмов) генов указанных блоков в развитии злокачественных опухолей толстой и прямой кишки. Представленные в ней изучаемые полиморфизмы (IL-10\_G1082A, IL-17A\_G197A и TLR4\_A896G) модулируют экспрессию данных генов [7–11] и, следовательно, выраженность опосредованного ими иммунного ответа и воспаления, которое может играть важную роль в развитии колоректального рака [12–14].

**Цель исследования** – анализ влияния полиморфизмов IL-10\_G1082A (rs1800896), IL-17A\_G197A (rs2275913) и TLR4\_A896G (Asp299Gly, rs4986790) на риск развития колоректального рака, выявление групп риска по локализации опухоли (толстая и прямая кишка), полу и возрасту (до 55 лет включительно и старше 55 лет).

#### Материалы и методы

Опытная группа состояла из 169 пациентов с гистологически верифицированным колоректальным раком (83 больных раком толстой кишки и 86 больных раком прямой кишки), получавших хирургическое лечение по поводу данной патологии в Кемеровском областном клиническом онкологическом диспансере. Контрольную группу составили 300 здоровых субъектов, спаренных с опытной группой по полу и возрасту ( $\pm 2$  года) и сдававших кровь в Медико-санитарной части «Центр здоровья «Энергетик» (Кемерово). От каждого из участников исследования был получен подписанный протокол информированного согласия, проведение данной работы было согласовано с Этическим комитетом ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России».

У каждого из участников исследования забиралось 3 мл цельной периферической венозной крови в вакуумные пробирки типа Vacutest с K3EDTA (Vacutest Kima, Италия) в качестве антикоагулянта. ДНК из полученных клинических образцов выделялась в течение суток с момента забора крови либо при помощи комплекта реагентов для выделения ДНК из биопроб сорбентным методом (Литех, Москва), либо с использованием комплекта реагентов «ДНК-экспресс-

кровь» (Литех, Москва) и хранилась при  $t = -20^{\circ}\text{C}$  до генотипирования. Генотипирование проводилось с применением наборов реагентов для выявления полиморфизмов в геноме человека методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с электрофоретической схемой детекции результата «SNP-экспресс» (Литех, Москва) на амплификаторах Bio-Rad C1000 (Bio-Rad, США) и «Терцик» (ДНК-Технология, Москва). Все вышеуказанные процедуры проводились строго согласно указанным в комплектах реагентов инструкциям производителя.

Статистический анализ проводился с использованием демо-версии программы MedCalc версии 9.6.4.0 (MedCalc Software, Бельгия). Для определения силы влияния фактора риска на вероятность развития заболевания вычислялись показатели отношения шансов (ОШ, odds ratio, OR) с 95% доверительными интервалами (ДИ) для них, в качестве референтного генотипа принимался гомозиготный генотип с большей частотой, различия между исследуемыми группами считались статистически достоверными при вероятности справедливости нулевой гипотезы  $P < 0,05$ .

#### Результаты исследования

При анализе полученных результатов было выявлено, что носители гетерозиготного генотипа по полиморфизму IL-10\_G1082A характеризуются статистически достоверно повышенным риском развития рака толстой кишки (ОШ=2,11, 95%ДИ=1,12–3,99,  $P=0,0215$ ) и предположительно повышенным риском развития колоректального рака (ОШ=1,45, 95%ДИ=0,92–2,29,  $P=0,1052$ ), а у носителей гетерозиготного генотипа по полиморфизму TLR4\_A896G с высокой степенью достоверности увеличена вероятность возникновения рака прямой кишки (ОШ=1,82, 95%ДИ=0,98–3,4,  $P=0,0576$ , табл. 1). У носителей гетерозиготного генотипа по полиморфизму IL-17A\_G197A риск развития колоректального рака и рака толстой кишки был предположительно снижен (ОШ=0,73, 95%ДИ=0,48–1,1 и  $P=0,1307$  и ОШ=0,66, 95%ДИ=0,39–1,13,  $P=0,1302$ , соответственно, таблица 1).

**ТАБЛИЦА 1.**

*Распределение частот генотипов по полиморфизмам IL-10\_G1082A, IL-17A\_G197A и TLR4\_A896G в контрольной группе, группе больных колоректальным раком и подгруппах больных раком толстой и прямой кишки*

| Группа/генотип               | IL-10_G1082A   |               |               | IL-17A_G197A  |                |               | TLR4_A896G     |               |
|------------------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
|                              | G/G            | G/A           | A/A           | G/G           | G/A            | A/A           | A/A            | A/G           |
| Контрольная группа           | 112<br>(0.373) | 126<br>(0.42) | 62<br>(0.207) | 99<br>(0.33)  | 166<br>(0.553) | 35<br>(0.117) | 262<br>(0.873) | 38<br>(0.127) |
| Больные колоректальным раком | 44<br>(0.305)  | 72<br>(0.5)   | 28<br>(0.195) | 64<br>(0.385) | 78<br>(0.47)   | 24<br>(0.145) | 141<br>(0.834) | 28<br>(0.166) |
| Больные раком толстой кишки  | 16<br>(0.235)  | 38<br>(0.556) | 14<br>(0.209) | 34<br>(0.42)  | 38<br>(0.469)  | 9<br>(0.111)  | 73<br>(0.88)   | 12<br>(0.12)  |
| Больные раком прямой кишки   | 28<br>(0.368)  | 34<br>(0.447) | 14<br>(0.185) | 30<br>(0.353) | 40<br>(0.471)  | 15<br>(0.176) | 68<br>(0.791)  | 18<br>(0.209) |

При анализе гендерно-возрастных групп было выявлено, что носительство аллеля А (обладатели генотипов A/G и A/A) по полиморфизмам IL-10\_G1082A и IL-17A\_G197A ассоциировано с достоверно сниженным риском развития колоректального рака в возрасте до 55 лет включительно (ОШ=0,42, 95%ДИ=0,19–0,95,  $P=0,037$  и ОШ=0,38, 95%ДИ=0,19–0,79,  $P=0,009$ , соответственно, таблица 2).

**ТАБЛИЦА 2.**

**Распределение частот генотипов по полиморфизмам IL-10\_G1082A, IL-17A\_G197A и TLR4\_A896G у больных колоректальным раком в зависимости от их пола и возраста**

| Признак/генотип                   | IL-10_G1082A  |               |               | IL-17A_G197A  |               |               | TLR4_A896G     |               |
|-----------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
|                                   | G/G           | G/A           | A/A           | G/G           | G/A           | A/A           | A/A            | A/G           |
| Мужчины                           | 18<br>(0.261) | 36<br>(0.522) | 15<br>(0.217) | 28<br>(0.368) | 37<br>(0.487) | 11<br>(0.145) | 71<br>(0.134)  | 11<br>(0.866) |
| Женщины                           | 26<br>(0.347) | 36<br>(0.48)  | 13<br>(0.173) | 36 (0.4)      | 41<br>(0.455) | 13<br>(0.145) | 70<br>(0.195)  | 17<br>(0.815) |
| Возраст до 55 лет<br>включительно | 15<br>(0.454) | 13<br>(0.394) | 5<br>(0.152)  | 23<br>(0.561) | 14<br>(0.341) | 4<br>(0.098)  | 28<br>(0.243)  | 9<br>(0.757)  |
| Возраст старше<br>55 лет          | 29<br>(0.261) | 59<br>(0.532) | 23<br>(0.207) | 41<br>(0.328) | 64<br>(0.512) | 20<br>(0.16)  | 113<br>(0.144) | 19<br>(0.856) |

### Обсуждение

В противоположность полученным в данной работе результатам, Macarthur с соавт., [15], Crivello с соавт. [16], Cozar с соавт. [17], Cacev с соавт. [18] и Wilkening с соавт. [19] не выявили статистически достоверной связи между полиморфизмом IL-10\_G1082A и риском развития колоректального рака в шотландской популяции (264 пациента, 408 субъектов контрольной группы), в итальянской популяции (62 пациента, 124 субъекта контрольной группы), в испанской популяции (96 пациентов, 196 субъектов контрольной группы), в хорватской популяции (160 пациентов, 160 субъектов контрольной группы) и в шведской популяции соответственно (308 пациентов, 585 субъектов контрольной группы). В то же время Tsilidis с соавт. [20] в своем исследовании в американской популяции (208 пациентов, 381 субъект контрольной группы) обнаружили статистически достоверную связь повышающего уровень экспрессии противовоспалительного цитокина IL-10 аллеля G по полиморфизму IL-10\_G1082A со сниженным риском развития колоректального рака (ОШ=0,79, 95%ДИ=0,53–1,18 для гетерозигот и ОШ=0,58, 95%ДИ=0,35–0,95 для гомозигот по аллелю G, Ртренда=0,03). В нашем исследовании гетерозиготный генотип по данному полиморфизму, напротив, повышал риск развития рака толстой кишки и предположительно повышал риск развития колоректального рака в сравнении с референтным генотипом G/G. Следовательно, если генотип G/G можно считать протективным (аналогично результатам Tsilidis с соавт. [20]), то полученные сведения о влиянии генотипа A/G на риск развития колоректального рака противоречивы, что может быть объяснимо приводимыми ниже причинами.

В отношении полиморфизма TLR4\_A896G данные предыдущих работ различны: Boraska Jelavic с соавт. [21] выявили статистически достоверную связь гетерозиготного генотипа по этому полиморфизму с повышенным риском развития колоректального рака (хорватская популяция, 89 пациентов, 88 субъектов контрольной группы, ОР=1.593, 95%CI=1.216–2.088, P=0.0269), тогда как Tsilidis с соавт. [20], Landi с соавт. [22] и Davoodi и Seow [23] показали отсутствие такой связи в американской популяции (208 пациентов, 381 субъект контрольной группы), в испанской популяции (377 пациентов, 326 субъектов контрольной группы) и в смешанной азиатской популяции (50 пациентов, 60 субъектов контрольной группы). В нашей работе гетерозиготный генотип по данному полиморфизму с высокой степенью достоверности был ассоциирован с повышенным риском развития рака прямой кишки, однако формальный уровень вероятности справед-

ливости нулевой гипотезы  $P < 0.05$  не был достигнут ( $P=0.0576$ ), что может быть связано с недостаточным объемом выборки. В то же время близкой к статистически достоверной связи с колоректальным раком выявлено не было.

Стоит также отметить, что в данном исследовании впервые была изучена возможная роль полиморфизма IL-17A\_G197A в развитии колоректального рака, однако точные выводы сделать затруднительно вследствие недостаточного объема выборки. Можно лишь предположить, что гетерозиготный генотип по этому полиморфизму уменьшает риск развития как колоректального рака, так и рака толстой кишки. Кроме того, впервые была показана статистически достоверная зависимость влияния аллеля A по полиморфизмам IL-10\_G1082A и IL-17A\_G197A на риск развития колоректального рака от возраста (у носителей данного аллеля вероятность возникновения злокачественных опухолей толстой и прямой кишки была снижена в возрасте до 55 лет включительно). Расхождения полученных в нашем исследовании результатов с итогами других работ могут быть объяснимы различными модулирующими действие генотипа факторами, проявляющимися с различной силой в различных изучаемых популяциях (различный генетический фон в популяциях, особенности окружающей среды или кишечной микрофлоры).

### Выводы

1. Гетерозиготный генотип по полиморфизму IL-10\_G1082A статистически достоверно ассоциирован с повышенным риском развития рака толстой кишки и предположительно – с увеличенной вероятностью возникновения колоректального рака.
2. Гетерозиготный генотип по полиморфизму IL-17A\_G197A предположительно связан со сниженным риском развития рака толстой кишки и колоректального рака.
3. Гетерозиготный генотип по полиморфизму TLR4\_A896G с высокой степенью достоверности ассоциирован с повышенной вероятностью возникновения рака прямой кишки.
4. Носители аллеля A по полиморфизмам IL-10\_G1082A и IL-17A\_G197A имеют статистически достоверно сниженный риск развития колоректального рака в возрасте до 55 лет включительно.



### ЛИТЕРАТУРА

1. Jemal A., Center M.M., DeSantis C., Ward E.M. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010. № 19 (8). P. 1893–907.
2. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics. *C.A. Cancer J. Clin.* 2011. 61 (2). 69–90.
3. Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M. GLOBOCAN 2008, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase. № 10 [Internet]. Lyon (France): IARC. 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
4. Ferrari P., Jenab M., Norat T., Moskal A., Slimani N., Olsen A., Tjønneland A., Overvad K., Jensen M.K., Boutron-Ruault M.C., Clavel-Chapelon F., Morois S., Rohrmann S., Linseisen J., Boeing H., Bergmann M., Kontopoulou D., Trichopoulou A., Kassapa C., Masala G., Krogh V., Vineis P., Panico S., Tumino R., van Gils C.H., Kaaks R., Riboli E. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 2007. Vol. 121. P. 2065–2072.
5. Giovannucci E., Wu K. Cancers of the colon and rectum. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr, eds. *Cancer Epidemiology and Prevention*. New York: Oxford University Press. 2006. P. 809–829.

6. Boyle P., Levin B. eds; World Cancer Report 2008. Lyon, France: World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. 2008. 511 p.
7. 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. № 42 (6). P. 1101-1108.
8. Kilpinen S., Huhtala H., Hurme M. The combination of the interleukin-1alpha (IL-1alpha-889) genotype and the interleukin-10 (IL-10 ATA) haplotype is associated with increased interleukin-10 (IL-10) plasma levels in healthy individuals. *Eur Cytokine Netw.* 2002. № 13 (1). P. 66-71.
9. Shibata T., Tahara T., Hirata I., Arisawa T. Genetic polymorphism of interleukin-17A and -17F genes in gastric carcinogenesis. *Hum Immunol.* 2009. № 70 (7). P. 547-551.
10. Rallabhandi P., Bell J., Boukhvalova M.S., Medvedev A., Lorenz E., Arditi M., Hemming V.G., Blanco J.C., Segal D.M., Vogel S.N. Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol.* 2006. № 177 (1). P. 322-332.
11. Arbore N.C., Lorenz E., Schutte B.C., Zabner J., Kline J.N., Jones M., Frees K., Watt J.L., Schwartz D.A. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000. № 25 (2). P. 187-191.
12. Cacev T., Radosevic S., Krizanac S., Kapitanovic S. Influence of interleukin-8 and interleukin-10 on sporadic colon cancer development and progression. *Carcinogenesis.* 2008. № 29 (8). P. 1572-1580.
13. Radosavljevic G., Lujic B., Jovanovic I., Srzentic Z., Pavlovic S., Zdravkovic N., Milovanovic M., Bankovic D., Knezevic M., Acimovic L.J., Arsenijevic N. Interleukin-17 may be a valuable serum tumor marker in patients with colorectal carcinoma. *Neoplasma.* 2010. № 57 (2). P. 135-144.
14. McConnell B.B., Yang V.W. The role of inflammation in the pathogenesis of colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2009. № 5 (2). P. 69-74.
15. Macarthur M., Sharp L., Hold G.L., Little J., El-Omar E.M. The role of cytokine gene polymorphisms in colorectal cancer and their interaction with aspirin use in the northeast of Scotland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005. № 14 (7). P. 1613-1618.
16. Crivello A., Giacalone A., Vaglica M., Scola L., Forte G.I., Macaluso M.C., Raimondi C., Di Noto L., Bongiovanni A., Accardo A., Candore G., Palmeri L., Verna R., Caruso C., Lio D., Palmeri S. Regulatory cytokine gene polymorphisms and risk of colorectal carcinoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2006. № 1089. P. 98-103.
17. Cozar J.M., Romero J.M., Aptsiauri N., Vazquez F., Vilchez J.R., Tallada M., Garrido F., Ruiz-Cabello F. High incidence of CTLA-4 AA (CT60) polymorphism in renal cell cancer. *Hum Immunol.* 2007. № 68 (8). P. 698-704.
18. Cacev T., Radosevic S., Krizanac S., Kapitanovic S. Influence of interleukin-8 and interleukin-10 on sporadic colon cancer development and progression. *Carcinogenesis.* 2008. № 29 (8). P. 1572-1580.
19. Wilkening S., Tavelin B., Canzian F., Enquist K., Palmqvist R., Altieri A., Hallmans G., Hemminki K., Lenner P., Forsti A. Interleukin promoter polymorphisms and prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2008. № 29 (6). P. 1202-1206.
20. Tsilidis K.K., Helzlsouer K.J., Smith M.W., Grinberg V., Hoffman-Bolton J., Clipp S.L., Visvanathan K., Platz E.A. Association of common polymorphisms in IL10, and in other genes related to inflammatory response and obesity with colorectal cancer. *Cancer Causes Control.* 2009. № 20 (9). P. 1739-1751.
21. Boraska Jelavic T., Barisic M., Drmic Hofman I., Boraska V., Vrdoljak E., Peruzovic M., Hozo I., Puljiz Z., Terzic J. Microsatellite GT polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with colorectal cancer. *Clin Genet.* 2006. № 70 (2). P. 156-160.
22. Landi S., Gemignani F., Bottari F., Gioia-Patricola L., Guino E., Cambray M., Biondo S., Capella G., Boldrini L., Canzian F., Moreno V. Polymorphisms within inflammatory genes and colorectal cancer. *J Negat Results Biomed.* 2006. № 5. 15 p.
23. Davoodi H., Seow H.F. Variant Toll-like receptor4 (Asp299Gly and Thr399Ile alleles) and Toll-like receptor2 (Arg753Gln and Arg677Trp alleles) in colorectal cancer. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2011. № 10 (2). P. 91-99.