

УДК 616.98:579.835.12

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ПРОГНОЗА
ИНФИЦИРОВАНИЯ *HELICOBACTER PYLORI*****Елизавета Сергеевна АГЕЕВА¹, Ольга Владимировна ШТЫГАСHEVA¹,
Наталья Владимировна РЯЗАНЦЕВА², Владимир Николаевич ХАРЬКОВ³,
Вадим Анатольевич СТЕПАНОВ³**¹ Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова
665017, г. Абакан, пр. Ленина, 92² Сибирский государственный медицинский университет
634050, г. Томск, Московский тракт, 2³ НИИ медицинской генетики СО РАМН
634050, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10

Изучено распределение генотипов полиморфных локусов генов C +3953T IL-1 β , IL-1Ra VNTR, -174 G>C IL-6, -251 T>A IL-8 у коренных и пришлых жителей Республики Хакасия, больных язвенной болезнью и хроническим гастритом, ассоциированных с *Helicobacter pylori*. Установлена взаимосвязь между генотипом AA -251 IL-8 и риском развития язвенной болезни у хакасов. У европеоидов риск развития заболевания ассоциирован с генотипом CC +3953 IL-1 β и R2R3 IL-1Ra.

Ключевые слова: полиморфизм генов, иммунный ответ, *Helicobacter pylori*, язвенная болезнь, хакасы

На сегодняшний день имеется достаточно фактов, свидетельствующих о значении генетических факторов макроорганизма в определении особенностей иммунного ответа и, следовательно, восприимчивости/резистентности организма к заболеваниям. Определенный интерес представляют данные о роли полиморфных вариантов генов интерлейкинов в патогенезе гастродуоденальной патологии (злокачественные новообразования, хронические воспалительные заболевания, в том числе инфекционной природы). При этом особое значение придается популяционным особенностям.

В настоящее время накоплены данные о роли аллельных вариантов ряда генов в патогенезе заболеваний, ассоциированных с *Helicobacter pylori* (НР). Так, показано, что аллельные варианты кластера генов IL-1 (IL-1 β -511T, IL-1Ra R2R2) связаны с высоким риском развития рака желудка у представителей корейской популяции, инфицированных НР. В японской

популяции не было выявлено достоверной связи между аллельным вариантом IL-1 β -511T и риском развития НР-ассоциированного рака желудка [1, 2]. В то же время было установлено, что у японцев аллель A -251 IL-8 ассоциирован с прогрессией атрофических изменений в слизистой оболочке желудка у пациентов с НР и увеличивает риск развития язвенной болезни и рака желудка [3, 4]. В китайской популяции риск развития рака желудка связывают с наличием генотипа TA -251 IL-8 [5]. Z. Gyulai et al. показали существование зависимости между носительством генотипа TT -251 IL-8 и риском развития дуоденальной язвы [6]. Возможным объяснением этому является наличие популяционно-зависимых ассоциаций между аллелями генов и клиническими особенностями инфекционного процесса [2, 7].

При проведении эпидемиологического исследования распространенности язвенной болезни у коренных и пришлых жителей Рес-

Агеева Е.С. – к.м.н., зав. кафедрой фундаментальной медицины и гигиены, e-mail: Ageevaeliz@rambler.ru
Штыгашева О.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой внутренних болезней, e-mail: olgashtygasheva@rambler.ru
Рязанцева Н.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фундаментальных основ медицины, e-mail: nv_ryazan@mail.ru
Харьков В.Н. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории эволюционной генетики, e-mail: vladimir.kharkov@medgenetics.ru
Степанов В.А. – д.б.н., проф., руководитель лаборатории эволюционной генетики, e-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru

публики Хакасия выявлено, что при высокой инфицированности НР (95,4 % среди европеоидов и 95,2 % среди хакасов) заболеваемость язвенной болезнью в двух популяциях, проживающих на территории Хакасии, различалась (8,1 % у европеоидов и 4,5 % у хакасов) [8]. Установленная взаимосвязь между распространенностью НР и ассоциированностью бактерий с язвенной болезнью у коренных и пришлых индивидов свидетельствует о наличии популяционно-наследуемых особенностей, оказывающих, по всей видимости, влияние на характер взаимодействия микроорганизма и организма хозяина. В связи с этим интересным является исследование молекулярно-генетических механизмов, реализация которых влияет на течение инфекционного процесса.

Целью работы послужило выявление иммуногенетических особенностей, детерминирующих исход инфицирования НР у коренных и пришлых жителей Хакасии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – больные язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (21 европеоид и 25 хакасов), хроническим гастритом (59 европеоидов и 63 хакаса). Контрольную группу составили здоровые доноры (60 европеоидов и 63 хакаса). Все обследованные – коренные (хакасы или монголоиды) и пришлые жители Республики Хакасия (русские или европеоиды). В исследовании приняло участие сопоставимое количество мужчин и женщин, средний возраст европеоидов был 43,6 года, хакасов – 42,9 года.

Наличие у пациентов НР диагностировали с использованием четырех методов: морфологического, быстрого уреазного, серологического (определение уровня специфических IgG к НР в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа) и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для исследования аллельных полиморфизмов генов ДНК выделяли из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Амплификацию осуществляли методом ПЦР, используя структуру следующих праймеров: F: gttgcatcagactttgacc и R: ttcagttcatatggaccaga (C+3953T IL-1 β), F: ctacgacaactctctat и R: tcctggctgcaggtaa (IL-1Ra VNTR), F: tgacttcagtttactctttgt и R: ctgattggaaccttattaag (-174 G>C IL-6), F: tgttctaacaactgaccacttagta и R: ttatgaccctcatcttttcattat (-251 T>A IL-8) («Сибэнзим», Новосибирск). Наличие полиморфных вариантов аллелей формирует сайты для распознавания

соответствующей рестриктазой. К амплификатам добавляли смесь для рестрикции, содержащую один из ферментов (при генотипировании C+3953T IL-1 β – Taq I, -174 G>C IL-6 – SfaNI, -251 T>A IL-8 – Mfe I) и BSA-буфер. Температурный режим и время соответствовали приложенной инструкции фирмы-производителя («Сибэнзим»). Продукты рестрикции анализировали с помощью электрофореза в 4 % агарозном геле. В качестве маркера размера ДНК использовали плазмиду pUC19, расщепленную рестриктазой MspI («Сибэнзим»).

В работе с пациентами опирались на этические принципы, отраженные в Конституции РФ и Хельсинкской декларации всемирной медицинской ассоциации (2000). У всех пациентов было получено информированное согласие, подтверждающее их добровольное участие в исследовании.

Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью критерия χ^2 , расчет проводили в пакете статистических программ GENDIST, разработанным В.А. Степановым. Сравнение частот аллелей и генотипов проводили с помощью критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность, анализ ассоциации полиморфизмов с хроническим гастритом и язвенной болезнью – с помощью критерия отношения шансов (ОШ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фактором, замыкающим на себе ключевые звенья патогенеза НР-персистенции в слизистой оболочке желудка (воспаление, апоптоз, гипохлоргидрия), является IL-1 β . Выраженность эффектов интерлейкина зависит от уровня экспрессии как самого продукта, так и антагониста рецептора интерлейкина IL-1Ra. В результате проведенного нами исследования установлено, что среди хакасов наиболее распространен низкопродуцирующий генотип CC +3953 IL-1 β (см. таблицу). У больных язвенной болезнью количество гомозигот CC было выше, чем у пациентов с хроническим гастритом и в группе контроля ($p < 0,05$). Гетерозиготы СТ встречались чаще у пациентов с хроническим гастритом по сравнению с больными язвенной болезнью и здоровыми донорами ($p < 0,05$). Гомозиготы ТТ (для которых характерен низкий уровень продукции IL-1 β) в нашем исследовании являлись редким генотипом (см. таблицу).

У европеоидов доминирующим генотипом также являлся CC +3953 IL-1 β , доля которого была выше у больных хроническим гастритом

Таблица

Распределение частот генотипов (%) у европеоидов и хакасов, носителей *Helicobacter pylori*, больных хроническим гастритом и язвенной болезнью

Полиморфизм генов		Хакасы			Европеоиды		
		Здоровые доноры	Больные		Здоровые доноры	Больные	
			ХГ	ЯБ		ХГ	ЯБ
C +3953T IL-1β	CC	73,2	63,5	84,0 ²	45,6 ³	58,9 ¹	70,6 ^{1,3}
	CT	25,2	36,5	16,0 ²	33,3	24,8	17,6 ¹
	TT	1,6	0,0	0,0	21,1 ³	16,3	11,8
χ^2, p		0,22, > 0,05 ⁴	0,24, > 0,05 ⁴	2,91, > 0,05 ⁴	2,39, > 0,05 ⁴	2,39, > 0,05 ⁴	7,84, < 0,05
IL-1Ra VNTR	R2R2	2,9	1,7	0,0	5,1	9,5 ³	12,4
	R2R3	0,0	0,0	0,0	2,9	12,2 ¹	18,1 ¹
	R2R4	0,0	1,7	0,0	19,1	14,3 ³	21,7
	R3R3	6,8	7,0	4,0	11,6	9,7	17,4 ³
	R3R4	10,7	14,0	20,0 ¹	27,4 ³	21,8	11,5 ^{1,2}
	R4R4	79,6	75,4	76,0	33,9 ³	32,5 ³	18,9 ^{1,2,3}
χ^2, p		37,88, > 0,05 ⁴	0,77, > 0,05 ⁴	34,49, < 0,05	2,81, > 0,05 ⁴	2,70, > 0,05 ⁴	6,26, > 0,05 ⁴
-174 G>C IL-6	GG	70,0	75,0	73,9	38,8 ³	36,2 ³	28,9 ³
	GC	27,1	25,0	21,7	49,6 ³	47,1 ³	52,7 ³
	CC	2,9	0,0	4,4	11,6 ³	16,7	18,4 ³
χ^2, p		0,05, > 0,05 ⁴	0,25, > 0,05 ⁴	1,12, > 0,05 ⁴	0,29, > 0,05 ⁴	0,002, > 0,05 ⁴	0,02, > 0,05 ⁴
-251 T>A IL-8	TT	42,8	45,4	44,8	36,1	34,4	26,1 ³
	TA	44,4	43,7	24,1 ^{1,2}	45,8	46,8	56,6 ³
	AA	12,8	10,9	31,0 ^{1,2}	18,1	18,8	17,3 ³
χ^2, p		0,07, > 0,05 ⁴	9,06, < 0,05	0,00, > 0,05 ⁴	0,02, > 0,05 ⁴	0,89, > 0,05 ⁴	2,84, > 0,05 ⁴

Примечание. Достоверное ($p < 0,05$) отличие от величины соответствующего показателя: ¹ – здоровых доноров, ² – пациентов с хроническим гастритом, ³ – хакасов; ⁴ – распределение частот генотипов, соответствующее закону Харди-Вайнберга. ХГ – хронический гастрит, ЯБ – язвенная болезнь.

и язвенной болезнью по сравнению с контролем (см. таблицу). Анализ показал, что у европеоидов риск развития ЯБ ассоциирован с генотипом CC +3953 IL-1β (ОШ = 2,9, 95% доверительный интервал ДИ 1,6–5,6). В отношении гетерозигот СТ +3953 IL-1β и гомозигот ТТ +3953 IL-1β у европеоидов отмечалось снижение показателей по сравнению с контролем (см. таблицу). У пациентов с язвенной болезнью генотипы СТ и ТТ +3953 IL-1β встречались реже, чем у пациентов с хроническим гастритом и в группе контроля ($p < 0,05$).

При межпопуляционном сравнении распространенности генотипов у здоровых коренных и пришлых жителей обнаружено, что гомозиготы CC +3953 IL-1β чаще встречаются у хакасов, чем у европеоидов, в то время как гомозиготы ТТ +3953 IL-1β – напротив, существенно реже.

При изучении полиморфизма гена IL-1Ra установлено, что во всех обследованных группах доминирует генотипом R4R4 IL-1Ra, при этом у хакасов его встречаемость в несколько раз выше, чем у европеоидов. Вторым по часто-

те являлся генотип R3R4 IL-1Ra, доля которого была наибольшей у хакасов, больных язвенной болезнью ($p < 0,05$). Редкими генотипами у хакасов были гомозиготы R3R3 и R2R2, а также гетерозиготы R2R4 IL-1Ra (см. таблицу). У европеоидов, страдающих язвенной болезнью и хроническим гастритом, встречаемость R2R2 и R2R3 IL-1Ra была выше, чем в контроле и в аналогичных группах хакасов (см. таблицу). Следует отметить, что у европеоидов выявлена ассоциативная взаимосвязь между генотипом R2R3 IL-1Ra и риском развития язвенной болезни (ОШ = 7,1, 95% ДИ 1,9–31,4).

IL-6, ключевой медиатор Th2-пути, относится к цитокинам «первого уровня», которые секретируются в ответ на антигенную стимуляцию НР. IL-6 способствует переключению синтеза IgM на IgG, являясь фактором дифференцировки В-клеток. Распределение генотипов -174 G>C IL-6 среди хакасов показало, что наиболее частыми были гомозиготы GG -174 G>C (см. таблицу). Доля гетерозигот GC -174 G>C IL-6 у больных была ниже, чем в контро-

ле, но различия не являлись достоверными. Генотип СС у хакасов встречался наиболее редко; при хроническом гастрите в пределах нашего исследования он выявлен не был.

При сравнении частоты распределения полиморфных вариантов –174 G>C IL-6 среди европеоидов – пациентов с хроническим гастритом и язвенной болезнью – достоверных различий по сравнению с контролем выявлено не было. При этом распределение между генотипами у коренных и пришлых жителей имело существенные различия (см. таблицу).

Известно, что для дифференцировки и рекрутирования клеток-эффекторов в очаг НР-ассоциированного воспаления необходим IL-8 [9]. При оценке распределения полиморфизма T – 251 A гена IL-8 во всех обследованных группах пациентов также обнаружены различия встречаемости генотипов (см. таблицу).

Среди хакасов самым частым как в группе больных, так и в группе здоровых людей являлся ТТ –251 IL-8. Доля ТА –251 IL-8 оказалась существенно сниженной у больных язвенной болезнью, относящихся к хакасской популяции. Частота встречаемости генотипа АА –251 IL-8 была выше у больных язвенной болезнью, чем у пациентов с хроническим гастритом и в контрольной группе ($p < 0,05$). Между генотипом АА –251 IL-8 и риском развития язвенной болезни была выявлена взаимосвязь (ОШ = 3,1, 95 % ДИ 1,4–6,6). Необходимо отметить, что уровень интерлейкинов зависит не только от полиморфизма генов, но и от генотипа микроорганизма. В частности, известно, что наиболее высокое содержание IL-8 определяется при инфицировании CagA-штаммами НР [10, 11]. В этой связи интересным, на наш взгляд, является обнаруженная взаимосвязь между CagA-генотипом НР и ассоциацией высокоэкспрессирующего генотипа АА –251 IL-8 с риском развития язвенной болезни у хакасов [8].

В группе европеоидов – пациентов с хроническим гастритом – не было выявлено статистически значимых различий в распределении гомозиготных и гетерозиготных генотипов по сравнению с контролем (см. таблицу). В то же время у пациентов с язвенной болезнью доля гетерозигот ТА –251 IL-8 была выше, а ТТ –251 IL-8 – ниже, чем в контрольной группе. Частота генотипа АА –251 IL-8 у больных ЯБ – пришлых жителей – не имела достоверных различий с контролем (см. таблицу).

Интересно отметить, что при язвенной болезни у пациентов европеоидной популяции генотип ТТ –251 IL-8 встречался сравнительно реже, чем у хакасов (см. таблицу), в то время

как генотип ТА –251 IL-8 – напротив, достоверно чаще ($p < 0,05$). В отношении генотипа АА –251 IL-8 происходила инверсия признака: у хакасов чаще определялся генотип АА –251 IL-8 по сравнению с контролем, у европеоидов – реже.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило выявить, что у хакасов, инфицированных НР, гомозиготный генотип АА полиморфного локуса гена IL-8 в позиции –251 ассоциирован с риском развития язвенной болезнью (OR = 3,1, 95 % ДИ 1,4–6,6). Среди хакасов наиболее распространены варианты СС +3953 IL-1 β и R4R4 IL-1Ra, которые не характеризуются высоким уровнем экспрессии соответствующих интерлейкинов. Вероятно, именно эта особенность обеспечивает мягкий провоспалительный эффект у хакасов – носителей НР, отличающихся меньшим риском развития язвенной болезни. Следовательно, комбинация генотипов СС +3954 IL-1 β и R4R4 IL-1Ra у хакасов может определять более высокий уровень защиты от НР-ассоциированной патологии, чем у европеоидов. У европеоидов риск развития язвенной болезни ассоциирован с генотипом СС +3953 IL-1 β (ОШ = 2,9, 95% ДИ 1,6–5,6) и R2R3 IL-1Ra (OR = 7,1, 95% CI 1,9–31,4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hollegaard M.V., Bidwell J.L. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, suppl. 3 // Genes Immun. 2006. 7. (4). 269–276.
2. Matsukura N., Yamada S., Kato S. et al. Genetic differences in interleukin-1 β polymorphisms among four Asian populations: an analysis of the Asian paradox between *H. pylori* infection and gastric cancer incidence // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2003. 22. 47–55.
3. Ohyauchi M., Imatani A., Yonechi M. et al. The polymorphism interleukin 8 –251 A/T influences the susceptibility of *Helicobacter pylori* related gastric disease in the Japanese population // Gut. 2005. 54. 330–335.
4. Taguchi A., Ohmia N., Shirai K. et al. Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2005. 14. 2487–2493.
5. Lu W., Pan K., Zhang L. et al. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor α and risk of genetic cancer in a Chinese population // Carcinogenesis. 2005. 26. 631–636.

6. Gyulai Z., Klausz G., Tiszai A. et al. Genetic polymorphism of interleukin-8 (IL-8) is associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer // Eur. Cytokine Netw. 2004. 15. (4). 353–358.

7. Chang Y.W., Jang Y., Kim N.H. et al. Interleukin-1B (IL-1B) polymorphisms and gastric mucosal levels of IL-1 β cytokine in Korean patients with gastric cancer // Int. J. Cancer. 2005. 114. 465–471.

8. Штыгашева О.В., Цуканов В.В. Ассоциация *cagA* и *vacA* штаммов *Helicobacter pylori* и язвенной болезни в организованной популяции г. Абакана // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2004. (2). 84–87.

Shtygasheva O.V., Tsukanov V.V. Association between *cagA* and *vacA* strains of *Helicobacter pylori* and ulcer disease in Abakan organized population //

Ros. zhurn. gastroenterologii, gepatologii i koloproktologii. 2004. (2). 84–87.

9. Кононов А.В. Воспаление как основа *Helicobacter pylori*-ассоциированных болезней // Архив патологии. 2006. 68. (5). 3–10.

Kononov A.V. Inflammation as the basis of *Helicobacter pylori* associated diseases // Arkhiv patologii. 2006. 68. (5). 3–10.

10. Peek R.M., Moss F., Tham K.T. et al. *Helicobacter pylori cagA*+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis // J. Natl. Cancer Inst. 1997. 89. (12). 863–868.

11. Rieder G., Einsiedl W., Hatz R.A. et al. Comparison of CXC chemokines ENA-78 and interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori*-associated gastritis // Infect. Immunity. 2001. 69. 81–88.

GENETIC DETERMINANTS OF PROGNOSIS FOR *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION

Elizaveta Sergeevna AGEEVA¹, Olga Vladimirovna SHTYGASHEVA¹,
Nathalia Vladimirovna RAYAZANTSEVA², Vladimir Nikolaevich KHAR'KOV³,
Vadim Anatolyevich STEPANOV³

¹Khakas State University named after N.F. Katanov
665017, Abakan, Lenin av., 92

²Siberian State Medical University
634050, Tomsk, Moskovsky tract, 2

³Institute of Medical Genetics SB RAMS
634050, Tomsk, Embankment of the river Ushaika, 10

Distribution of genotypes of C +3953T IL-1 β , IL-1Ra VNTR, -174 G>C IL-6, -251 T>A IL-8 has been studied in patients with ulcer disease and chronic gastritis associated with *Helicobacter pylori* at Mongoloids and Caucasians of Khakassia. The correlation between homozygous variant AA of the IL-8 gene in position -251 and risk of ulcer disease development in Khakas population has been established. The risk of the disease development was associated with CC +3953 IL-1 β and R2R3 IL-1Ra at Caucasians.

Key words: gene polymorphisms, immune response, *Helicobacter pylori*, ulcer disease, Khakas.

Ageeva E.S. – candidate of medical sciences, head of the chair for fundamental medicine and hygiene,
e-mail: Ageevaeliz@rambler.ru

Shtygasheva O.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for internal medicine,
e-mail: olgashtygasheva@rambler.ru

Rayazantseva N.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for fundamental basis of medicine,
e-mail: nv_ryazan@mail.ru

Khar'kov V.N. – candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of evolutionary genetics,
of e-mail: vladimir.kharkov@medgenetics.ru

Stepanov V.A. – doctor of biological sciences, professor, head of laboratory of evolutionary genetics,
e-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru