

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ПРОГНОЗА ИНФИЦИРОВАНИЯ *HELICOBACTER PYLORI*

Елизавета Сергеевна АГЕЕВА<sup>1</sup>, Ольга Владимировна ШТЫГАСHEВА<sup>1</sup>,  
Наталья Владимировна РЯЗАНЦЕВА<sup>2</sup>, Владимир Николаевич ХАРЬКОВ<sup>3</sup>,  
Вадим Анатольевич СТЕПАНОВ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова  
665017, г. Абакан, пр. Ленина, 92

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ  
634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>3</sup> НИИ медицинской генетики СО РАМН  
634050, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10

Изучено распределение генотипов полиморфных локусов генов C +3953T IL-1 $\beta$ , 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 $\beta$  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 $\beta$  -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 $\beta$  -511T и риском развития НР-ассоциированного рака желудка [1, 2]. В то же время было установлено, что у японцев аллель А -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 ТА -251 IL-8 [5]. Z. Gyulai et al. показали существование зависимости между носительством генотипа ТТ -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  
Штыгасheва О.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой внутренних болезней, e-mail: olgashtygashcheva@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 бактерии 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: gttgtcatcagactttgacc и R: ttcaagttcatatggaccaga (C+3953T IL-1 $\beta$ ), F: ctacgaacactcctat и R: tcctgggtcgcaggtaa (IL-1Ra VNTR), F: tgacttcagcttactctttgt и R: ctgattggaacacttattaag (–174 G>C IL-6), F: tggcttaacacctgccactctagta и R: ttatgcaccctcatcttttcattat (–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 $\beta$  – 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  $\chi^2$ , расчет проводили в пакете статистических программ GENDIST, разработанным д.б.н. В.А. Степановым. Сравнение частот аллелей и генотипов проводили с помощью критерия  $\chi^2$  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 $\beta$ . 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 $\beta$  (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 $\beta$ ) в нашем исследовании являлись редким генотипом (см. таблицу).

У европеоидов доминирующим генотипом также являлся CC +3953 IL-1 $\beta$ , 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-1 $\beta$	CC	73,2	63,5	84,0 <sup>2</sup>	45,6 <sup>3</sup>	58,9 <sup>1</sup>	70,6 <sup>1,3</sup>
	CT	25,2	36,5	16,0 <sup>2</sup>	33,3	24,8	17,6 <sup>1</sup>
	TT	1,6	0,0	0,0	21,1 <sup>3</sup>	16,3	11,8
$\chi^2, p$		0,22, > 0,05 <sup>4</sup>	0,24, > 0,05 <sup>4</sup>	2,91, > 0,05 <sup>4</sup>	2,39, > 0,05 <sup>4</sup>	2,39, > 0,05 <sup>4</sup>	7,84, < 0,05
IL-1Ra VNTR	R2R2	2,9	1,7	0,0	5,1	9,5 <sup>3</sup>	12,4
	R2R3	0,0	0,0	0,0	2,9	12,2 <sup>1</sup>	18,1 <sup>1</sup>
	R2R4	0,0	1,7	0,0	19,1	14,3 <sup>3</sup>	21,7
	R3R3	6,8	7,0	4,0	11,6	9,7	17,4 <sup>3</sup>
	R3R4	10,7	14,0	20,0 <sup>1</sup>	27,4 <sup>3</sup>	21,8	11,5 <sup>1,2</sup>
	R4R4	79,6	75,4	76,0	33,9 <sup>3</sup>	32,5 <sup>3</sup>	18,9 <sup>1,2,3</sup>
$\chi^2, p$		37,88, > 0,05 <sup>4</sup>	0,77, > 0,05 <sup>4</sup>	34,49, < 0,05	2,81, > 0,05 <sup>4</sup>	2,70, > 0,05 <sup>4</sup>	6,26, > 0,05 <sup>4</sup>
-174 G>C IL-6	GG	70,0	75,0	73,9	38,8 <sup>3</sup>	36,2 <sup>3</sup>	28,9 <sup>3</sup>
	GC	27,1	25,0	21,7	49,6 <sup>3</sup>	47,1 <sup>3</sup>	52,7 <sup>3</sup>
	CC	2,9	0,0	4,4	11,6 <sup>3</sup>	16,7	18,4 <sup>3</sup>
$\chi^2, p$		0,05, > 0,05 <sup>4</sup>	0,25, > 0,05 <sup>4</sup>	1,12, > 0,05 <sup>4</sup>	0,29, > 0,05 <sup>4</sup>	0,002, > 0,05 <sup>4</sup>	0,02, > 0,05 <sup>4</sup>
-251 T>A IL-8	TT	42,8	45,4	44,8	36,1	34,4	26,1 <sup>3</sup>
	TA	44,4	43,7	24,1 <sup>1,2</sup>	45,8	46,8	56,6 <sup>3</sup>
	AA	12,8	10,9	31,0 <sup>1,2</sup>	18,1	18,8	17,3 <sup>3</sup>
$\chi^2, p$		0,07, > 0,05 <sup>4</sup>	9,06, < 0,05	0,00, > 0,05 <sup>4</sup>	0,02, > 0,05 <sup>4</sup>	0,89, > 0,05 <sup>4</sup>	2,84, > 0,05 <sup>4</sup>

Примечание. Достоверное ( $p < 0,05$ ) отличие от величины соответствующего показателя: <sup>1</sup> – здоровых доноров, <sup>2</sup> – пациентов с хроническим гастритом, <sup>3</sup> – хакасов; <sup>4</sup> – 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 язвенной болезни ассоциирован с генотипом CC +3953 IL-1 $\beta$  (ОШ = 2,9, 95 % доверительный интервал ДИ 1,6–5,6). В отношении гетерозигот CT +3953 IL-1 $\beta$  и гомозигот TT +3953 IL-1 $\beta$  у европеоидов отмечалось снижение показателей по сравнению с контролем (см. таблицу). У пациентов с язвенной болезнью генотипы CT и TT +3953 IL-1 $\beta$  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-1 $\beta$  чаще встречаются у хакасов, чем у европеоидов, в то время как гомозиготы TT +3953 IL-1 $\beta$  – напротив, существенно реже.

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

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-