

Распределение генотипов *Helicobacter pylori*, полиморфных локусов генов цитокинов (IL-1 и IL-10) и особенности рубцевания язвенных дефектов у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки

О.А. Чернова, Э.Р. Абузарова, О.В. Горшков, Н.Б. Баранова, В.М. Чернов

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань

Цель работы — ассоциативный анализ распределения генотипов штаммов *H. pylori*, полиморфных локусов генов цитокинов (IL-1 и IL-10) и морфометрических показателей (размеров и рубцевания) язвенных дефектов у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, проживающих в г. Казани. В качестве материала исследования использованы образцы ДНК, полученные от 88 больных и 123 лиц контрольной группы. Генотипирование IL-1 и IL-10 в клинических образцах 211 индивидов осуществляли с помощью ПЦР, а также ПДФ. Установлено, что большинство больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (жители г. Казани) являются носителями высоковирулентных штаммов *H. pylori* — *cagA⁺vacAs1⁺*. Аллель IL-1B-511*С и генотип IL-1B-511*С/*С повышают риск развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, ассоциированной с *H. pylori*, а аллель IL-1B-511*Т и генотипы IL-1B-511*С/*Т и IL-1RN*1/*2 снижают вероятность формирования заболевания. Вероятность самопроизвольного рубцевания язвенных дефектов у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, ассоциированной с *H. pylori*, понижена у носителей генотипа IL-1RN*2/*2 и/или штаммов *H. pylori* с генотипом *cagA⁺vacAs1⁺*. (Цитокины и воспаление. 2009. Т. 8, № 4. С. 28–31.)

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки, цитокины, полиморфизм генов.

Эпидемиологические данные, полученные в разных странах, свидетельствуют о том, что в 100 % случаев язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки (ЯБДК) связана с персистенцией в желудке *H. pylori* [6]. При этом морфометрические показатели язвенных дефектов, скорость рубцевания язв весьма различаются у больных ЯБДК, ассоциированной с *H. pylori*. Известно, что возникновение язвы у части пациентов сопровождается стремительным изъязвлением до образования гигантской язвы, тогда как у других имеют место лишь язвы небольшого размера [5, 13].

Различия в восприимчивости, а также чувствительности к персистенции *H. pylori*, размерах и скорости рубцевания язвенных дефектов больных язвенной болезнью, ассоциированной с хелико-

бактерной инфекцией, могут быть обусловлены особенностями инфекционного агента и иммунореактивности хозяина, определяемыми вариабельностью генотипов хеликобактера в отношении факторов вирулентности, а также полиморфизмом генов иммунного ответа у носителей инфекционных агентов [3, 7]. Предполагается, что особенности генотипов *H. pylori*, полиморфных локусов генов IL-1 (IL-1-511C>T, IL-1B+3954C>T, IL-1RN(VNTR)), а также IL-10 (IL-10-1082G>A) индивидов могут определять как предрасположенность, так и клинические особенности язвенной болезни [10, 12, 15]. Однако систематические исследования для проверки вышеуказанных предположений в разных регионах мира не проводились.

Цель данной работы — ассоциативный анализ распределения генотипов штаммов *H. pylori*, поли-

Чернов Владислав Моисеевич, e-mail: chernov@mail.knc.ru

морфных локусов генов цитокинов (*IL-1* и *IL-10*) и морфометрических показателей — размеров и рубцевания — язвенных дефектов у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки в г. Казани.

Материалы и методы

92 больных, пациентов 1-й городской клинической больницы и Межрегионального клиничко-диагностического центра (МКДЦ) г. Казани, в возрасте от 20 до 78 лет (средний возраст $42,3 \pm 12,9$, соотношение мужчины/женщины = 51/41) составили группу обследования. Диагноз (язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки) устанавливался клиницистом на основании результатов фиброгастродуоденоскопии, в процессе которой производился забор биоптата слизистой оболочки желудка (СОЖ). Время заболевания было сопоставимым и коротким (не более 1 года). До биопсии больные не получали специфичного курса лечения. У больных было получено согласие на участие в исследовании. Биоптаты помещали в стерильные пробирки объемом 1,5 мл и хранили при -12°C .

Контрольная группа была сформирована из жителей г. Казани, соответствующих выборке больных по возрасту и полу, отобранных по данным анамнеза (отсутствие язвенной патологии у них и их ближайших родственников). У представителей этой группы производился забор венозной крови. Общая численность группы составила 123 человека. Обе группы были смешанными по этнической принадлежности.

Экстракция и очистка ДНК из биоптатов осуществлялась с помощью коммерческого набора «Хеликопол» (НПФ «Литех», Москва) согласно инструкции изготовителя. Экстракция и очистку ДНК из крови осуществляли с помощью коммерческого набора реагентов для сорбентного выделения ДНК (НПФ «Литех», Москва), согласно инструкции изготовителя.

Выявление *H. pylori* проводили посредством ПЦР с помощью коммерческого набора «Хеликопол II» (НПФ «Литех», Москва) с использованием специфичных праймеров на нуклеотидную последовательность гена *ureC* согласно инструкции изготовителя. Амплификацию проводили в приборе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Результаты документировали с помощью видеосистемы для регистрации гелей «DNA Analyzer» (НПФ «Литех», Москва). Генотипирование штаммов *H. pylori* в отношении нуклеотидных последовательностей *cagA* и *vacA* осуществляли с помощью соответствующих наборов реагентов НПФ «Литех» (Москва) согласно инструкции изготовителя.

Определение генотипов полиморфных локусов генов *IL-1* и *IL-10* осуществляли методом ПЦР по [11, 12, 15]. Рестрикцию ампликонов *IL-1B-511* и *IL-1B+3954* проводили по [12], с использованием специфичных эндонуклеаз *AvaI* и *TaqI*, соответственно.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения MS Excel (Microsoft), программы MedCalc (v. 8.1.1.0). При сравнении частот генотипов и аллелей в группе инфицированных *H. pylori* больных язвенной болезнью и группе контроля использовали критерий χ^2 (p) с поправкой Йейтса на непрерывность. Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов (OR), а также рассчитывали его 95%-ный доверительный интервал (95%-ный ДИ) [4].

Результаты и обсуждение

В результате тестирования биоптатов больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБДК) с помощью ПЦР было установлено, что

СОЖ всех обследованных пациентов инфицирована *H. pylori*. При этом было обнаружено, что в группе больных ЯБДК достоверно чаще встречаются штаммы *H. pylori* с комбинацией генотипов *cagA⁺vacAs1⁺* ($p < 0,05$), определяющей высокую вирулентность хеликобактера (рис. 1).

В результате анализа распределения генотипов полиморфных локусов генов цитокинов (*IL-1* и *IL-10*) было обнаружено, что в группе здоровых индивидов достоверно чаще встречается аллель *IL-1B-511*Т*, тогда как в группе больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки — аллель *С полиморфного локуса *IL-1B-511* ($\chi^2 = 11,22$, $p < 0,001$). В группе больных достоверно чаще встречается генотип *IL-1B-511*С/*С*, а генотипы *IL-1B-511*С/*Т* и *IL-1RN*1/*2* достоверно реже, чем в контрольной группе (рис. 2 а,б) ($\chi^2 = 16,3$, $p < 0,001$, $OR = 4,56$, 95%-ный ДИ 2,18–9,56; $\chi^2 = 5,55$, $p < 0,05$, $OR = 0,47$, 95%-ный ДИ 0,26–0,85; $\chi^2 = 5,7$, $p = 0,017$, $OR = 0,47$, 95%-ный ДИ 0,26–0,84, соответственно).

В отношении версий генотипов *IL-1B+3954C > T* и *IL-10-1082G > A* у больных ЯБДК достоверные различия не обнаружены.

Поскольку генотипически опосредованные реакции в отношении *IL-1* и *IL-10*, обуславливающие деструктивные процессы, могут зависеть от сочетания у индивидов генотипов полиморфных локусов соответствующих генов [3], были определены частоты встречаемости разных комбинаций генотипов *IL-1B-511C > T*, *IL-1B+3954C > T*, *IL-1RN (VNTR)* и *IL-10-1082G > A* у больных, а также у представителей контрольной группы. При этом было обнаружено, что в группе больных по сравнению с контролем достоверно чаще встречается комбинация генотипов *IL-1B-511*С/*С*, *IL-1B+3954*С/*С*, *IL-1RN*1/*1*, *IL-10-1082*A/*A* ($p = 0,019$), которая, по данным исследователей [8, 14], определяет повышенную секрецию провоспалительного цитокина, однако ас-

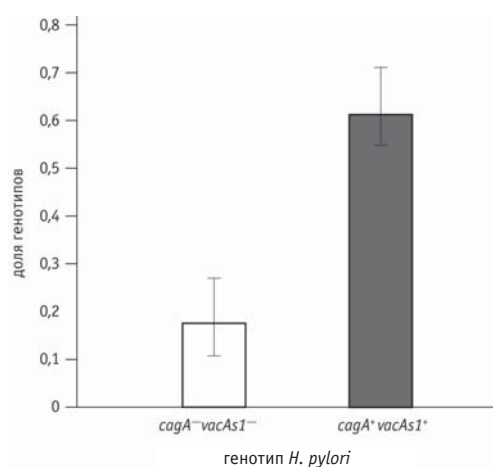


Рис. 1. Распределение штаммов *H. pylori* с генотипами *cagA⁺vacAs1⁺* и *cagA⁻vacAs1⁻* у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки * — $p < 0,05$.

социация не достигает статистической значимости (OR = 13,82, 95%-ный ДИ 0,75–254,60).

Полученные данные позволяют заключить, что у носителей аллели *IL-1B-511*С* и генотипа *IL-1B-511*С/*С* повышен риск развития ЯБДК, ассоциированной с *H. pylori*, а у носителей аллели *IL-1B-511*Т*, а также генотипов *IL-1B-511*С/*Т* и *IL-1RN*1/*2*, напротив, снижена вероятность формирования заболевания.

Полученные нами результаты исследований распределения генотипов полиморфных локусов генов цитокинов у больных ЯБДК в значительной мере совпадают с данными аналогичных исследований для Центрально-Черноземного региона России [2], но расходятся с таковыми для других регионов мира. Это согласуется с предположением о наличии региональных особенностей связи полиморфных вариантов генов *IL-1* и *IL-10* с язвенной болезнью (желудка и двенадцатиперстной кишки), ассоциированной с хеликобактерной инфекцией [1, 9, 12]. При этом гетерогенность группы больных ЯБДК по полиморфным вариантам *IL-1* и *IL-10* может свидетельствовать об участии также других (помимо исследованных) факторов в

развитии соответствующей гастродуоденальной патологии.

В результате выяснения особенностей генотипов штаммов *H. pylori* и рубцевания язвенных дефектов у больных ЯБДК было обнаружено, что вероятность самопроизвольного рубцевания язвенных дефектов индивидов выше при инфицировании СОЖ низковирулентными штаммами *H. pylori* (*cagA⁻vacAs1⁻*), чем высоковирулентными (*cagA⁺vacAs1⁺*) ($p = 0,001$, OR = 18,75, 95%-ный ДИ 2,26–155,35; $p = 0,017$, OR = 0,27, 95%-ный ДИ 0,10–0,74, соответственно) (рис. 3а).

В результате выяснения особенностей генотипов полиморфных локусов генов цитокинов (*IL-1* и *IL-10*) и рубцевания язвенных дефектов у больных было обнаружено, что вероятность самопроизвольного рубцевания язвенных дефектов выше у больных ЯБДК с генотипом *IL-1RN*1/*1*, определяющим нормальный уровень секреции провоспалительного цитокина $IL-1\beta$ [8], чем у носителей генотипа *IL-1RN*2/*2*, определяющего высокий уровень секреции провоспалительного цитокина $IL-1\beta$ ($p = 0,015$, OR = 3,69, 95%-ный ДИ 1,39–9,81; $p = 0,004$, OR = 0,05, 95%-ный ДИ 0,003–0,90, соответственно) (рис. 3б).

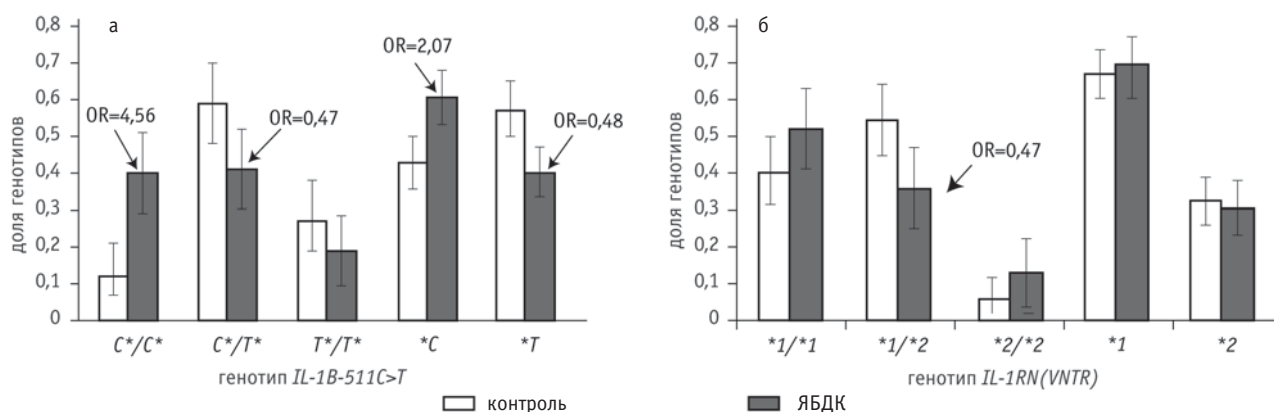


Рис. 2. Распределение аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *IL-1B* ($-511C>T$) (а) и *IL-1RN* (*VNTR*) (б) у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки

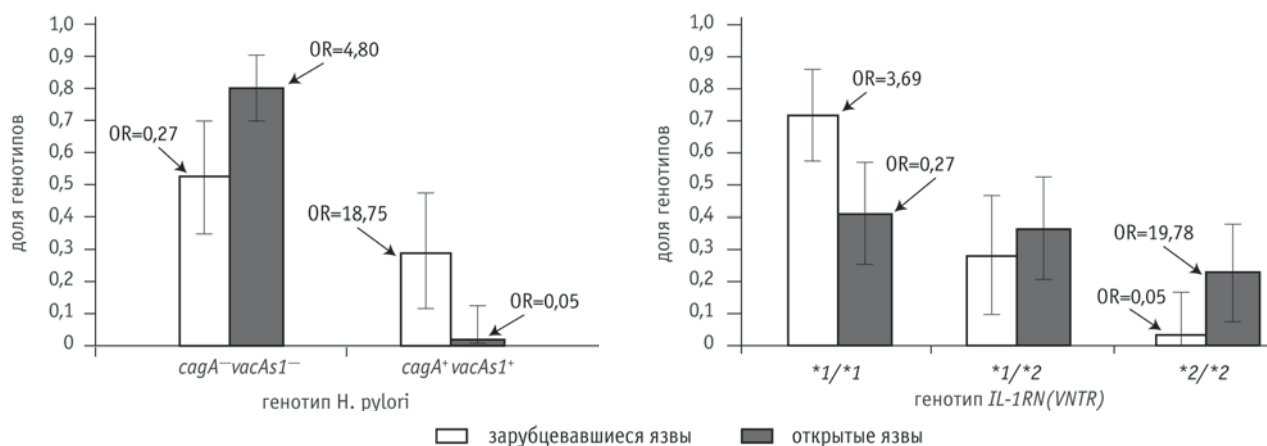


Рис. 3. Распределение генотипов *cagA vacAs1* штаммов *H. pylori* (а) и *IL-1RN* (*VNTR*) у больных ЯБДК (б) с зарубцевавшимися и открытыми язвами

В отношении распределения генотипов полиморфных локусов генов (IL-1, IL-10) и их комбинаций у больных с открытыми и зарубцевавшимися язвенными дефектами, а также размеров язвенных дефектов у индивидов с различными генотипами полиморфных локусов генов цитокинов (IL-1 и IL-10) достоверные различия не выявлены.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что вероятность самопроизвольного рубцевания язвенных дефектов у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, ассоциированной с *H. pylori*, понижена у носителей генотипа *IL-1RN*2/*2* и/или штаммов *H. pylori* с генотипом *cagA⁺vacAs1⁺*. Выявленная ассоциация может быть связана с особенностью повреждающего эффекта высоковирулентных штаммов *H. pylori* и/или высокого уровня секреции провоспалительного цитокина IL-1 β индивидов. Однако так ли это, еще предстоит выяснить. В этой связи значительный интерес представляют исследования ассоциаций морфометрических показателей

и рубцевания язвенных дефектов с генотипами *H. pylori* и полиморфных локусов генов цитокинов индивидов в других регионах мира. Однако сведения о проведении соответствующего исследования в литературе пока отсутствуют.

Исследования поддержаны грантами Фонда НИОКР РТ: 03–3.10–163 «Полиморфизм микроорганизмов, ассоциированных с заболеваниями желудочно-кишечного тракта в популяциях народов Республики Татарстан: особенности ультраструктуры и генетической вариабельности клинических изолятов *Helicobacter pylori* и микоплазм», 2001–2003 гг. и Фонда НИОКР РТ: 03–3.10–361/ 2005 «Генетический полиморфизм в популяциях народов Республики Татарстан: вариабельность генов цитокинов у пациентов с гастродуоденальными и урогенитальными заболеваниями при персистенции хеликобактерий и микоплазм», 2002–2005 гг. Авторы выражают благодарность д.м.н., проф. Абдулхакову Р.А. (Казанский государственный медицинский университет) и к.б.н. Акберовой Н.И. (каф. биохимии Казанского государственного университета) за консультации; к.м.н. Сайфутдинову И.М. и Давлиеву М.К. (МКДЦ, г. Казань) за предоставление биоптатов СОЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабич П.Н., Чубенко А.В., Лапач С.Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение третье. Отношение шансов: понятие, вычисление и интерпретация // Укр. мед. часопис. — 2005. — № 2 (46). — С. 113–119.
2. Григорьев П.Я., Яковенко А.В. Клиническая гастроэнтерология: Учебник для студентов мед. вузов. — М.: МИА, 2004. — 768 с.
3. Иванов В.П., Полоников А.В., Хорошая И.В. и др. Связь полиморфизма -511C/T в промоторной области гена интерлейкина-1 β с предрасположенностью к язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки и особенностями ее течения // Рос. ж. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. — 2006. — Т. 16, № 1. — С. 42–46.
4. Исаков В.А. Маастрихт-3 — 2005: Флорентийская мозаика противоречий и компромиссов // Эксп. клин. гастроэнтерол. — 2006. — №1. — С.78–83.
5. Решетилев Ю.И., Олейник А.И. Диагностика и лечение дуоденальных язв с неблагоприятным течением, ассоциированных с TORCH-инфекцией // Сучасна гастроэнтерол. — 2003. — № 4 (14). — С. 44–46.
6. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.М. Иммунология. — М.: Мир, 2000. — 582 с.
7. El-Omar E.M., Carrington M., Chow W.H. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer // Nature. — 2000. — Vol. 404, 6776. — P. 398–402.
8. Furuta T., El-Omar E.M., Xiao F. et al. Interleukin 1 β polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan // Gastroenterology. — 2002. — Vol. 123, № 1. — P. 92–105.
9. Garcia-Gonzalez M.A., Lanas A., Savelkoul P.H. et al. Association of interleukin 1 gene family polymorphisms with duodenal ulcer disease // Clin. Exp. Immunol. — 2003. — Vol. 134, № 3. — P. 525–531.
10. Garcia-Gonzalez M.A., Lanas A., Santolaria S. et al. The polymorphic IL-1 β and IL-1RN genes in the aetiopathogenesis of peptic ulcer / M.A. Garcia-Gonzalez // Clin. Exp. Immunol. — 2001. — Vol. 125, № 3. — P. 368–375.
11. Hwang I.R., Kodama T., Kikuchi S. et al. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1 beta production in *Helicobacter pylori* infection // Gastroenterology. — 2002. — Vol. 123, № 6. — P. 1793–1803.
12. Karhukorpi J. The search for links between immunogenetic factors and recurrent miscarriage: Academic Dissertation. — Oulu: Oulu University Press, 2005. — 75 p.
13. Rad R., Prinz C., Neu B. et al. Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleukin-1 polymorphisms for the development of the severe histological changes in the gastric mucosa // J. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 188, № 2. — P. 272–281.
14. Turner D.M., Williams D.M., Sankaran D. et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter // Eur. J. Immunogenet. — 1997. — Vol. 24, № 1. — P. 1–8.
15. Zambon C.-F., Basso D., Navaglia F. et al. *Helicobacter pylori* virulence genes and host IL-1RN and IL-1beta genes interplay in favouring the development of peptic ulcer and intestinal metaplasia // Cytokine. — 2002. — Vol. 18, № 5. — P. 242–251.

The distribution of genotypes of *Helicobacter pylori*, polymorphic loci of genes of cytokines (IL-1 and IL-10) and features of scarring of ulcerous defects in patients with duodenal ulcer

O.A. Chernova, E.R. Abuzarova, O.V. Gorshkov, N.B. Baranova, V.M. Chernov
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences, Kazan

The aim: An associative analysis of the distribution of *H. pylori* genotypes, polymorphic loci of genes of cytokines (IL-1 and IL-10) and morphometric parameters (size and scarring) of ulcerative defects in patients with duodenal ulcer in the city of Kazan. **Methods:** DNA samples obtained from 88 patients and 123 healthy individuals of the control group were used as research material. PCR and RFLP were used for genotyping of IL-1 and IL-10 in clinical samples. **Results:** It was found that the majority of patients with duodenal ulcer (inhabitants of Kazan) are carriers of highly virulent strains of *H. pylori* – *cagA+vacAs1+*. Allele *IL-1B-511*C* and the genotype *IL-1B-511*C/*C* increase the risk of duodenal ulcer associated with *H. pylori*, while the allele *IL-1B-511*T* and genotypes *IL-1B-511*C/*T* and *IL-1RN*1/*2* reduces the probability of formation of the disease. **Conclusions:** Patients with *IL-1RN*2/*2* genotype and/or infected with *H. pylori cagA+vacAs1+* have a low probability for spontaneous cicatrization of the ulcers. (Cytokines and Inflammation. 2009. Vol. 8, № 4. P. 28–31.)

Key words: *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, cytokines, gene polymorphism.