

Полиморфизм генов цитокинов у детей с персистенцией воспалительного инфильтрата после эрадикации *helicobacter pylori*

Е. Г. Поморгайло

Кафедра патологической анатомии с курсом клинической патологии ГОУ ВПО ОмГМА Росздрава, г. Омск

Cytokine gene polymorphisms at children with persistence an inflammatory infiltrate after eradication *helicobacter pylori*

E. G. Pomorgailo

Department of pathologic anatomy with a course of clinical pathology of Omsk State Medical Academy, Omsk

Резюме

Цель исследования изучить аллельные варианты генов, кодирующих интерлейкин-1бета и антагонист его рецептора, у больных с длительной персистенцией воспалительного инфильтрата в слизистой оболочке желудка после успешной эрадикации *Helicobacter pylori* в популяции юга Западной Сибири. Обследован 41 ребенок с персистенцией воспалительного инфильтрата в слизистой оболочке желудка в течение 1–2 лет после успешной эрадикации *Helicobacter pylori*. Группа сравнения — 105 детей без воспаления в слизистой оболочке желудка после элиминации инфекта. Полиморфизмы гена интерлейкин-1бета – 511 C>T и +3953 C>T и антагониста его рецептора варибельное число tandemных повторов во 2 интроне определяли с помощью полимеразной цепной реакции из периферической крови. Установлено, что дети носители аллеля T полиморфного локуса C+3953T или C-511T гена интерлейкина-1бета имеют больший риск сохранения воспаления в слизистой оболочке желудка после уничтожения инфекта (OR=8,8286, 95% CI 1,70–45,77; OR=1,814, 95% CI 1,08–3,05, соответственно). Ассоциации полиморфизма гена антагониста рецептора интерлейкина-1 с продолжительностью и интенсивностью воспалительного ответа в слизистой оболочке желудка после удаления *Helicobacter pylori* не обнаружено.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, персистенция воспаления, цитокины, генетический полиморфизм.

Summary

Objective of this research to study polymorphisms of the genes, coding interleukin-1beta and the interleukin-1 receptor antagonist, at patients with long persistence an inflammatory infiltrate after successful eradication *Helicobacter pylori* in population of the south of Western Siberia. We analyzed 41 children with persistence an inflammatory infiltrate in of a gastric mucosa within 1–2 years after successful eradication *Helicobacter pylori*. Comparison group — 105 children without an inflammation in a gastric mucosa after eradication *Helicobacter pylori*. Polymorphisms in the human interleukin-1beta gene –511 C> T and +3953 C> T and in the interleukin-1 receptor antagonist gene intron 2 variable number of tandem repeats were genotyped by polymerase chain reaction from peripheral blood. The results suggested that children carriers allele T a polymorphic locus C+3953T or C-511T a gene interleukin-1beta have more risk of reservation of an inflammation in a gastric mucosa after eradication *Helicobacter pylori* (OR=8,8286, 95% CI 1,70–45,77; OR=1,814, 95% CI 1,08–3,05, accordingly). We did not find association of polymorphism of a gene of interleukin-1 receptor antagonist with duration and intensity of the inflammation in a gastric mucosa after eradication *Helicobacter pylori*.

Key words: *Helicobacter pylori*, persistence of inflammation, cytokines, genetic polymorphism.

Введение

Helicobacter pylori (HP), попадая на нормальную слизистую оболочку, вызывает развитие острого, а затем хронического воспаления.

Установлено, что эрадикация HP приводит к значительному уменьшению мононуклеарного инфильтрата в различные сроки после окончания терапии. Вместе с тем имеются сообщения о сохранении воспаления в собственной пластинке слизистой оболочки желудка у

пациентов в течение 1–2 лет после удаления инфекта, развивается так называемый эксхеликобактерный гастрит [1, 2, 3].

Ключевую роль в цитокиновой регуляцией воспаления играет интерлейкин-1бета (IL-1B) и антагонист его рецептора (IL-1Ra). Уровень секреции цитокинов зависит от полиморфизма их генов. Описаны три варианта полиморфизма гена интерлейкин-1β (IL-1β) (-31 T>C), (-511 C>T) и (+3953 C>T), а в гене антагониста рецептора (IL-1RN) 5 аллелей с варибельным числом tandemных повторов (*variable number of tandem repeats* — VNTR) во 2-м интроне [4]. Высокий уровень провоспалительных цитокинов приво-

Е. Г. Поморгайло — к. б. н., доцент кафедры патологической анатомии с курсом клинической патологии ГОУ ВПО ОмГМА Росздрава.

дит к интенсивному рекрутированию лимфоцитов в слизистую оболочку желудка.

И действительно, в ряде исследований зарубежных авторов показана связь полиморфизма генов IL-1 β и IL-1RN с развитием хронического воспаления слизистой оболочки желудка, атрофического гастрита и рака желудка [5-11]. В других исследованиях не обнаружено какой-либо связи генетических полиморфизмов с хроническим гастритом и раком желудка [12, 13]. В России исследования полиморфизма генов цитокинов и их связь с НР-ассоциированными заболеваниями единичны [14, 15].

Цель исследования — изучить аллельные варианты генов, кодирующих IL-1 β и IL-1Ra, у больных с длительной персистенцией воспалительного инфильтрата в слизистой оболочке желудка в постэрадикационном периоде НР-ассоциированного хронического гастрита у детей юга Западной Сибири.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе гастроэнтерологического отделения детской клинической больницы №2 г. Омска. Основную группу составил 41 ребенок с НР-ассоциированным гастритом и персистенцией воспалительного инфильтрата в собственной пластинке слизистой оболочки желудка через 1 год после успешной эрадикации НР (эксхеликобактерный гастрит), средний возраст детей — 13,4 \pm 1,4 года, девочек — 23, мальчиков — 18. В группу сравнения вошли 105 детей аналогичного возраста и этнической принадлежности (русские) (средний возраст — 13,7 \pm 1,3 года, девочек — 59, мальчиков — 46) с НР-ассоциированным гастритом без воспалительного инфильтрата в слизистой оболочке желудка через 1 год после успешного удаления инфекта. Исследование одобрено локальным комитетом по этике.

Всем детям проводилась фиброгастродуоденоскопия с прицельной биопсией слизистой оболочки антрального отдела и тела желудка. Полученные при биопсии фрагменты слизистой оболочки фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, заливали в парафин по общепринятой методике. Контроль эрадикации инфекта осуществляли с применением 3 методов: гистобактериоскопического, ПЦР (НПФ «Литех», Москва) и уреазного HELPII — теста («Синтана СМ», Россия). Инфект считался удаленным при отрицательных результатах всех диагностических методов.

В обеих группах проводился забор венозной крови (4-5 мл) с антикоагулянтом и последующим получением взвеси лейкоцитов, из которой выделяли ДНК методом перхлоратной экстракции с этанольным осаждением. Исследование полиморфизма генов цитокинов про-

водили с помощью полимеразной цепной реакции (АС ПЦР и ПДРФ анализ). Использовали праймеры, синтезированные в институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск).

Структуры праймеров: ген IL-1 β (C+3953T) — (U)5'TCCTACTGGTGTT GTCATCAG3', (R)5'CTT GGGTGGACATGGTCCTG3'; ген IL-1 β (C-511T) — (U)5'AAAGAGGCAAAGGAGGGTG TTC3', (R)5'GGGTACAATGAAGGGCC AA TAG3'; ген IL-1RN (VNTR в интроне 2) — (U)5'CCCACTCATGCCTTGT TC3', (R)5'GGCT CAATGGTACCACCT3'.

Программы амплификации для гена IL-1 β (C+3953T): 95 $^{\circ}$ C — 3 мин — 1 цикл; 95 $^{\circ}$ C — 10 сек, 60 $^{\circ}$ C — 10 сек, 72 $^{\circ}$ C — 15 сек — 40 циклов; 72 $^{\circ}$ C — 2,5 мин — 1 цикл; хранение 20 $^{\circ}$ C; для гена IL-1 β (C-511T): 95 $^{\circ}$ C — 3 мин — 1 цикл; 95 $^{\circ}$ C — 10 сек, 64 $^{\circ}$ C — 10 сек, 72 $^{\circ}$ C — 25 сек — 40 циклов; 72 $^{\circ}$ C — 2,5 мин — 1 цикл; хранение 20 $^{\circ}$ C; для гена IL-1RN: 95 $^{\circ}$ C — 3 мин — 1 цикл; 95 $^{\circ}$ C — 10 сек, 62 $^{\circ}$ C — 10 сек, 72 $^{\circ}$ C — 25 сек — 40 циклов; 72 $^{\circ}$ C — 2,5 мин — 1 цикл; хранение 20 $^{\circ}$ C. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Россия).

Амплифицировали фрагменты в буфере, содержащем 10М Трис-НСI, 50мМ КСI, 1,7мМ MgCl, 0,05% Tween 20, с добавлением 0,2мМ раствора dNTP, 0,5мкМ раствора праймеров, 20нг ДНК и 1,0 ед. акт. Таq-полимеразы.

Для определения полиморфных вариантов гена IL-1 β использовали ПЦР с дальнейшей рестрикцией ампликонов эндонуклеазами рестрикции: ТаqI — для полиморфного локуса C+3953T и Aта87I — для полиморфного локуса C-511T.

Анализ амплификационных смесей проводили с помощью электрофореза в 3%-м агарозном геле с бромистым этидием.

Результаты исследований были статистически обработаны при помощи углового преобразования Фишера и χ^2 . Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов (odds ration, OR). Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Частоты встречаемости аллелей генов IL-1 β и IL-1RN соответствовали закону распределения Харди-Вайнберга.

Результаты

Постэрадикационный период у обследованных нами больных с НР-ассоциированным хроническим гастритом характеризовался вариабельным течением. У большинства пациентов (72%) на фоне элиминации возбудителя происходило полное обратное развитие воспалительных изменений слизистой оболочки и нормализация клинической симптоматики. В 105 биоптатах этой группы детей определялись

минимальные изменения слизистой оболочки желудка или их отсутствие.

У другой части детей (28%) наблюдается персистенция воспалительного инфильтрата в слизистой оболочке желудка спустя год после уничтожения инфекта, которая сопровождается сохранением симптомов функциональной диспепсии. В 41 биоптате таких больных в слизистой оболочке тела желудка отмечалось восстановление гистоархитектоники, уменьшение дистрофических изменений эпителия, снижение активности процесса и уменьшение воспалительной инфильтрации собственной пластинки слизистой оболочки, в тоже время в антральном отделе полного восстановления вышеуказанных параметров не происходило. Во всех биоптатах отмечался умеренный или выраженный мононуклеарный инфильтрат в слизистой оболочке. У 4 больных в собственной пластинке обнаруживались лимфоидные фолликулы со светлыми центрами. 21 пациент имел активный хронический гастрит. Из них у 19 отмечалась слабая степень инфильтрации собственной пластинки нейтрофильными лейкоцитами, а у 2 умеренная. Атрофия желез слизистой оболочки желудка не наблюдалась, и кишечная метаплазия эпителия отсутствовала у всех детей.

Исследование полиморфного локуса C-511T гена ИЛ-1 β выявило статистически достоверное увеличение аллеля T у больных с длительной персистенцией воспалительного инфильтрата (48%) по сравнению с детьми, у которых через год после эрадикации НР отмечались минимальные изменения в слизистой оболочке желудка (33%) ($\chi^2=4,513$; $p=0,034$; OR=1,814; 95% CI 1,08-3,05). Кроме того, среди детей с эксхеликобактерным гастритом было больше носителей генотипа T/T гена ИЛ-1 β (C-511T) по сравнению с группой сравнения, однако эти данные не достигали порога статистической значимости ($\chi^2=1,866$; $p=0,172$; OR=2,1797; 95% CI 0,84-5,65).

Генетическое исследование полиморфизма гена ИЛ-1 β (C+3953T) показало, что у больных с эксхеликобактерным гастритом статистически достоверно чаще определялся генотип T/T ($\chi^2=6,931$; $p=0,008$, OR=8,8286; 95% CI 1,70-45,77), а также значительно преобладали дети носители аллеля T ($\chi^2=4,356$; $p=0,037$, OR=1,9066; 95% CI 1,07-3,37) по сравнению с больными без персистенции воспалительного инфильтрата в собственной пластинке слизистой оболочки желудка.

При исследовании VNTR полиморфизма гена IL-1RN обнаружено, что в основной группе детей с персистенцией воспалительного инфильтрата в собственной пластинке слизистой оболочки желудка увеличивалась доля больных

с генотипом 2R/4R по сравнению с группой сравнения (46% и 32%, соответственно), однако эта разница не являлась статистически достоверной. У большинства пациентов основной группы определялся аллель с 4 повторами (60%), а аллель с 2 повторами обнаруживался у 33% больных. Другие аллели с 3, 5, 6 повторами выявлялись у 7% обследуемых.

Обсуждение результатов

Более 10 лет назад Международное агентство по изучению рака ВОЗ определило инфекцию НР как канцероген первой группы [16]. Известно, что у всех инфицированных НР развивается хроническое воспаление слизистой оболочки желудка, приводящее к атрофии, которая многократного увеличивает риск рака желудка [17].

Считается, что генетические особенности инфицированного НР макроорганизма — главный фактор риска рака желудка [18]. Процесс канцерогенеза в желудке многоступенчатый и многофакторный, однако, доминирующая роль отводится именно воспалению слизистой оболочки. Иначе говоря, к раку желудка приводит не сам НР, а вызываемое им воспаление, интенсивность развития которого определяет аллельный полиморфизм генов цитокинов организма хозяина [19].

Воспалительный ответ в колонизованной НР слизистой оболочке желудка запускается и регулируется IL-1B. Кроме того, этот цитокин считают одним из наиболее мощных ингибиторов секреции соляной кислоты париетальными клетками в желудке [20]. Гипохлоргидрия, вызванная действием IL-1B, обуславливает распространение НР из антрального отдела желудка в фундальный, что приводит в конечном итоге к развитию пангастрита [9].

Таким образом, сочетание свойств IL-1B вызывать гипохлоргидрию и стимулировать воспаление слизистой оболочки желудка позволяет отнести его к ключевым факторам канцерогенеза [18].

Известно, что ген ИЛ-1 β , кодирующий IL-1B является полиморфным [4]. Транзиции C-511T и C+3953T в гене ИЛ-1 β приводят к увеличению продукции интерлейкина-1B и, соответственно, обеспечивают больший его биологический эффект — более выраженный и продолжительный воспалительный ответ, что и подтверждает наше исследование.

По данным проведенного исследования именно аллель T гена IL-1 β (C-511T) и аллель T гена IL-1 β (C+3953T) определялись статистически достоверно чаще у пациентов с персистенцией воспалительного инфильтрата в собственной пластинке слизистой оболочки желудка в течение года после успешной эра-

дикации НР по сравнению с больными без воспаления.

В сложном каскаде воспалительного процесса имеет место антагонист рецептора IL-1B — IL-1RA. Он относится к противовоспалительным цитокинам, так как конкурентно связывается с рецептором для IL-1B на клетке-мишени и тем самым регулирует действие IL-1B. Его ген также полиморфен, аллель с 2 повторами связан с большей продукцией IL-1B [10]. Носительство аллеля 2R повышает риск развития хронического гастрита, например, у индийцев [11], а также связано с более выраженным воспалением слизистой оболочки желудка [10] и риском развития рака желудка у европейцев [6]. Однако в нашем исследовании мы не обнаружили ассоциации полиморфизма гена IL-1RN с продолжительностью и интенсивностью воспалительного ответа в слизистой оболочке желудка у больных с эксхеликобактерным гастритом.

Литература

1. Koelz R., Arnold M., Stolte H.R. et al. Treatment of *Helicobacter pylori* in functional dyspepsia resistant to conventional management: a double blind randomized trial with a six month follow up. *Gut* 2003; 52:40-6.
2. Кононов А. В., Мозговой С. И., Ливзан М. А. и др. Морфология поверхностного и атрофического гастрита В при эрадикации *Helicobacter pylori*. *Архив патологии* 2005; 3:17-21.
3. Потрохова Е. А., Кононов А. В. Гетерогенность постэрадикационного периода у детей с *H.pylori* — ассоциированным гастритом. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология* 2004; 1:145-52.
4. Smith A. J. P., Humphries S. E. Cytokine and cytokine receptor polymorphism and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008; 516:17-34.
5. Machado J. C., Figueiredo C., Canedo P. et al. A pro-inflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125:364-71.
6. Figueiredo C., Machado J. C., Pharoah P. et al. *Helicobacter pylori* and Interleukin 1 Genotyping: An Opportunity to Identify High-Risk Individuals for Gastric Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 2002; 94(22):1680-7.
7. Furuta T., El-Omar E. M., Xiao F. et al. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology* 2002; 123:92-105.
8. Camargo M. C., Mera R., Correa P. et al. Interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15:1674-87.
9. El-Omar E. M. The importance of interleukin 1 beta in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* 2001; 48:743-7.
10. Rad R., Dossumbekova A., Neu B. et al. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 2004; 53(8):1082-9.
11. Achyut B. R., Moorchung N., Mittal B. Genetic association of interleukin-1 haplotypes with gastritis and precancerous lesions in North Indians. *Clinical and experimental medicine* 2008; 8(1):23-9.
12. Moorchung N., Srivastava A. N., Gupta N. K. et al. Cytokine gene polymorphisms and the pathology of chronic gastritis. *Singapore Med. J.* 2007; 48(5):447-54.
13. Li C., Xia H.H., Xie W. et al. Association between interleukin-1 gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis in a Chinese population. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2007; 22(2):234-9.
14. Иванов В. П., Полоников А. В., Хорошая И. В. и др. Связь полиморфизма -511C/T в промоторной области гена интерлейкина-1b с предрасположенностью к язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки и особенностями ее течения. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2006; 5:35-43.
15. Маев И. В., Момыналиев К. Т., Говорун В. М. и др. Эффективность эрадикации *Helicobacter pylori* у больных язвенной болезнью в зависимости от полиморфизма гена IL-1β -511. *Российский журнал гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* 2008; 6:27-32.
16. IARC Working group on the evaluation of Schistosomes, lives flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC monogr. eval carcinog. risk hum.* 1994; 61:1-241.
17. Correa P., Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133:659-72.
18. Аруин Л. И. Из 100 инфицированных *Helicobacter pylori* рак желудка возникает у двоих. Кто они? *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология* 2004; 1:12-18.
19. Кононов А. В. Воспаление как основа *Helicobacter pylori* — ассоциированных болезней. *Архив патологии* 2006; 5:3-10.
20. Beales I. L., Calam J. Interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut* 1998; 42:227-34.

Заключение

Таким образом, исход НР-ассоциированного хронического гастрита зависит от генетических особенностей макроорганизма. Решающее значение имеет полиморфизм генов цитокинов, который определяет уровень их секреции. В частности, аллель Т полиморфных локусов С-511Т и С+3953Т гена ИЛ-1β ассоциируются с более продолжительным и выраженным воспалением слизистой оболочки желудка, что позволяет говорить о их провоспалительной роли в патогенезе хронического гастрита.

Оценка фенотипа воспалительного ответа в корреляции с изучением генетического полиморфизма воспалительных цитокинов может служить отправной точкой в определении группы риска рака желудка у пациентов с успешной эрадикацией НР на стадии эксхеликобактерного гастрита.