

## КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

УДК 616.3-54.1

Е.С. Агеева, О.В. Штыгашева

ОСОБЕННОСТИ АССОЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ -251 T>A ГЕНА IL-8 И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ *HELICOBACTER PYLORI* У КОРЕННЫХ И ПРИШЛЫХ ЖИТЕЛЕЙ ХАКАСИИ

ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова» (Абакан)

Исследовали полиморфизм гена интерлейкина IL-8 при *Helicobacter pylori*-ассоциированных заболеваниях: язвенной болезни и хроническом гастрите у коренных и пришлых жителей Хакасии методом рестрикционного анализа. Распространенность субтипов VacA+ и CagA+ *Helicobacter pylori* проводили методом полимеразной цепной реакции. Выявлены наиболее распространенные аллельные варианты генов цитокинов среди хакасов. Обсуждается целесообразность определения популяционных рисков и протективных генотипов *Helicobacter pylori*, способствующих развитию язвенной болезни у хакасов.

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

## PECULIARITIES OF AN ASSOCIATION OF POLYMORPHOUS MARKERS -251 T&gt;A OF IL-8 GENE AND POLYMORPHISM OF HELICOBACTER PYLORI GENES IN NATIVE AND VISITANT POPULATION OF THE REPUBLIC OF KHAKASSIA

E.S. Ageeva, O.V. Shtygasheva

Khakas State University named after N.F. Katanov, Abakan

We researched polymorphism of interleukin IL-8 gene at *Helicobacter pylori*-associated diseases: ulcers and chronic gastritis in native and visitant population of the Republic of Khakassia by the method of restriction enzyme digest analysis. Prevalence of subtypes VacA+ and CagA+ of *Helicobacter pylori* was realized by the method of polymerase chain reaction. We revealed the most widespread allelic variants of genes of cytokines among Khakas. The expediency of determination of population risk and protective genotypes of *Helicobacter pylori* that promote development of ulcer disease in Khakas.

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

## Введение

Два выдающихся фактора в истории изучения *Helicobacter pylori* (HP) оказали влияние на дальнейшее исследование патогенеза язвенной болезни. Это открытие в 1984 г. Robin Warren и Barry Marshal HP в качестве причины развития хронического гастрита и язвенной болезни [16]. Вторым событием является расшифровка генома HP, нуклеотидная последовательность которого содержит 1600 генов [3].

Однако поиск этиопатогенетических факторов продолжается. Это связано с генетической гетерогенностью популяций — одной из главных детерминант, влияющих на инфицирование определенными штаммами HP и направление патологического процесса.

Эпидемиологическое исследование, проведенное в Хакасии, показало, что при одинаковой распространенности инфекции среди коренных и пришлых жителей у хакасов ЯБ регистрируется в два раза реже, чем у европеоидов. Различия ЯБ у коренного и пришлого населения касались распространенности, структуры, клинических проявлений, особенностей локального иммунитета [2]. На основании этих данных была высказана гипотеза о существовании генетически-детерминированных особенностей иммунного ответа у хакасов, определяющих характер течения HP-ассоциированной патологии [1].

Одним из ключевых медиаторов HP-ассоциированного воспаления и ассоциированных с ним хронического гастрита и язвенной болезни является IL-8 [18]. Патогенетические механизмы IL-8 связаны с миграцией нейтрофилов и других фагоцитирующих клеток, генерацией ими окислительного взрыва, некрозом и апоптозом эпителиоцитов. Аллельные варианты гена, кодирующего IL-8, имеют несколько вариантов, по-разному влияющих на экспрессию, а следовательно, и на продукцию самого интерлейкина [12]. Генотипы AA и TA -251 IL-8 ассоциированы с повышенной продукцией цитокина, следовательно, детерминируют более выраженную воспалительную реакцию [10]. Кроме того, высокий уровень IL-8 определяется при инфицировании CagA штаммами HP [4, 7, 15].

**Целью** работы являлось оценить роль полиморфизма T -251A гена IL-8 и роль CagA + /VacA + штаммов HP у коренных и пришлых жителей Хакасии, страдающих язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и хроническим гастритом.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 146 хакасов (коренное население) и 145 европеоидов (пришлое население). В группы исследования были включены 120 больных хрони-

ческим поверхностным антральным гастритом (ХГ) (60 хакасов и 60 европеоидов) и 71 больной язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБ) (36 хакасов и 35 европеоидов), сопоставимых по полу. Средний возраст хакасов был равен  $47,4 \pm 8,6$  года, европеоидов —  $42,8 \pm 9,2$  года. Группу контроля составили 100 практически здоровых доноров (50 хакасов и 50 европеоидов) с аналогичными характеристиками по полу и возрасту.

Диагноз ЯБ основывался на данных эндоскопического исследования, в период обострения заболевания. Верификация ХГ основана на данных морфометрии (рекомендации Сиднейской классификации ХГ, 1990). Для выявления НР-инфекции использовали гистоскопический метод с окраской по Гимзе и быстрый уреазный тест. Специфические иммуноглобулины G к НР определяли в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией («ИмДиспектр», г. Новосибирск). Таким образом, в дальнейшем исследование нами были включены только пациенты с НР-ассоциированной патологией.

Для генотипирования НР ДНК выделяли из замороженных биопсийных образцов антрального отдела желудка с использованием протеинкиназы K (Хеликопол «Литех», г. Москва). Амплификацию *cafA* и *vacA* генов НР проводили наборами фирмы «Литех» (г. Москва) согласно приложенному протоколу исследования. Полученные ПЦР-продукты анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с последующей детекцией в УФ-свете.

Для исследования аллельного полиморфизма T-251A гена IL-8 ДНК выделяли из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Амплификацию проводили с использованием праймеров, синтезированных в «Сибэнзим» (г. Новосибирск). Наличие аллеля A формирует сайт рестрикции для Mfe I. Полученные ПЦР-продукты анализировали с помощью электрофореза в 4% агарозном геле. В качестве маркера размера ДНК использовали плазмиду pUC19, расщепленную рестриктазой MspI («Сибэнзим», г. Новосибирск).

При описании генетических характеристик исследованных групп использовали следующие методы: распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди — Вайнберга. Для проверки значимости общей меры связи использовали критерий  $\chi^2$  Мантела — Ханзела, позволяющий оценить значение критерия отношения шансов (OR — Odds Ratio) с расчетом для него 95% доверительного интервала (CI — Confidence Intervals) [17].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании распространенности НР в обследованных когортах было показано, что при высокой инфицированности НР (95,4 % — среди европеоидов, 95,2 % — среди хакасов) соотношение штаммов в обследованных популяциях резко отличалось. *VacA*-штаммы встречались у 100 % представителей обеих обследованных групп населения. Среди хакасов *vacA* s1 штаммы НР диагностировались у 15,0 %

больных ЯБ и у 22,2 % больных ХГ. Частота *vacA* s2 штаммов не различалась у больных ЯБ и ХГ (38,1 % и 37,0 % соответственно), *vacA* s1s2 НР составили 47,6 % и 40,7 % соответственно. Распространенность *vacA* m1 также не имела статистически значимых различий у больных ЯБ, по сравнению с больными ХГ (14,3 % и 7,4 % соответственно). Содержание *vacA* m2 у хакасов с ЯБ составляло 38,1 %, что было достоверно ниже по сравнению с больными ХГ — 62,9 % ( $\chi^2 = 12,5; p < 0,05$ ). Частота *vacA* m1m2 штаммов НР при ЯБ — 42,9 %, при ХГ — 29,6 %.

У европеоидов частота *vacA* s1 штаммов НР не различалась у больных ЯБ и ХГ (16,6 % и 27,5 % соответственно). Частота *vacA* s2 при ЯБ была ниже, чем при ХГ (27,7 % и 41,4 % соответственно). При ЯБ *vacA* s1s2 НР встречались чаще, чем при ХГ (55,6 % и 27,6 % соответственно;  $\chi^2 = 16,1, p < 0,05$ ). Учитывая значение критерия отношения шансов (OR = 3,3 при 95% CI (1,7 — 6,2)), можно сделать вывод, что у европеоидов риск развития ЯБ ассоциирован с *vacA* s1s2 генотипом возбудителя.

При ХГ у европеоидов преобладал *vacA* m1 НР (62,1 %) по сравнению с ЯБ (22,2 %;  $\chi^2 = 32,8, p < 0,05$ ). Инфицирование *vacA* m2 НР чаще встречалось при ЯБ (38,8 %) по сравнению с ХГ (10,3 %;  $\chi^2 = 22,7, p < 0,05$ ). Содержание *vacA* m1m2 имело достоверное увеличение показателя у больных ЯБ (38,9 %), по сравнению с их содержанием у больных ХГ (10,7 %;  $\chi^2 = 20,7, p < 0,05$ ).

Частота *cafA* штаммов НР была достоверно выше у европеоидов, чем у хакасов (93,3 % и 57,1 %;  $p < 0,01$ ). Нами показано, что у хакасов *cafA* штаммы НР регистрировались у 95,2 % больных ЯБ и у 37,0 % — с ХГ ( $\chi^2 = 91,9; p < 0,05$ ). Учитывая значение критерия отношения шансов, можно достоверно предполагать о связи *cafA* и риске развития ЯБ у хакасов: OR = 32,3 при 95% CI (11,3 — 99,6).

Среди европеоидов контрольной группы доминирующим генотипом был гетерозиготный TA-251 IL-8 (табл. 1). Вторым по частоте встречаемости в этой группе являлся гомозиготный по дикому аллелю генотип TT-251 IL-8. Несколько реже встречался генотип AA-251 IL-8. В группе пациентов с ХГ распределение гомо- и гетерозиготных генотипов не различалось, по сравнению с контролем. Среди европеоидов, больных ЯБ, доля гетерозигот TA-251 IL-8 увеличивалась ( $\chi^2 = 3,9; p < 0,05$ ) и была выше, по сравнению с контролем. Содержание генотипа AA-251 IL-8 у больных ЯБ пришлых жителей не имело достоверных различий, по сравнению с частотой данного генотипа в контроле.

Проведенная нами оценка распределения частот аллелей и генотипов -251 T>A IL-8 не выявила статистически значимых различий между сравниваемыми группами коренных жителей — больных ХГ и здоровых доноров. Согласно полученным результатам, в группе здоровых лиц гомозиготный TT-251 IL-8 и гетерозиготный TA-251 IL-8 генотипы встречались с одинаковой частотой (табл. 1). Среди хакасов с ЯБ частота генотипа TT-251 IL-8 у больных ЯБ не имела достоверных различий, по сравнению с контролем, в то время как доля гетерозигот TA-251

Таблица 1

Распределение частот генотипов и аллелей гена -251 T>A IL-8 у коренного и пришлого населения Хакасии (%)

Генотип	Хакасы			Европеоиды		
	Здоровые доноры (n = 50)	Больные ХГ (n = 60)	Больные ЯБ (n = 36)	Здоровые доноры (n = 50)	Больные ХГ (n = 60)	Больные ЯБ (n = 36)
<b>Генотипы</b>						
ТТ	44,0	46,7	44,5	38,0	35,0 <sup>3</sup>	22,8 <sup>3</sup>
ТА	42,0	43,3	22,2 <sup>1, 2</sup>	46,0	46,7	60,0 <sup>1, 2, 3</sup>
АА	14,0	10,0	33,3 <sup>1, 2</sup>	16,0	18,3	17,2 <sup>3</sup>
<b>Аллели</b>						
Т	65,0	68,4	55,6	61,0	58,4	52,8
А	35,0	31,4	44,4	39,0	41,6	47,2
PXB ( $\chi^2$ )	0,07 <sup>4</sup>	9,06	0,001 <sup>4</sup>	0,02 <sup>2</sup>	0,89 <sup>4</sup>	2,84 <sup>4</sup>

**Примечание:** 1 –  $p < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с контролем; 2 –  $p < 0,05$  – с группой больных хроническим гастритом; 3 –  $p < 0,05$  – достоверность различий показателей между хакасами и европеоидами; 4 –  $p > 0,05$  – распределение частот генотипов, соответствующее закону Харди – Вайнберга (PXB).

IL-8 у пациентов с ЯБ была существенно снижена относительно контроля ( $\chi^2 = 9,0$ ;  $p < 0,05$ ), и увеличена – доля гетерозигот АА-251 IL-8 ( $\chi^2 = 10,3$ ;  $p < 0,05$ ). Между генотипом АА и риском развития язвенной болезни у хакасов была выявлена положительная взаимосвязь (OR = 3,15 при 95% CI (1,46 – 6,89)). В то же время наличие ТА-251 IL-8 можно расценивать как генотип снижения риска развития ЯБ (OR = 0,40 при 95% CI (0,20 – 0,76)).

При межпопуляционном сравнении распределения генотипов среди больных нами были получены следующие результаты. Генотип ТТ-251 IL-8 у европеоидов с ЯБ встречался реже, по сравнению с частотой генотипа у хакасов с ЯБ. У европеоидов с ЯБ содержание гетерозигот ТА-251 IL-8 было статистически выше, чем среди хакасов с ЯБ ( $\chi^2 = 29,0$ ;  $p < 0,05$ ). У больных ЯБ, по сравнению с контролем, происходила инверсия признака: у хакасов была увеличена доля генотипа АА-251 IL-8, у европеоидов – снижена (табл. 1).

В результате анализа распределения аллелей было показано, что во всех группах преобладал аллель Т-251 IL-8, при этом у больных ЯБ как у хакасов, так и у европеоидов, частота встречаемости данного аллеля была снижена. Доля аллеля А-251 IL-8 возрастала у больных ЯБ обеих популяций, при этом частота аллеля А-251 IL-8 у хакасов была ниже, чем у европеоидов.

Наши данные нашли отражение и при сравнении с результатами других исследователей. E. Garza-Gonzalez et al. (2007), P. Canedo et al. (2008) продемонстрировали преобладание гетерозиготного генотипа ТА-257 IL-8 при ХГ [6, 9]. J.M. Kang et al. (2009) также показали, что, хотя при ЯБ преобладающим генотипом был ТА и ТТ -257 IL-8, при этом риск развития заболевания связан с генотипом АА-257 IL-8 [14]. Подобные результаты (ассоциация АА-251 IL-8 с риском развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки) были выявлены P. Hofner (2007) [11].

Исследования содержания IL-8 в сыворотке крови в зависимости от генотипа показывают, что концентрация IL-8 у носителей генотипа АА полиморфизма Т-251 А гена IL-8 ассоциирована с высо-

кой концентрацией цитокина, тяжелой степенью воспаления, атрофией слизистой, по сравнению с генотипом ТТ-251 IL-8 [21].

Необходимо отметить, что инфицирование CagA+ штаммами НР также приводит к увеличению концентрации цитокина [5, 8, 15, 18]. Важную роль в запуске и стимуляции продукции IL-8 играет липополисахарид клеточной стенки НР, причем разные штаммы НР оказывают разное стимулирующее влияние. Считается, что CagA+ НР штаммы увеличивают продукцию цитокина. В результате анализа внутриклеточных сигнальных механизмов было показано, что НР индуцирует транскрипцию гена IL-8 через активацию NF-кВ р65 [19].

Следует отметить, что результаты эпидемиологических исследований наличия связи между экспрессией НР маркера островка патогенности CagA и наличием ЯБ довольно противоречивы. Объясняется это тем, что в Юго-Восточной Азии почти 90% штаммов НР в популяции – CagA-позитивные (независимо от клинической формы инфекции) [13, 20]. В то же время в Европейских странах, штаммы НР, не экспрессирующие CagA, встречаются чаще, и потому вероятность обнаружить CagA штаммы НР у больных с различными заболеваниями выше, чем у клинически здоровых лиц [4].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сочетание CagA и АА -251 IL-8 сопряжено с более выраженным воспалением в слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки. Вместе с тем следует заметить, что любой фактор, усиливающий воспаление, атрофические изменения в слизистой оболочке желудка, увеличивает риск возникновения заболевания (язвенная болезнь, хронический гастрит). Однако штаммы НР, не экспрессирующие CagA, не являются комменсалами, так как обнаруживаются и у больных язвенной болезнью, и у больных раком желудка, хотя и значительно реже. Это связано с тем, что подверженность к язвенной болезни и хроническому гастриту является полигенной. В этой связи поли-

морфизм гена AA -251 IL-8 – важный, но далеко не единственный фактор риска развития заболевания.

Выявленная нами гетерогенность ассоциации язвенной болезни у хакасов (генотип AA -251 IL-8 с CagA штаммами НР) и у европеоидов (субтипы s1s2 VacA штаммов НР) является свидетельством генетически-детерминированных различий лежащих в механизмах развития ЯБ у двух популяций. Иммуногенетические критерии, полученные в результате наших исследований, являются пионерными и позволяют использовать их в качестве предикторов гастродуоденальной патологии у коренного и пришлого населения, проживающего в Хакасии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гены и болезни хакасов / О.В. Штыгашева, Е.С. Агеева, В.Н. Харьков [и др.]. – Красноярск: Поликор, 2010. – 296 с.
2. Штыгашева О.В., Цуканов В.В. Распространенность инфекции *Helicobacter pylori* и частота диспептических жалоб у населения Хакасии // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2004. – № 2. – С. 33–36.
3. Alm R., Ling L.S., Moir D.T. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* // Nature. – 1999. – Vol. 397. – P. 176–180.
4. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer / E. Garza-Gonzalez, F. J. Bosques-Padilla, S. I. Mendoza-Ibarra [et al.] // BMC Cancer. – 2007. – Vol. 7. – P. 70.
5. Audibert C., Burucoa C., Janvier B. Implication of the structure of the *Helicobacter pylori* Cag pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion // Infect. Immunol. – 2001. – Vol. 69 (3). – P. 1625–1629.
6. Comparison of CXC chemokines ENA-78 and interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori*-associated gastritis / G. Rieder, W. Einsiedl, R.A. Hatz [et al.] // Infection and Immunity. – 2001. – Vol. 69. – P. 81–88.
7. Correlation between IL-8 induction, cagA status and vacA genotypes in 153 French *Helicobacter Pylori* isolates / C. Audibert, B. Janvier, B. Grignon [et al.] // Res. Microbiol. – 2000. – Vol. 151, N 3. – P. 191–200.
8. Crabtree J.E., Kersulyte D., Li S.D. Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by CagPAI encoded VirD4 homologue // J. Clin. Pathol. – 1999. – Vol. 52 (9). – P. 653–657.
9. Differential effects of multiplicity of infection on *Helicobacter pylori*-induced signaling pathways and interleukin-8 gene transcription / B. Ritter, P. Kilian, M.R. Reboll [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2011. – Vol. 31 (1). – P. 60–68.
10. Genetic polymorphism of interleukin-8 (IL-8) is associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer / Z. Gyulai, G. Klausz, A. Tiszai [et al.] // Eur. Cytokine Network. – 2004. – Vol. 15 (4). – P. 353–358.
11. Genetic polymorphisms of NOD1 and IL-8, but not polymorphisms of TLR4 genes, are associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer and gastritis / P. Hofner, Z. Gyulai, Z.F. Kiss [et al.] // Helicobacter. – 2007. – Vol. 12. – P. 124–131.
12. Marshall B.J., Warren W.M. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis // Lancet. – 1983. – Vol. 1, N 8305. – P. 1273–1275.
13. McHugh M.L. The odds ratio: calculation, usage, and interpretation The Biochemia Medica // J. Croatian Soc. Med. Biochemists. – 2009. – Vol. 19 (2). – P. 120–126.
14. Polymorphism in the CagA EPIYA Motif Impact Development of Gastric Cancer / K.R. Jones, Y.M. Joo, S. Jang [et al.] // J. Clinical Microbiology. – 2009. – Vol. 47 (4). – P. 959–968.
15. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8 / W. Fischer, J. Puls, R. Buhrdorf [et al.] // Molecular Microbiology. – 2001. – Vol. 42. – P. 1337–1348.
16. The discrepancy between genetic polymorphism of p53 codon 72 and expression of p53 protein in *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer in Korea / N. Kim, S.I. Cho, H.S. Lee [et al.] // Digestive Diseases and Sciences. – 2010. – Vol. 55 (1). – P. 101–110.
17. The effects of genetic polymorphisms of IL-6, IL-8 and IL-10 on *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases in Korea / J.M. Kang, N. Kim, D.H. Lee [et al.] // J. Clin. Gastroenterology. – 2009. – Vol. 43, N 5. – P. 420–428.
18. The interleukin-8-251 A allele is associated with increased risk of noncardia gastric adenocarcinoma in *Helicobacter pylori*-infected Koreans / B.D. Ye, S.G. Kim, J.H. Park [et al.] // J. Clin. Gastroenterology. – 2009. – Vol. 43 (3). – P. 233–239.
19. The interleukin-8-251 T/\*A polymorphism is not associated with risk for gastric carcinoma development in a Portuguese population / P. Canedo, A.J. Castanheira-Vale, N. Lunet [et al.] // Eur. J. Cancer Prevent. – 2008. – Vol. 17. – P. 28–32.
20. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus / J. Hull, H. Ackerman, K. Isles [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2001. – Vol. 69. – P. 413–419.
21. Yamaoka Y., Kodama T., Kita M. Relationship of VacA genotypes of *Helicobacter pylori* to CagA status, cytotoxin production, and clinical outcome // Helicobacter. – 1998. – Vol. 3 (4). – P. 241–253.

#### Сведения об авторах

**Агеева Елизавета Сергеевна** – кандидат медицинских наук, заведующая кафедрой фундаментальной медицины и гигиены ГОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова» (655014, Республика Хакасия, г. Абакан, ул. Родниковая, 13; тел.: 8 (3902) 34-27-20; факс: (3902) 22-21-72; e-mail: Ageevaeliz@rambler.ru)

**Штыгашева Ольга Владимировна** – доктор медицинских наук, ректор, заведующая кафедрой внутренних болезней ГОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова» (655017, Республика Хакасия, г. Абакан, ул. Ленина, 90; тел.: 8 (3902) 24-30-18; факс: 8 (3902) 24-35-73; e-mail: olgashtygashева@rambler.ru)