

ПОЛИМОРФИЗМ IL-1 β У ПАЦИЕНТОВ С НПВП–ГАСТРОПАТИЯМИ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *HELICOBACTER PYLORI*

¹ГУ «РНПЦ радиационной медицины и экологии человека», г. Гомель, Беларусь

²УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Беларусь

³УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Беларусь

Целью настоящей работы является определение полиморфизма гена, кодирующего белок IL-1 β , и установление возможной связи с инфекционным процессом, вызываемым *Helicobacter pylori*. В обследование были включены 145 пациентов, получавших нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП). Для проведения исследований использовался метод анализа длин рестрикционных фрагментов ампликонов или ПЦР-ПДРФ. Большей склонностью к образованию неонкогенных комплексов в группе пациентов, принимавших НПВП и не имеющих гастропатии по 31 локусу гена IL-1 β ,обладают гетерозиготы, что может считаться прогностически благоприятным признаком. Развитие НПВП-гастропатий чаще отмечается у гомозиготных организмов с генотипом СС по 31 локусу гена IL-1 β , что, таким образом, может являться прогностически неблагоприятным признаком.

Ключевые слова: ПЦР-ПДРФ, полиморфизм IL-1 β , *Helicobacter pylori*

Введение

Известно, что применение нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) сопряжено с достаточно высоким риском нежелательных явлений со стороны желудочно-кишечного тракта, среди которых гастропатия и ее осложнения в виде кровотечений могут представлять непосредственную угрозу жизни. Более 30 млн. человек в мире ежедневно принимают НПВП, причем в 2/3 случаев – без назначения и контроля врача. До 60% госпитализированных с желудочными кровотечениями указывают на предшествующий прием НПВП.

Термином NSAID-gastropathy (НПВП-гастропатия) принято обозначать эрозивно-язвенные поражения гастродуоденальной зоны, связанные с приемом этих препаратов и имеющие характерную клинико-эндоскопическую картину. Специфические особенности этих поражений – появление на фоне применения НПВП острых, обычно множественных гастродуоденальных эрозий и/или язв с преимущественной локализацией в антральном отделе желудка; отсутствие локального

воспаления и гистологических признаков гастрита; мало- или асимптомное течение и частая манифестация осложнением (до 60% – кровотечением, реже – перфорацией язвы, стенозом привратника); склонность язв к заживлению при отмене НПВП [1].

В 2005 году европейская рабочая группа EHPSG – «Консенсус Маастрихт-3» приняла всесторонние и обобщающие подходы к анализу взаимоотношений между инфекцией *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) и такими заболеваниями, как функциональная диспепсия, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, НПВП-гастропатия, а также современные подходы к диагностике инфекции и проведению эрадикационной терапии [2]. Согласно полученным данным, риск развития эрозий и язв желудка и двенадцатиперстной кишки у *H.pylori*-положительных больных выше, чем у *H.pylori*-отрицательных.

В геноме *H.pylori* имеются гены (*vacA*, *cagA*, *babA*, *IceA*), ассоциированные с повышенной патогенностью микроорганизма. Протеин CagA (*cytotoxin associated gene*) имеет размер 128 kDa и обязан своим име-

нем первоначальной ассоциации с экспрессией *vacA*-гена. Тем не менее дальнейшие исследования показали, что образование цитотоксина *vacA* возможно без наличия *cagA*-гена [3]. **CagA-ген считается маркером группы примерно 30 генов, т.н. *cag* Pathogenitatsinsel (*cag*-PAI) – островка патогенности.** Некоторые из этих генов кодируют 4 тип секреторной системы, посредством которой протеин CagA может проникать в клетки эпителия [4]. Механизм обусловлен фосфорилированием тирозинкиназы и запуском каскада реакций приводящих к необратимым изменениям в цитоскелете и в клеточном цикле клетки хозяина. В слизистой желудка больных, инфицированных *H.pylori*, увеличивается образование не только IL-8, но и провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, а также фактора некроза опухоли. Уровень IL-1 β в культуре биопсийных образцов из антрального отдела желудка значительно выше у *H.pylori* – положительных пациентов, чем у индивидуумов с отсутствием *H.pylori* и нормальной слизистой желудка. Локальная продукция IL-1 β в желудке является важным фактором гипохлоридрии, т. к. IL-1 β ингибирует секрецию кислоты и пепсиногена. С полиморфизмом гена цитокина IL-1 β (IL-1 β -31T) и IL-IRN 2 ассоциируется низкая секреция кислоты, желудочная атрофия и высокий риск развития рака желудка.

Современное состояние научных исследований в области молекулярно-генетической диагностики инфекционной и неинфекционной патологий позволяет проводить дифференцированное изучение структуры отдельных генов и их локусов, ответственных за развитие тех или иных патологических состояний [5]. Для диагностики патологических состояний, связанных с *H.pylori* используется целый набор методов включающий в себя иммуноферментный анализ, быстрый уреазный тест, морфологические и молекулярно-генетические методы. Одним из вариантов последних – полимеразная цепная реакция (ПЦР). Относительно недорогим и доступным ва-

риантом ПЦР является метод анализа длинных рестрикционных фрагментов ампликонов или ПЦР-ПДРФ, использующий особого типа ферменты – рестриктазы, открытые в 1962 году Арбером. Рестриктазы способны разрезать молекулы ДНК только в тех местах (сайтах рестрикции), где имеется определенная последовательность нуклеотидов. Использование данного варианта ПЦР позволяет в частности проводить изучение полиморфизма гена кодирующего белок IL-1 β в 31-511 нуклеотидной позиции, что представляется весьма важным, так как известно, что уровень цитокинов зависит не только от стимулирующего фактора, но и от аллельных форм цитокинов [3]. Полиморфизм генов-цитокинов при инфекционном процессе, вызываемом *H.pylori*, изучен недостаточно полно [4]. Полученные различными авторами данные весьма противоречивы [6-8]. Нам представляется, что возможность влияния на патологический инфекционный процесс, связанный с колонизацией слизистой желудка *H.pylori* и особенностями полиморфизма некоторых цитокинов, может иметь далеко идущие перспективы.

Целью данной работы явилось изучение полиморфизма гена, кодирующего белок IL-1 β , и установление возможной связи с инфекционным процессом, вызываемым *H.pylori*.

Материалы и методы исследования

Группы исследования и алгоритм генетического анализа. Обследованим были охвачены 145 пациентов, получавших нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), часть из которых – 91 человек или 62,75% имели выраженные клиничко-морфологические проявления в виде НПВП-гастропатий (эрозии и язвы желудочно-кишечного тракта) и 54 человека (37,25%) – без таковых проявлений.

Алгоритм молекулярно-генетического анализа был следующим: на первом этапе исследования всех пациентов тестировали на наличие в биоптатах ДНК *H.pylori*.

Далее, при полученном положительном результате, ДНК анализировали на соответствие генотипу CagA – одному из наиболее клинически значимых генотипов *H.pylori* с высоким онкогенным потенциалом. По результатам этих исследований было сформировано по две группы обследуемых, в зависимости от наличия гастропатии: без гастропатий (Бг) и с гастропатиями (Г), каждая из которых в свою очередь была разбита еще на две подгруппы – *H.pylori*-положительную (НР+) и *H.pylori*-отрицательную (НР-) и CagA положительную (CagA +), CagA-отрицательную (CagA -). Таким образом, было сформировано две когорты, в каждую из которых вошли по 4 исследуемых группы. Затем у всех обследуемых проводилось тестирование однонуклеотидных полиморфизмов – 31С/ Т и 511 С/ Т в промоторной области гена Interleukin-1 β (IL-1 β) и осуществлялся сравнительный анализ частот встречаемости различных генотипов IL-1 β во всех четырех группах исследования по двум анализируемым когортам.

Пробоподготовка. Образцы биоптатов желудка, взятые у пациентов, были помещены в 0,9 % NaCl и хранились при температуре – 20 $^{\circ}$ C. Выделение ДНК проводили двумя способами: при большом количестве экспериментального материала (более 10 мг) – с помощью коммерческого набора «Сорб-Б» (ЦНИИ эпидемиологии и микробиологии, Россия), при малом количестве материала (менее 10 мг) использовали SDS-метод [3]. Качественный и количественный анализ полученных препаратов ДНК проверяли на спектрофотометре Nanodrop-1000, позволяющем проводить измерение ДНК в объеме 1 мкл безкюветным способом.

Проведение ПЦР. Для первого этапа тестирования использовали коммерческую ПЦР тест-систему производства ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора «АмплиСенс-100-R», разработанную для амплификации участка ДНК длиной 520 пар нуклеотидов 16S-рибосомального гена *H.pylori*.

Остальные этапы молекулярно-генетических исследований осуществляли посредством самостоятельно приготовленных растворов необходимых для проведения ПЦР.

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл формировалась следующим образом: 2,5 мкл 10х ПЦР буфер (100 мМ Трис-НСl рН 9,0 500 мМ КСl, 25 мМ MgCl $_2$), 1 мкл 10 мМ смеси дНТФ, 1 мкл каждого 10 мкМ праймера, 1 мкл Taq- полимеразы (1ед./ мкл), 1 мкл образца ДНК (20 нг/ мкл), деионизированная вода до объема 25 мкл. Используемые для амплификации праймеры представлены в таблице 1.

Программа ПЦР для определения генотипа CagA выглядела следующим образом: начальная денатурация – 3 мин при 95 $^{\circ}$, затем 35 циклов – 30-сек. денатурация при 95 $^{\circ}$, 30-сек отжиг при 55 $^{\circ}$ C и 30-сек элонгация – при 72 $^{\circ}$ C. В завершение – финальная элонгация 4 мин при 72 $^{\circ}$ и охлаждение до 4 $^{\circ}$ C.

ПЦР для определения полиморфизмов IL-1 β проводили по следующей программе: начальная денатурация – 3 мин при 95 $^{\circ}$, затем 25 циклов – 30 сек денатурация при 95 $^{\circ}$, 15-сек отжиг при 65 $^{\circ}$ C и 30-сек. элонгация при 72 $^{\circ}$ C. В завершении – финальная элонгация 7 мин при 72 $^{\circ}$ и охлаждение до 4 $^{\circ}$ C.

Таблица 1 – Название и структура использованных праймеров

Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'–3')
IL I β -31 F	5'- CCCCTTTCCTTTAACTTGATTGTGAAATC-3'
IL I β -31 R	5'- AGGTTTGGTATCTGCCAGTTTCTC-3'
IL I β -511 F	5'- TGGCATTGACTGGTTCATC-3'
IL I β -511 R	5'- GTTAGGAATCTTCCCACTT-3'
Cag A -F	5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGAGGGA -3'
Cag A - R	5'-CTGCAAAAAGATTGTTTGGCAG A- 3'

Для определения однонуклеотидных полиморфизмов – 31 и 511 гена IL-1 β продукты амплификации обрабатывали рестриктазами – для анализа 31 С/Т позиции рестриктазой *AluI* (NEB Inc., США) и для анализа 511 Т/С рестриктазой *AvaI* (Eco 88I) производства компании «Fermentas» (Литва) – согласно рекомендациям компаний производителей.

Электрофоретическая детекция результатов амплификации осуществлялась посредством агарозного гель-электрофореза и окраской бромистым этидием в камере SE-2 (Helicon) с источником питания Эльф-4 (ДНК-технология). В качестве гелевого и электродного буфера применяли 1х ТВЕ раствор pH 8,0 с 0,05% бромистым этидием. Продукты амплификации объемом 7,5 мкл смешивали с 2,5 мкл загрузочного буфера (70-процентный водный раствор глицерина и 0,05% бромфеноловый синий) и вносили в лунки 2% агарозного геля. Электрофорез проводили в течение 30 минут при 200 В. В качестве контроля использовали маркер молекулярного веса (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder) производства компании «Fermentas» (Литва). Конечным результатом являлось установление спецификации выявленного аллельного варианта. Фотодокументирование и цифровая обработка результатов производились с помощью видеосистемы GelDoc XR (BioRad, США), включающей программный пакет Quanti Qne. Обозначение выявленных аллельных вариантов производилось согласно [2, 6].



М- маркёр молекулярного веса, 476, 528, 536 - позитивные образцы, 411, 413, 414, 427, 435, 443, 444, 456, 463, 482, 507, 511, 518 - негативные образцы

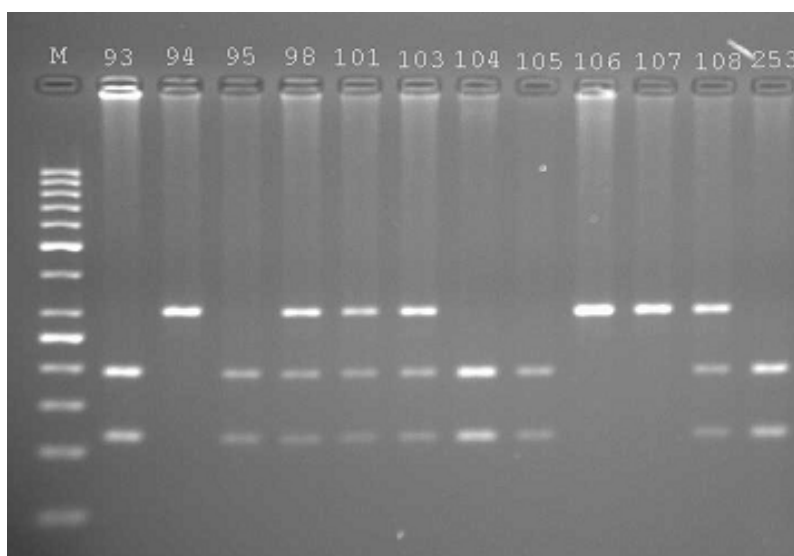
Рисунок 1 – ПЦР- анализ образцов по локусу sagA

Результаты электрофоретической детекции генотипа sagA *H.pylori* и однонуклеотидного полиморфизма-511 гена IL-1 β представлены на рисунках 1 и 2.

На рисунке 2 представлен результат электрофоретического фракционирования продуктов амплификации после обработки рестриктазой *AvaI* для типирования полиморфизма -511 Т/С гена IL-1 β .

Результаты исследования

В ходе проведения анализа образцов по локусу IL-1 β было выявлено по два аллельных варианта в каждой нуклеотидной позиции, обозначенных как IL-1 β ^{31C} и IL-1 β ^{31T}, IL-1 β ^{511C} и IL-1 β ^{511T} соответственно. При этом для всех проанализированных образцов генотипам IL-1 β ^{31C}/IL-1 β ^{31C} всегда соответствовали генотипы IL-1 β ^{511T}/IL-1 β ^{31T}



М – маркёр молекулярного веса; 93, 95, 104, 105, 253 – генотип СС (две легкие фракции); 98, 101, 103, 108 – генотип СТ (три фракции); 94, 106, 107 – генотип ТТ (одна тяжёлая фракция)

Рисунок 2 – ПЦР-ПДРФ анализ IL-1 β (нуклеотидная позиция 511)

Таблица 2 – Полиморфизм IL-1β-31 в зависимости от наличия *H. pylori*

Без гастропатий (Бг)						Гастропатии (Г)					
1 НР+			2 НР-			3 НР+			4 НР-		
38			16			57			34		
СС	ТТ	СТ	СС	ТТ	СТ	СС	ТТ	СТ	СС	ТТ	СТ
2	22	14	5	5	6	4	25	28	6	15	13

и наоборот. Полученные результаты позволили объединить аллельные варианты по разным позициям в единый аллель с обозначением: IL-1β^{31C511T} и IL-1β^{31T511C}. Соответственно 3 варианта генотипов: гомозигота – IL-1β^{31C511T} / IL-1β^{31C511T}, гетерозигота – IL-1β^{31C511T} / IL-1β^{31T511C}, гомозигота – IL-1β^{31T511C} / IL-1β^{31T511C}. Исходя из результатов генотипирования для проведения дальнейшего анализа нами использовался только один локус IL-1β-31.

На следующем этапе работы был проведен анализ связи полиморфизма IL-1β с присутствием *H. pylori*. Принцип подбора исследуемых групп описан выше – в разделе «Материалы и методы исследования». Данные по количеству различных генотипов, выявленных в четырех группах, представлены в таблице 2.

Для оценки степени генетической дифференциации четырех исследуемых групп были рассчитаны коэффициенты дистанции Неи, представленные в таблице 3.

Как видно из Рис. 3, наибольшая разница выявлена между 4 и 3 группой обследуемых; она составляет 12,23%; между 2 и 4 группой наблюдается наименьшая разница. Данные различия обусловлены наи-

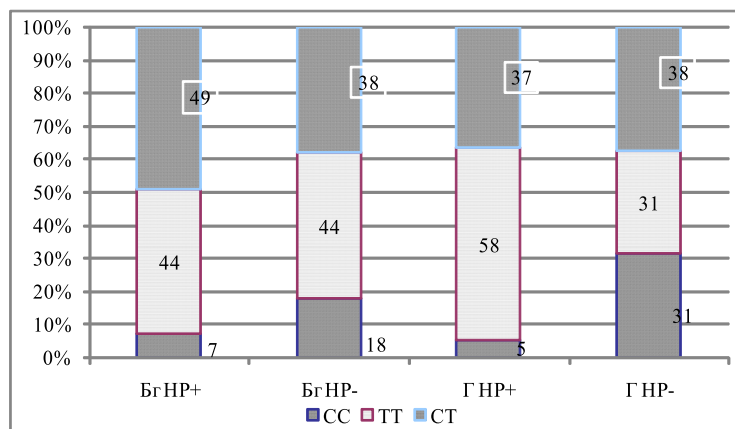


Рисунок 3 - Распределение генотипов IL-1β-31 среди 4 исследуемых групп

Таблица 3 – Значения коэффициентов генетической дистанции Неи между группами

	1	2	3	4
1	****			
2	0.0039	****		
3	0.0094	0.0257	****	
4	0.0616	0.0339	0.1223	****

большей частотой встречаемости аллеля С в группах с отсутствием *H. pylori* по сравнению с группами, у которых выявлена ДНК *H. pylori*. Таким образом, можно предположить, что аллель С в определенной степени коррелирует с «устойчивостью» к заражению *H. pylori*.

Инфицированные *H. pylori* гетерозиготные пациенты (СТ), принимавшие НПВП, были на 15% менее склонны к образованию гастропатии.

Следует отметить, что в группе пациентов с гастропатией, неинфицированных *H. pylori*, количество гомозиготных генотипов значительно превалировало над гетерозиготными. Кроме того, в данной группе идет увеличение генотипа СС, такая же тенденция определенно намечается и в группе пациентов без гастропатий, также не имеющих *H. pylori*; т. е. генотип СС имеет определенное позитивное значение к «устойчивости» против данной бактерии.

На следующем этапе была проанализирована аллельная структура IL-1β-31 при наличии или отсутствии локуса *cagA* *H. pylori* для четырех групп пациентов подобранных по предыдущему принципу. Данные представлены в таблице 4.

Как видно из таблицы 4, особых различий между группами пациентов не наблюдается. Распределение генотипов

Таблица 4 – Полиморфизм IL-1 β -31 в зависимости от наличия генотипа *cagA H.Pylori*

Гастропатии (Г)						Без гастропатий (Бг)					
1 Cag A+			2 Cag A-			3 Cag A+			4 Cag A-		
24			25			37			19		
СС	ТТ	СТ	СС	ТТ	СТ	СС	ТТ	СТ	СС	ТТ	СТ
1	12	11	6	12	7	3	19	15	1	5	13

по данному признаку представлено на рисунке 4.

Из рисунка 4 следует, что образование неонкогенных комплексов *H.pylori*-человек в группе обследуемых, принимавших НПВП и не имеющих гастропатии наблюдается у гетерозиготных (СТ) пациентов. В то же время гомозиготные генотипы IL-1 β -31 определены среди пациентов с НПВП гастропатиями. Образование же онкогенного комплекса *H.Pylori*-человек в группах обследуемых, принимавших НПВП и имеющих и не имеющих гастропатии, наблюдается с одинаковой частотой у гомозиготных и гетерозиготных по IL-1 β -31 пациентов.

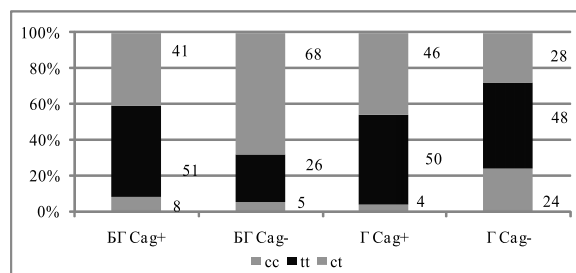


Рисунок 4 – Распределение генотипов IL-1 β -31 среди 4 исследуемых групп в зависимости от выявления генотипа *cagA H.pylori*

Выводы

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

1. Большей склонностью к образованию неонкогенных комплексов в группе пациентов принимавших НПВП и не имеющих гастропатий по 31 локусу гена IL-1 β обладают гетерозиготы, что может считаться прогностически благоприятным признаком.

2. Развитие НПВП- гастропатий чаще отмечается у гомозиготных организмов с генотипом СС по 31 локусу гена IL-1 β , что таким образом может являться прогностически неблагоприятным признаком. Однако, такие корреляции могут быть связаны с

малой выборкой 2 и 4 групп (у которых не выявлена ДНК *H.pylori* и онкогенный *cagA* генотип), или с наличием еще одного дополнительно-го гена, обуславливающего развитие гастропатии [4].

Библиографический список

1. Cost-effectiveness of different strategies for primary prevention of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced peptic ulcer disease / C.W. Ko [et al.] // J Gen Intern Med. – 2000. – Vol. 15. – P. 400-410.

2. Secondary and primary prophylaxis of gastropathy with nonsteroidal antiinflammatory drugs or low-dose aspirin: a review based on four clinical scenarios / S. Limmer [et al.] // Z Gastroenterol. – 2003. – Vol. 41. – P. 719-728.

3. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin / Z. Xiang [et al.] // Infect Immun. – 1995. – Vol. 63. – P. 94-98.

4. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion / S. Odenbreit [et al.] // Science. – 2000. – Vol. 287. – P. 1497-1500.

5. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Мн.: Юнипол, 2007. – 176 с.

6. Effect of Interleukin 1 Polymorphisms on Gastric Mucosal Interleukin 1 Production in *Helicobacter pylori* Infection / Il-R. Hwang [et al.] // Gastroenterology. – 2002. – Vol. 123. – P. 1793-1803.

7. A rare allele combination of the interleukin-1 gene complex is associated with high interleukin-1 beta plasma levels in healthy individuals / J. Hulkkonen [et al.] // Eur. Cytokine Netw. – 2000. – Vol.11. – P. 251-255.

8. IL-1 β and IL1RN Polymorphic Genes and *Helicobacter pylori* cagA Strains Decrease the Risk of Reflux Esophagitis / D. M. M. Queiroz [et al.] // Gastroenterology. – 2004. – Vol. 127. – P. 73-79.