

УДК 616.33:575.113:541.7

**РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА T251A ГЕНА IL-8  
В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДКА***А. В. Воропаева***Республиканский научно-практический центр  
радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель****Цель:** оценить значимость полиморфизма гена IL-8 (T251A) в патогенезе заболеваний желудка.**Материалы и методы.** В исследование включено 250 пациентов с диагнозом «Хронический гастрит» и 72 пациента с диагнозом «Рак желудка». Для определения полиморфизма гена IL-8 (T251A), выявления ДНК *H. pylori* и CagA генотипа использовали метод аллельспецифичной полимеразной цепной реакции (АС-ПЦР).**Результаты.** Наличие у пациента генотипа TA IL-8 (T251A) повышает риск развития рака желудка в 2 раза независимо от статуса инфицированности CagA положительными штаммами *H. pylori* ( $p = 0,006$ ).**Заключение.** Генотип TA IL-8 (T251A) значимо чаще встречался при РЖ:  $\chi^2 = 0,006$ ; ОШ — 2,07; 95 % ДИ 1,22–3,53. Диагностическая чувствительность определения данного генотипа составляет 55,6 %, диагностическая специфичность — 62,4. Наличие достоверных различий в распределении аллелей и генотипов свидетельствует об ассоциации полиморфного маркера с заболеванием, в данном случае наличие у пациента генотипа TA IL-8 (T251A) повышает риск развития рака желудка в 2 раза. При изучении взаимосвязи между полиморфизмом IL-8 (T251A) и атрофией желудка достоверных различий не выявлено ( $\chi^2 = 0,249$ ). Статистически недостоверны и различия между степенью активности гастрита и полиморфизмом IL-8 (T251A) ( $\chi^2 = 0,341$ ). Также не установлена взаимосвязь между полиморфизмом IL-8 (T251A) и инфицированностью CagA+ штаммами *H. pylori* в обеих изучаемых группах —  $\chi^2 = 0,188$  в группе ХГ и  $\chi^2 = 0,181$  в группе РЖ.**Ключевые слова:** *H. pylori*, генотип, аллели, интерлейкин-8, рак желудка, гастрит.**THE ROLE OF IL-8 (T251A) GENE POLYMORPHISM  
IN THE PATHOGENESIS OF GASTRIC DISEASES***A. V. Voropayeva***Republican Research Centre for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel****Objective:** to assess the role of IL-8 (T251A) gene polymorphism in the pathogenesis of gastric diseases.**Materials and methods.** The study included 250 patients diagnosed with chronic gastritis and 72 patients diagnosed with gastric cancer. To define IL-8 (T251A) gene polymorphism, and detect the DNA of *H. pylori* and CagA genotype, we used the method of allele-specific polymerase chain reaction (AS PCR).**Results.** The presence of TA IL-8 genotype (T251A) in a patient increases twice as much the risk for gastric cancer regardless of the status of CagA infection with *H. pylori* positive strains ( $p = 0.006$ ).**Conclusion.** TA IL-8 (T251A) genotype was significantly more prevalent in gastric cancer:  $\chi^2 = 0.006$ ; OR — 2.07; 95 % CI 1.22–3.53. The diagnostic sensitivity of detection of this genotype makes up 55.6 %, the diagnostic specificity — 62.4. The presence of reliable differences in the distribution of alleles and genotypes is indicative of the association of the polymorphic marker with the illness, in this particular case, the presence of TA IL-8 (T251A) genotype in a patient increases twice as much the risk for the development of gastric cancer. While studying the interrelations between IL-8 (T251A) polymorphism and stomach atrophy we revealed no reliable differences ( $\chi^2 = 0.249$ ). The differences between the activity of gastritis and IL-8 (T251A) ( $\chi^2 = 0.341$ ) polymorphism are statistically unreliable. No interrelation between IL-8 (T251A) polymorphism and CagA+ infection with *H. pylori* strains in both the studied groups was found:  $\chi^2 = 0.188$  in the group with chronic gastritis and  $\chi^2 = 0.181$  in the group with gastric cancer.**Key words:** *H. pylori*, genotype, alleles, interleukin-8, gastric cancer, gastritis.**Введение**

*H. pylori* — микроаэрофильная грамотрицательная бактерия, причина развития заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки [1]. Она колонизирует в слое слизи, покрывающем желудочный эпителий, и ее присутствие почти неизменно связано с воспалительной инфильтрацией слизистой оболочки желудка (СОЖ). *H. pylori* колонизирует не только слой защитной слизи, некоторое количество бактерий адгезируется и в клетках эпителия антрального отдела желудка. Адгезия способствует интенсивному размножению и колониза-

ции микроорганизма, то есть создает условия для выработки провоспалительных цитокинов и повреждения слизистой, что, в свою очередь, приводит к развитию язвенной болезни двенадцатиперстной кишки или атрофического гастрита [0]. Интерлейкины (IL) являются ключевыми цитокинами, способными влиять на рост опухолей, а однонуклеотидные полиморфизмы в генах IL (в том числе IL-8) могут существенно влиять на экспрессию белка или изменять его функцию, и способствовать развитию гастрита и рака желудка [3]. Проведены исследования, согласно которым полиморфизм

генов цитокинов, активированных *H. pylori*, может являться генетическим фактором риска развития заболеваний желудка. Е. М. Эль-Омар опубликовал данные о том, что полиморфизмы гена интерлейкин 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) и его антагониста рецептора интерлейкина (IL-1RN) связаны с повышенным риском развития рака желудка и гипохлоргидрией среди белого населения Польши и Шотландии [4]. Он же сообщил, что генотипы фактора некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкина-10 (IL-10) значительно повышают риск развития некардиального рака желудка и наличие нескольких полиморфизмов в провоспалительных цитокинах, таких как IL-1 $\beta$ , IL-1RN, TNF- $\alpha$  и IL-10 связано с повышенным риском развития рака желудка [5]. Интерлейкин-8 (IL-8) играет важную роль в патогенезе инфекции *H. pylori*, является основным медиатором, индуцирующим хемотаксис и активацию нейтрофилов, вырабатывается клетками желудочного эпителия в качестве раннего ответа на инфицирование бактерией. Также считается, что IL-8 привлекает и активирует фагоциты и вызывает повреждение слизистой оболочки реактивными кислородными радикалами [6]. IL-1 и TNF- $\alpha$  также стимулируют выработку IL-8 [7]. Изучая полиморфизм IL-8 (T-251A), инфицирование *H. pylori* и гастродуоденальные заболевания, М. Охуаuchi и соавт. определили, что наличие аллеля А может быть связано с прогрессией *H. pylori* — позитивной атрофии желудка и может привести к увеличению риска развития рака желудка и язвенной болезни в Японии [8]. Аналогичные результаты получены исследователями из Кореи [9].

Факторами риска развития рака желудка являются также атрофия, интестинальная метаплазия и дисплазия, которые развиваются в результате хронического инфицирования *H. pylori*. Развитие данных состояний соответствует воз-

расту пациента на начало инфицирования и наличию CagA — гена-маркера патогенных штаммов бактерии [10, 11]. Изучение участия полиморфных локусов IL-8 в воспалительном процессе позволит получить более глубокое представление о развитии гастрита и рака желудка.

#### Цель

Оценить значимость полиморфизма гена IL-8 (T251A) в патогенезе заболеваний желудка среди белорусского населения.

#### Материалы и методы исследования

В качестве материала для исследования использовались биоптаты СОЖ и цельная кровь 250 пациентов (средний возраст 52 года) (37, 62) с хроническим гастритом (ХГ) и 72 пациентов (средний возраст 67 лет) (58, 74) с раком желудка (РЖ). Все обследуемые пациенты, согласно данным анкетирования, являлись белорусами.

Кровь для проведения исследований забирала из локтевой вены одноразовой иглой в специальную с ЭДТА вакуумную систему типа «Vacuette», проводили обработку и получали плазму и лейкоцитарную массу. Выделение тотальной ДНК проводили сорбционным методом на колонках с использованием протеиназы К.

Количество ДНК определяли фотометрически; препараты ДНК, отвечающие стандартным требованиям, использовали для проведения ПЦР.

Реакционная смесь состояла из 2,5-кратного ПЦР-буфера (ксиленцианол, 7,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, Tag-полимераза) смеси нуклеотидов дНТФ — 10 мМ, смеси праймеров (V3-F, V2-R) — 5 Мм и деионизованной воды. Объем реакционной смеси составлял 50 мкл, количество исходной ДНК с концентрацией 20 нг/мкл ДНК — 2 мкл. Амплификацию проводили в амплификаторе Palm Cycler фирмы «Corbett Research» (Австралия).

Маркеры и параметры проведения ПЦР представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Параметры проведения ПЦР для выявления *H. pylori* и определения полиморфизма гена IL-8 (T251A)

Маркер, полиморфизм	Последовательность праймеров	Режим амплификации
C97-20/Н3А-20 Определяемый фрагмент 765 п.н.	F1: ggctatgacgggtatccggc R1: gccgtgcagcacctgtttc	95 °С — 3 мин 1 цикл 95 °С — 30 с 63 °С — 60 с 35 циклов 72 °С — 60 с 72 °С — 60 с 1 цикл
CagAF1/CagAB1 Определяемый фрагмент 349 п.н.	F1: gataacaggcaagcttttgaggga R1: ctgcaaaagattgtttggcaga	95 °С — 3 мин 1 цикл 95 °С — 30 с 55 °С — 60 с 35 циклов 72 °С — 60 с 72 °С — 60 с 1 цикл
IL-8 (T251A) Определяемые фрагменты А: 114 п.н. Т: 114 п.н.	F1: 5'-aatacggagtgatgacgaaaa-3' R1: 5'-ctagaataaaaaagcatacat-3' R2: 5'-ctacaataaaaaagcatacaa-3'	АС-ПЦР 1 цикл (95 °С — 3 мин); 35 циклов (95 °С — 30 с, 53 °С — 1 мин, 72 °С — 40 с); 1 цикл (72 °С — 5 мин)

Исследование по выявлению суммарных (IgA, IgM, IgG) антител к белку CagA *H. pylori* проводили с использованием иммуноферментной тест-системы «Хелико Бест-антитела», ЗАО «Вектор Бест», Новосибирск.

Распределение частот генотипов и аллелей оценивали в соответствии с равновесием Харди — Вайнберга и с использованием программного пакета «Statistica», 6.0.

### Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования специфическая фракция размером 765 п.н., характеризующая присутствие ДНК *H. pylori* в анализируемой пробе, выявлена в 136 (54,4 %) из 250 исследуемых препаратов ДНК пациентов с ХГ и в 41 (56,9 %) — с РЖ. Статистически значимых различий в инфицированности между группами не выявлено. В группе РЖ выявлена статистически значимая разница выявления образцов, содержащих CagA положительный генотип (45,8 %) по сравнению с группой ХГ (32,4 %), уровень значимости различий  $\chi^2 = 0,036$ .

Суммарные (IgA, IgM, IgG) антитела к белку CagA *H. pylori* выявлены в 40,4 % исследуемых сывороток крови пациентов с ХГ.

Использование данных иммуноферментных тест-систем позволяет проводить полуколичественный анализ уровней антител в виде их титров.

Титр тотальных антител к CagA белку *H. pylori* 1:5 и 1:10, трактуемый производителем

тест-систем как слабоположительный результат, выявлен у 16 (6,4 %) и 40 (16 %) от общего числа обследуемых пациентов, 1:20 — положительный результат у 39 (15,6 %), 1:40 — сильноположительный — у 6 (2,4 %) и сомнительный — у 2 (0,8 %) обследуемых.

При изучении зависимости степени активности гастрита и выявления А-CagA тотальных антител в подгруппах ХГ с высокой и низкой активностью обнаружены статистически значимые различия в частотах выявления А-CagA.

При ХГ с низкой активностью А-CagA обнаруживались в 2,4 раза чаще, чем при ХГ с высокой активностью ( $p < 0,001$ ). Полученный результат соответствует участию CagA белка в каскаде канцерогенеза, когда вслед за активным воспалением наступают атрофические изменения.

При оценке роли полиморфизма гена IL-8 (T251A) в развитии заболеваний желудка распределение генотипов и частоты аллелей соответствовало равновесию Харди — Вайнберга в изучаемых группах ХГ и РЖ. По результатам анализа частот генотипов IL-8 (T251A) в группах пациентов с ХГ и РЖ установлено, что распределение генотипов соответствует равновесию Харди — Вайнберга и уровень значимости различий  $\chi^2 = 0,024$ .

Анализ попарного сравнения частот генотипов представлен в таблице 2.

Таблица 2 — Различия по частотам отдельных вариантов генотипов для полиморфизма IL-8 (T251A)

Цитокины	Группа		Уровень значимости $\chi^2$	ОШ	95 % ДИ
	ХГ	РЖ			
IL-8 (T251A) ТТ	47,2 % (118/250)	33,3 % (24/72)	0,037	0,56	0,32–0,97
IL-8 (T251A) ТА	37,6 % (94/250)	55,6 % (40/72)	0,006	2,07	1,22–3,53
IL-8 (T251A) АА	15,2 % (38/250)	11,1 % (8/72)	0,382	0,7	0,31–1,57
IL-8 (T251A) ТА + АА	52,8 % (132/250)	66,7 % (48/72)	0,037	1,79	1,03–3,10

Как следует из данных таблицы 2, генотип ТА IL-8 (T251A) значимо чаще встречался при РЖ  $\chi^2 = 0,006$ ; ОШ — 2,07; 95 % ДИ 1,22–3,53.

Диагностическая чувствительность определения данного генотипа составляет 55,6 %, диагностическая специфичность — 62,4. Наличие достоверных различий в распределении аллелей и генотипов свидетельствует об ассоциации полиморфного маркера с заболеванием, в данном случае наличие у пациента генотипа ТА IL-8 (T251A) повышает риск развития рака желудка в 2 раза. При изучении взаимосвязи между полиморфизмом IL-8 (T251A) и атрофией желудка достоверных различий не выявлено ( $\chi^2 = 0,249$ ). Статистически недостоверны и различия между степенью активности гастрита и полиморфизмом IL-8 (T251A) ( $\chi^2 = 0,341$ ). Также не установлена взаимосвязь между полиморфизмом IL-8 (T251A) и инфицированно-

стью CagA+ штаммами *H. pylori* в обеих изучаемых группах:  $\chi^2 = 0,188$  в группе ХГ и  $\chi^2 = 0,181$  в группе РЖ. Последнее обстоятельство требует дополнительного изучения в связи с тем, что проводилось в сравнительно небольшой выборке пациентов.

### Выводы

Анализ полиморфизма гена IL-8 (T251A) выявил взаимосвязь генотипа ТА IL-8 (T251A) с риском развития рака желудка, но не показал зависимости от статуса инфицированности CagA положительными штаммами *H. pylori*. Необходимо дальнейшее изучение данного полиморфизма для оценки его роли в развитии заболеваний желудка среди белорусского населения и ответа на вопрос, какие генотипы являются защитными факторами при инфицировании *H. pylori* и какие служат фактором риска развития гастрита и рака желудка.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection / J. G. Kusters [et al.] // Clin Microbiol Rev. — 2006. — Vol. 19, № 3. — P. 449–490.
2. Cytokines, cytokine gene polymorphisms and Helicobacter pylori infection: Friend or foe? / C. Figueiredo [et al.] // World J Gastroenterol. — 2014. — Vol. 20, Is. 18. — P. 5235–5243.
3. Genotyping of IL-8-251 T > A yields prognostic information in patients with gastric carcinoma / C. Xiuyu [et al.] // Biomarkers. — 2013. — Vol. 18, Is. 7. — P. 559–564.
4. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer / E. M. El-Omar [et al.] // Nature. — 2000. — Vol. 404. — P. 398–402.
5. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms / E. M. El-Omar [et al.] // Gastroenterology. — 2003. — Vol. 124. — P. 1193–1201.
6. Association of antral mucosal levels of interleukin 8 and reactive oxygen radicals in patients infected with Helicobacter pylori / Q. B. Zhang [et al.] // Clin Sci. — 1997. — Vol. 92. — P. 69–73.
7. Genetic factors involved in the development of Helicobacter pylori-related gastric cancer / N. Hamajima [et al.] // Cancer Sci. — 2006. — Vol. 97. — P. 1129–1138.
8. The polymorphism interleukin-8-251 A/T influences the susceptibility of Helicobacter pylori related gastric diseases in the Japanese population / M. Ohyauchi [et al.] // Gut. — 2005. — Vol. 54, № 3. — P. 330–335.
9. The interleukin-8-251 A allele is associated with increased risk of noncardia gastric adenocarcinoma in Helicobacter pylori-infected Koreans / B. D Ye [et al.] // J. Clin. Gastroenterol. — 2009. — Vol. 43, № 3. — P. 233–239.
10. Genetic factors involved in the development of Helicobacter pylori-related gastric cancer / N. Hamajima [et al.] // Cancer Sci. — 2006. — Vol. 97. — P. 1129–1138.
11. Helicobacter pylori seropositivity and cytokine gene polymorphisms / Y. Saijo [et al.] // World J. Gastroenterol. — 2007. — Vol. 13. — P. 4445–4451.

Поступила 09.11.2015

УДК 575.21/.22(476)

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПО ПОЛИМОРФИЗМУ N-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ У ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ ЮГО-ВОСТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЕВРОПЕОИДОВ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

*Т. В. Сатырова, Е. И. Михайлова, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев, О. В. Осипкина*

Гомельский государственный медицинский университет

**Цель:** сравнительный анализ результатов фенотипирования и генотипирования по полиморфизму N-ацетилюрования у здоровых добровольцев Юго-Восточного региона Республики Беларусь.

**Материалы и методы.** У 30 здоровых добровольцев Юго-Восточного региона Республики Беларусь с помощью метода ПЦР-ПДРФ (PCR-RFLP) проведено определение генотипа NAT2 по 5 однонуклеотидным заменам (T341C, G590A, G857A, C282T, C481T).

**Результаты.** Доказано, что мутантные аллели имели место при любой активности N-ацетилтрансферазы ( $p = 0,08$ ). Количество мутантных аллелей гена NAT2 показало обратную умеренную ассоциацию со скоростью ацетилюрования ( $\tau = -0,633$ ,  $p < 0,0001$ ). Вероятность медленного фенотипа ацетилюрования возрастала по мере увеличения количества SNP ( $\tau = -0,657$ ,  $p < 0,0001$ ), а присутствие 4 однонуклеотидных замен указывало с высокой степенью достоверности на медленный фенотип ацетилюрования ( $p = 0,0007$ ).

**Вывод.** Одновременная оценка нескольких SNP в гене NAT2 повышает точность прогноза фенотипа ацетилюрования, но даже одновременная оценка 5 SNP не позволяет однозначно предсказать фенотип ацетилятора.

**Ключевые слова:** NAT2, генотип, полиморфизм, здоровые добровольцы.

## THE COMPARATIVE ANALYSIS OF PHENOTYPING AND GENOTYPING OF N-ACETYLATION POLYMORPHISM IN HEALTHY VOLUNTEERS FROM THE SOUTH-EAST CAUCASIAN POPULATION OF BELARUS

*T. V. Satyrova, E. I. Mikhailova, O. Yu. Baranov, E. V. Voropayev, O. V. Osipkina*

Gomel State Medical University

**Objective:** comparative analysis of phenotyping and genotyping of N-acetylation polymorphism in healthy volunteers from the south-east region of the Republic of Belarus.

**Material and methods.** We identified the genotype NAT2 in 30 healthy volunteers from the south-east region of the Republic of Belarus using the method PCR-RFLP by 5 mononucleotide changes (T341C, G590A, G857A, C282T, C481T).

**Results.** It was proved that mutant alleles occurred in any N-acetyltransferase activity ( $p = 0.08$ ). The number of mutant alleles of NAT2 gene showed a direct moderate association with the speed of acetylation ( $\tau = -0.633$ ,  $p < 0.0001$ ). Probabilities for slow acetylation phenotype increases with the growing number of SNP ( $\tau = -0.657$ ,  $p < 0.0001$ ), and the presence of 4 single nucleotide substitutions indicates a high degree of confidence for the slow acetylation phenotype ( $p = 0.0007$ ).

**Conclusion.** The simultaneous assessment of several SNPs in NAT2 gene increases the accuracy of prognosis for NAT2 acetylation phenotype, but even the simultaneous assessment of 5 SNPs does not make it possible to predict the phenotype of acetylator definitely.

**Key words:** NAT2, genotype, polymorphism, healthy volunteers.