DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-182-10-25-32

Генетический полиморфизм провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-6 у пациентов с серологически выявленным атрофическим гастритом

Белковец А. В.[1, 2], Курилович С. А.[1, 2], Максимов В. Н.[1, 2], Щербакова Л. В.[1]

[1] НИИТПМ — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», 630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1.

[2] ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Новосибирск, Российская Федерация, 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52

Genetic polymorphism of the inflammatory cytokines IL-1β and IL-6 in patients with serologically identified atrophic gastritis

A. V. Belkovets[1, 2], S. A. Kurilovich[1, 2], V. N. Maksimov[1, 2], L. V. Scherbakova[1]

[1] IIPM — Branch of the Federal State Budget Scientific Institution "The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", 630089, Novosibirsk, B. Bogatkova str., 175/1

[2] Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Novosibirsk State Medical University" Ministry of Health of the Russian Federation, 630091, Novosibirsk, Krasnyj prospect, 52

Для цитирования: Белковец А. В., Курилович С. А., Максимов В. Н., Щербакова Л. В. Генетический полиморфизм провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-6 у пациентов с серологически выявленным атрофическим гастритом. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2020;182(10): 25–32. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-182-10-25-32

For citation: Belkovets A. V., Kurilovich S. A., Maksimov V. N., Scherbakova L. V. Genetic polymorphism of the inflammatory cytokines IL-1β and IL-6 in patients with serologically identified atrophic gastritis. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2020;182(10): 25–32. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-182-10-25-32

Белковец Анна Владимировна, д.м.н., заведующая клиникой, старший научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии

Курилович Светлана Арсентьевна, д.м.н., профессор, заведующая лабораторией гастроэнтерологии

Максимов Владимир Николаевич, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний

Щербакова Лилия Валерьевна, старший научный сотрудник лаборатории клинико-популяционных и профилактических исследований терапевтических и эндокринных заболеваний

Anna V. Belkovets, doctor of medical sciences, head of the clinic, senior researcher of laboratory of gastroenterology

Svetlana A. Kurilovich, doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of gastroenterology

Vladimir N. Maksimov, doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of molecular genetic studies of therapeutic diseases

Liliya V. Scherbakova, senior researcher of laboratory of clinical-populational and prophylactic studies of Internal and Endocrine Diseases

✉ *Corresponding author:*
Белковец Анна Владимировна
Anna V. Belkovets
belkovets@gmx.de

Резюме

Актуальность: некоторыми исследователями продемонстрирована связь генетического полиморфизма некоторых провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6) с риском развития предраковых заболеваний желудка и рака желудка (РЖ).

Целью исследования было изучить частоты генотипов и аллелей полиморфизмов –511C/T (rs16944) гена IL1B и 174G/C (rs1800795) гена IL6 у пациентов с серологически выявленным атрофическим гастритом (АГ) — основным предраковым заболеванием желудка.

Материалы и методы: в исследование вошли 55 человек (45 женщин и 10 мужчин) со средним возрастом 58,2 ± 11,5 лет с признаками явной или возможной атрофии разных отделов слизистой оболочки желудка, выявленной иммуноферментным анализом (ИФА) с определением уровней пепсиногена I, II (ПГI, ПГII), их соотношения, гастрина-17 и IgG антител к H.pylori с помощью набора диагностикумов «ГастроПанель» (Biohit Plc, Helsinski, Finland). ДНК выделяли из венозной крови с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. Образцы ДНК прогенотипированы по опубликованным методикам.

Результаты: у пациентов с выраженным АГ (уровень ПГI менее 30 мг/л) объединённый вариант с редким аллелем T (T/T + C/T) был выявлен достоверно чаще (68,8%), чем распространённый гомозиготный вариант C/C (31,3%, p=0,004). У лиц с низким соотношением ПГI/ПГII (менее 3), что также является свидетельством фундальной атрофии,

гомозиготный вариант T/T встречался чаще (29,6%), чем генотип C/C (7,4%, p=0,04). Средние показатели ПГI оказались достоверно ниже при C/C генотипе гена IL6 в сравнении с гетерозиготным вариантом C/G (p=0,03), однако у пациентов с морфологически подтверждённой атрофией объединённый вариант с редким аллелем G (G/G+C/G) гена IL6 встречался чаще, чем гомозиготный вариант C/C (71,4% против 28,6%, p=001).

Выводы: у пациентов с признаками фундальной атрофии (низкий показатель ПГI, соотношения ПГI/ПГII) гомозиготный вариант с редким аллелем T, с которым связывают повышенную продукцию IL-1β и развитие гипоацидного состояния, встречался в 4 раза чаще, чем гомозиготный вариант C/C (p=0,04). Полученные результаты позволяют предполагать возможную связь полиморфизма IL1B (носительство редкого T аллеля) с формированием ракового фенотипа гастрита. Вклад полиморфизма IL6 требует дальнейшего уточнения.

Ключевые слова: атрофический гастрит, полиморфизм, rs1800795, rs16944, IL-6, IL-1B, пепсиногены, H.pylori

Summary

Background: some researchers have demonstrated a link between the genetic polymorphism of certain pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6) and the risk of developing precancerous diseases of the stomach and gastric cancer (GC).

Aim: to study the genotypes and alleles frequency of polymorphisms of –511C/T (rs16944) of the IL1B gene and 174G/C (rs1800795) of the IL6 gene in patients with serologically detected atrophic gastritis (AG) — the main precancerous lesions of the stomach.

Materials and methods. the study included 55 people (45 females and10 males) with an average age of 58.2 ± 11.5 years with signs of obvious or possible atrophy of different parts of the gastric mucosa revealed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with determination of pepsinogen levels I (PGI), PGII, the PGI / PGII ratio, gastrin-17 and IgG antibodies to H. pylori using the "GastroPanel" diagnostic kit (Biohit Plc, Helsinski, Finland). DNA was isolated from venous blood using the phenol-chloroform extraction method. DNA samples were genotyped according to published methods.

Results: in patients with severe AG (PGI level less than 30 μg/l), the combined variant with the rare T allele (T/T + C/T) was detected significantly more often (68.8%) than the common homozygous C/C variant (31, 3%, p = 0.004). In individuals with a low PGI/PGII ratio (less than 3), which is also evidence of fundamental atrophy, the homozygous T/T variant was more common (29.6%) than the C/C genotype (7.4%, p = 0.04) The average PGI values were significantly lower with the C/C genotype of the IL-6 gene compared with the heterozygous C/G variant (p = 0.03), however, in patients with morphologically confirmed atrophy, the combined variant with the rare G allele (G/G + C/G) of the IL6 gene was more common than the homozygous C/C variant (71.4% versus 28.6%, p = 001).

Conclusions: in patients with signs of corpus atrophy (low PGI, PGI PGII ratios), the homozygous variant with a rare T allele, which is associated with increased IL-1β production and the development of a hypoacid state, was 4 times more likely than the homozygous C/C variant (p = 0.04). The results obtained suggest a possible association of IL1B polymorphism (carriage of a rare T allele) with the formation of a cancer phenotype of gastritis. The contribution of IL6 polymorphism requires further refinement.

Keywords: atrophic gastritis, polymorphism, rs1800795, rs16944, IL-6, IL-1B, pepsinogenes, *H. pylori*

Введение

Рак желудка (РЖ) остается одной из самых частых злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта с преобладанием поздней диагностики и плохого прогноза [1]. Интестинальный и наиболее частый тип РЖ является следствием гистопатологического каскада, инициализируемого давней инфекцией *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) и связанным с ней гастритом с развитием атрофии, кишечной метаплазии и дисплазии [2]. Неотъемлемой частью длительного процесса канцерогенеза в желудке является воспаление с локальной продукцией таких воспалительных цитокинов, как интерлейкин-1β (IL-1β) и интерлейкин-6 (IL-6), вовлеченных в клеточную иммунную реакцию в слизистой оболочке в ответ на *H. pylori* инфекцию [3, 4]. Длительно персистирующая *H. pylori* инфекция, являющаяся одним из пусковых механизмов хронического воспаления, приводит к ингибированию секреции соляной кислоты через провоспалительные цитокины и, в конечном итоге, влияет на прогрессирование поражения слизистой оболочки желудка [5, 6].

Многочисленные исследования позволили выявить процессы, с помощью которых хроническое воспаление предрасполагает к развитию разных видов рака [7, 8]. При этом, отмечен приблизительно 25% вклад воспаления в развитие неоплазий [9]. Хроническое воспаление связано с продукцией и высвобождением различных медиаторов, в том числе провоспалительных и онкогенных, являющихся активными азотно-кислородными разновидностями, воспалительными цитокинами (т.е.

интерлейкины (IL), фактор некроза опухоли-альфа (TNF-α), интерферон (IFN) и др.), факторами роста и хемокинами [8].

H. pylori также стимулирует выработку разных IL (IL-1, IL-2, IL-10, IL-12), IFN и TNF при иммунном ответе слизистой оболочки желудка [10]. В частности, IL-4 и IL-6 участвуют в воспалительных процессах и считаются ответственными за активацию воспалительного каскада. Противо- и провоспалительные цитокины участвуют в различных клеточных событиях, таких как индукция экспрессии других цитокинов, пролиферация и дифференцировка клеток, адгезия, ангиогенез, некроз и апоптоз, причем на все эти процессы влияет присутствие инфекции *H. pylori* [10, 11]. Более того, вызванное инфекцией *H. pylori* воспаление, приводит к увеличению смены (обновления) эпителиальных клеток слизистой оболочки желудка и ослаблению регуляторных механизмов, особенно когда воспаление связано с вирулентными штаммами *H. pylori* [10].

Хронический атрофический гастрит (АГ) является основным предраковым заболеванием желудка [2], в диагностике которого достаточно давно используются неинвазивные методы с определением уровней пепсиногенов I и II (ПГI, ПГII), их соотношения (ПГI/ПГII) и IgG антител к *H. pylori*. Эксперты Киотского консенсуса 2015 г. также признали необходимым их использование для определения индивидуального повышенного риска развития РЖ [12, 13].

В ряде исследований показана связь генетического полиморфизма некоторых воспалительных цитокинов с риском развития специфических, ассоциированных с *H. pylori* инфекцией заболеваний, включая РЖ [4]. Однако роль цитокинов и их генетических вариантов в отношении предраковых заболеваний желудка остаётся недостаточно изученной [14]. Связь с развитием предраковых изменений слизистой оболочки желудка выявлена для очень небольшого спектра полиморфизмов однонуклеотидных замен (Single Nucleotide Polymorphism, SNP): IL-10T-819C, IL-8–251, IL-18RAP917997, IL-22 rs1179251, IL1-B-511, IL1-B-3954, IL4R-398 и IL1RN [14].

IL-1β является провоспалительным цитокином с мощным ингибирующим влиянием на кислотообразование в желудке, реализующееся как через непосредственное воздействие на рецепторы к IL-1β, расположенные на мембране париетальных клеток, так и через стимуляцию синтеза сильного ингибитора соляной кислоты – простагландина E2 [15, 16]. Инфекция, ассоциированная с *H. pylori* инфекцией, вызывает повышенную выработку IL-1β, как в экспериментальных моделях, так и in vivo [17]. Повышенная продукция цитокина приводит к усилению ингибирования кислотной продукции с расширением колонизации *H. pylori* в другие отделы желудка с последующим прогрессированием воспаления и развитием атрофических изменений слизистой [18].

Полиморфизм с однонуклеотидной заменой для гена IL1B (–511C>T) является одним из наиболее изученных. В 2000 г. ассоциация между полиморфизмами IL1B-511C>T и риском развития РЖ была изучена El-Omar и соавторами [19], которые сообщили, что полиморфизмы гена IL1B связан с высоким риском развития гипохлоргидрии, вызванной *H. pylori* и РЖ. Для полиморфизма гена IL1B-511 (TT против CC) метаанализ 13 исследований не выявил связи с предраковыми поражениями желудка (ОШ = 1,34, 95% ДИ: 0,87–2,07, I2 = 65,7%), хотя Перуанское исследование Gehmert и соавторов [20] выявило повышенный риск развития атрофического гастрита (OR = 5,60, 95% ДИ:> 2,02–15,51,6), связанного с носительством C аллеля.

IL-6 является многофункциональным цитокином, который функционирует как эндокринный регулятор и как медиатор воспаления. Более того, IL-6 играет существенную роль в механизмах защиты хозяина, регулируя равновесие между врожденной и приобретённой иммунными системами [21]. При *H. pylori* ассоциированном гастрите было выявлено повышение уровня IL-6 в слизистой оболочке желудка, участвующего в процессе миграции и пролиферации Т-лимфоцитов в очаге воспаления [22].

В некоторых исследованиях отмечалось, что носительство аллеля IL6–174G связано с более высокой продукцией IL-6 [23] по сравнению с таковой, обнаруженной у людей с генотипом CC. Другими авторами выявлены более высокие уровни IL-6 в слизистой оболочке желудка у *H. pylori* – положительных пациентов по сравнению с *H. pylori*-отрицательными случаями [24]. Sampaio с соавторами опубликованы данные о связи носительства аллели IL6–174C (OR = 2,7, 95% ДИ: 1,5–4,8, P = 0,0006) и, особенно гомозиготного варианта IL-6–174CC (OR = 3,8, 95% ДИ: 1,7–8,7, P = 0,002), с более высокой распространенностью РЖ диффузного типа, в то время как в серии португальских случаев РЖ кишечного типа значимым оказался генотип IL-6–174CG (95% ДИ: 2,7–20,3, OR = 7,3) [25]. В одном опубликованном метаанализе было показано, что генетические полиморфизмы промотора IL6 не связаны с повышенным риском РЖ, несмотря на их роль в восприимчивости или прогнозе при других видах рака (например, молочной железы, легких и т.д.) [26].

Цель настоящего исследования – изучить частоты генотипов и аллелей полиморфизмов 511C/T (rs16944) гена IL1B и 174G/C (rs1800795) гена IL6 у пациентов с серологически выявленным атрофическим гастритом в исследовании «серия случаев».

Материалы и методы исследования

В исследование вошли 55 человек, прошедших неинвазивную диагностику фенотипа гастрита с помощью тест-системы по направлению врача или самостоятельно, с признаками явной или возможной атрофии разных отделов слизистой оболочки желудка. Средний возраст пациентов составил 58,2 ± 11,5 лет. Из них 10 мужчин в возрасте от 39 до 74 лет (средний возраст 56,0 ±11,2) и 45 женщин в возрасте

от 27 лет до 76 лет (средний возраст 58,7±11,6 лет). Были собраны образцы венозной крови. После центрифугирования сыворотку и сгусток замораживали и хранили при температуре –20 °С.

Образцы сыворотки тестировали с помощью набора диагностикумов для иммуноферментного анализа. Фундальную атрофию определяли как выраженную, если уровень ПГI был ниже 30 мкг/л. Умеренную фундальную атрофию определяли как умеренную при показателях ПГI в пределах 31–50 мкг/л. Учитывали также соотношение ПГI/ПГII (критерий атрофии – < 3). Выраженную антральную атрофию предполагали при уровне гастрина-17 ниже 1 пмоль/л. Тест на наличие IgG антител к *H. pylori* считали положительным при уровне > 42 EIU.

Выделение ДНК из венозной крови проводили методом фенол-хлороформной экстракции [27].

Полиморфизм промоторного региона гена IL1B исследовали в позиции –511T/C (rs16944) по методике (ПЦР с ПДРФ), описанной Zhang и соавторами [28].

Генотипирование полиморфизма –174G/C (rs1800795) гена IL6 выполняли по следующей методике: 5-AGCCTGTTAATCTGGTCACTGAAAA-3 – прямой праймер, 5-TGTGCAATGTGACGTCCTTTAGAAT-3 – обратный праймер. Условия ПЦР: 95 °С1 минута; 30 циклов при 95 °С30 сек, 57 °С30 сек, 72 °С30 сек. К ПЦР продуктам добавлялась эндонуклеаза рестрикции HinfI (Россия), с последующей инкубацией при 37 °С в течение ночи. Результат оценивали после электрофореза в 4% полиакриламидном геле и окраски 0,1% бромистым этидием.

Статистическая обработка проведена с применением программы SPSS (версия 11.0). Описательный анализ числовых характеристик при нормальном распределении признаков включал средние значения (M), стандартное отклонение (σ). Достоверность различий для средних величин оценивали по критериям Фишера (F) и Стьюдента (t). Критерием статистической достоверности был уровень p < 0,05.Статистическая обработка результатов включала расчет частот генотипов, аллелей и тестирование их распределения на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с использованием критерия хи-квадрат.

Программа исследования рассмотрена и одобрена комитетом по этике НИИ терапии СО РАМН (протокол № 41 от 30.10.2012 г.), каждый пациент подписал бланк информированного согласия.

Результаты

Средние показатели биомаркёров у пациентов, которым было проведено генотипирование, не отличались у мужчин и женщин (табл. 1).

Из 55 человек у большинства – 60,0% (33 человека: 29 женщин и 4 мужчины) уровень ПГI был менее 30 мкг/л (т.е была выраженная фундальная атрофия). В 40,0% (22 человека: 16 женщин и 6 мужчин) уровень ПГI был в пределах 31–50 мкг/л (p=0,04) и мы предполагали наличие минимальной или умеренной фундальной атрофии. Низкое соотношение ПГI/ПГII (менее 3) отмечено в 50,9% случаев (28 человек, в т.ч.24 женщины и 4 мужчины), т.е реже, чем низкий ПГI. Признаки антральной атрофии (гастрин-17 менее 1 пмоль/л) были выявлены у 4-х человек (3 женщины и 1 мужчина) из 55 (7,3%) на фоне нормальных показателей ПГI. Низкие уровни ПГI и гастрина-17 – свидетельство мультифокальной атрофии обнаружены у 1 женщины.

Антитела IgG к *H. pylori* были выявлены в 54,8% случаев. CagA позитивный цитотоксический штамм *H. pylori* диагностирован в 48,7% случаев без половых различий. У 51,1% до проведения серологического обследования не проводилась эрадикационная терапия против *H. pylori* инфекции, а 48,9% пациентов ранее лечились, причем 20% неоднократно. У 35,1% серологически *H. pylori* негативных пациентов в прошлом проводилась эрадикационная терапия. Средние показатели биомаркёров не отличались в зависимости от наличия *H. pylori* инфекции и CagA – позитивности, за исключением ПГII, средний уровень которого был достоверно выше при выявлении антител к *H. pylori*.

Корреляционный анализ по Спирману выявил следующие связи: ПГI с гастрином-17 (r= –0,683, p<0,001), ПГI с возрастом (r= –0,248*, p=0,017), ПГII с антителами к *H. pylori* (r=0,411**, p<0,001), гастрина-17 с возрастом (r=0,327**, p=0,002).

По результатам биомаркеров аутоиммунный фенотип гастрита (сочетание низкого ПГI и высокого гастрина-17) выявлен в 36% случаев.

Гомозиготный вариант C/C гена IL1B отмечен менее, чем в половине случаев (40,7%). Редкий вариант T/T генотипа выявлен только в 9,3% случаев, но гетерозиготный вариант C/T отмечен в 50,0% случаев. Частота T аллеля составила 34,3%.

В таблице 2 представлено распределение генотипов IL1B в зависимости от выраженности фундальной атрофии, установленной серологически.

У пациентов как с уровнем ПГI менее 30 мкг/л, так и с уровнем более 30 мкг/л генотип T/T встречался реже, чем другие генотипы гена IL1B (табл. 2). Однако у пациентов с признаками выраженного АГ (ПГI менее 30 мкг/л) объединённый вариант с редким аллелем T (T/T + C/T) оказался достоверно более частым (68,8%), чем гомозиготный вариант C/C (31,3%, p=0,004). Более того, у лиц с низким соотношением ПГI/ПГII, что является также важным свидетельством фундальной атрофии, гомозиготный вариант T/T встречался чаще (29,6%), чем более распространённый генотип C/C (7,4%, p=0,04) (рис 1).

Гомозиготный вариант генотипа C/C гена IL6 выявлен в 21,8% случаев, гетерозиготный вариант C/G в 43,6% и гомозиготный вариант G/G в 20,7% случаев. Не выявлено разницы между средними показателями биомаркёров при разных вариантах генотипа IL6 за исключением среднего показателя ПГI. Так, при варианте генотипа C/C уровень ПГI составил 19,6±16,3 мкг/л в сравнении с 46,9±35,8 мкг/л при генотипе C/G (p=0,04) (табл. 3).

У лиц с признаками выраженной фундальной атрофией не выявлено различий по частотам гено-

Биомаркёры	Мужчины	Женщины	Оба пола	$p_{м/ж}$
ПГI мкг/л (M±δ) Me (25%; 75%)	43,5±35,9 41,4 (8,8; 66,3)	31,3±28,8 22,8 (9,2; 42,3)	33,5±30,3 23,2 (9,5; 46,0)	0,4
ПГII мкг/л (M±δ) Me (25%; 75%)	7,0±6,9 5,2 (4,2; 5,9)	8,2±4,9 6,3 (4,5; 11,2)	8,0±5,3 6,0 (4,3;10,1)	0,1
ПГI/II (M±δ) Me (25%; 75%)	8,7±7,2 10,5 (1,3; 14,7)	5,2±5,1 2,8 (0,9; 9,0)	5,8±5,6 3,0 (0,9; 10,8)	0,2
Гастрин-17 моль/л (M±δ) Me (25%; 75%)	16,4±25,8 1,9 (1,5; 33,9)	29,3±39,1 7,8 (1,5; 49,8)	26,9±37,1 3,8 (1,5; 49,3)	0,6

Таблица 1.
Средние показатели биомаркёров у пациентов, у которых проведено генотипирование

Примечания:
ПГI – пепсиноген I, ПГII – пепсиноген II, I/II – соотношение пепсиногенов I/II

Показатели биомаркеров атрофии	Генотипы IL1B					
	C/C (1) n (%)	C/T (2) n (%)	T/T (3) n (%)	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}
ПГI <30 мкг/л	10 (31,3)	19 (59,4)	3 (9,3)	0,03	**0,03**	**0,001**
ПГI> 30 мкг/л	12 (54,5)	8 (36,4)	2 (9,1)	0,2	**0,002**	**0,04**
ПГI/ПГII <3	2 (7,4)	17 (63,0)	8 (29,6)	0,001	**0,04**	**0,02**
ПГI/ПГII> 3	3 (11,1)	10 (37,0)	14 (51,9)	0,03	**0,002**	0,3

Таблица 2.
Частота генотипов IL1B при разных уровнях ПГI и соотношения ПГI/ПГII

Примечания:
ПГI – пепсиноген I, ПГII – пепсиноген II, ПГI/ПГII – соотношение пепсиногенов I/II

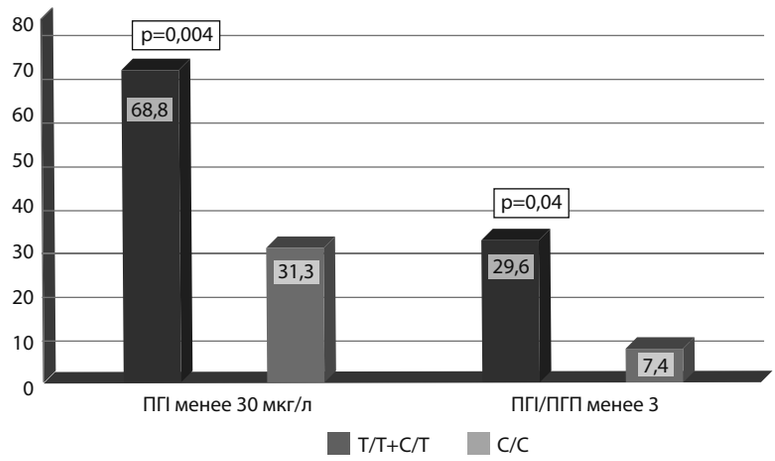


Рисунок 1.
Частота генотипов IL1B (T/T+C/T и C/C) при уровне ПГI менее 30 мкг/л и соотношения ПГI/ПГII менее 3.

Биомаркеры	Генотипы IL6					
	C/C (1)	C/G (2)	G/G (3)	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}
ПГI мкг/л (M±δ) Me (25%; 75%)	19,6±16,3 16,0 (7,6;25,8)	46,9±35,8 40,0 (11,0;73,8)	25,3±22,5 22,4 (6,4;36,7)	**0,04**	0,6	0,1
ПГII мкг/л (M±δ) Me (25%; 75%)	5,5±3,0 4,7 (3,7;7,7)	8,5±4,4 7,3 (5,1;11,2)	8,9±7,0 5,7 (4,2;11,9)	**0,04**	0,2	0,5
ПГI/II (M±δ) Me (25%; 75%)	5,2±5,4 3,0 (0,8;11,1)	7,5±6,6 6,9 (0,9%13,6)	4,0±3,9 1,4 (0,8;7,8)	0,4	0,6	0,1
Гастрин-17 пмоль/л (M±δ) Me (25%; 75%)	34,9±47,0 9,3 (1,1;55,4)	21,9±27,5 1,9 (1,4;48,5)	29,9±44,9 7,8 (1,6;50,2)	0,8	0,7	0,4

Таблица 3.
Средние показатели биомаркеров в зависимости от разных генотипов IL6

Примечания:
ПГI – пепсиноген I, ПГII – пепсиноген II, ПГI/ПГII – соотношение пепсиногенов I/II

типов. В то же время, у пациентов с предполагаемой умеренной фундальной атрофией (ПГI 31–50 мкг/л) гетерозиготный вариант генотипа C/G встречался заметно чаще – 63,6%, чем гомозиготные генотипы C/C (9,1%, p=0,001) и G/G (27,3%, p=0,02) (табл. 4). При соотношении ПГI/ПГII более 3, гетерозиготный вариант C/G также встречался чаще (48,1%), чем гомозиготный вариант C/C (22,2%, p=0,05) (табл. 4).

У пациентов с морфологически подтверждённой атрофией не выявлено различий по частоте генотипов IL6, однако при объединении генотипов с редким аллелем G (C/G+G/G) обнаружена разница с гомозиготным вариантом C/C (рис. 2). Так, объединённый вариант с редким аллелем G (G/G+C/G) встречался чаще, чем гомозиготный вариант C/C (71,4% против 28,6%, p=001) (рис. 2).

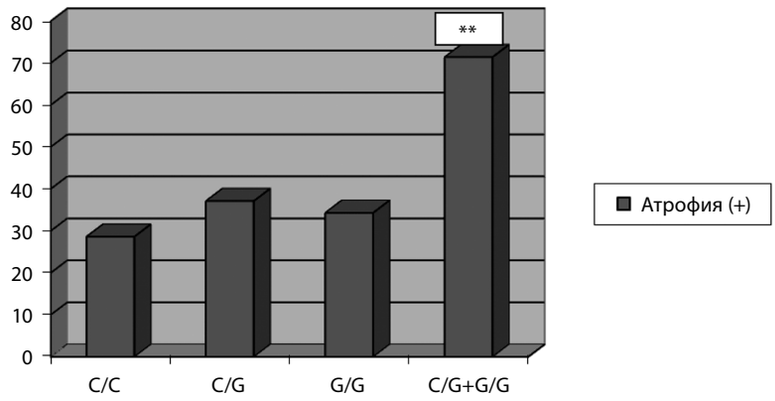
Таблица 4.
Частота генотипов IL6 при разных уровнях ПГI и соотношения ПГI/ПГII

Примечания:
ПГI – пепсиноген I, ПГII – пепсиноген II, ПГI/ПГII – соотношение пепсиногенов I/II

Показатели биомаркеров атрофии	Генотипы IL6					
	C/C (1) n (%)	C/G (2) n (%)	G/G (3) n (%)	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}
ПГI <30 мкг/л	10 (30,3)	10 (30,3)	13 (39,4)	1,0	0,4	0,4
ПГI> 30 мкг/л	2 (9,1)	14 (63,6)	6 (27,3)	**0,001**	0,1	**0,02**
ПГI/ПГII <3	6 (21,4)	11 (39,3)	11 (39,3)	0,2	0,2	1,0
ПГI/ПГII> 3	6 (22,2)	13 (48,1)	8 (29,6)	**0,05**	0,5	0,2

Рисунок 2.
Частота генотипов IL6 у пациентов с морфологически подтверждённой атрофией

Примечания:
**- p<0,001 (между C/C и C/G+G/G); C/C, C/G, GG – генотипы ИЛ6



Обсуждение

Из всего спектра изученных на предмет риска развития РЖ полиморфизмов воспалительных цитокинов, только для IL10T-819C, IL-8–251, IL-18RAP917997, IL-22 rs1179251, IL1-B-511, IL1-B-3954, IL4R-398 и IL1RN были выявлены связи с возникновением предраковых заболеваний желудка [14].

Полиморфизм гена IL1B (–511C>T) наиболее изучен. Ещё 20 лет назад были опубликованы первые работы El-Omar с соавторами, продемонстрировавшие связь данного полиморфизма, а именно носительство T аллеля, с гипохлоргидрией и атрофическими изменениями слизистой, а также повышенным риском развития РЖ [19].

Так как IL-1B является потенциальным ингибитором кислотной продукции и у носителей редкого T аллеля гена IL1B-511 значительно возрастает риск гипохлоргидрии и развития основного предракового состояния – АГ [29]. При снижении секреции кислоты наблюдается параллельное снижение уровня пепсиногенов сыворотки крови. Неинвазивная диагностика АГ, получившая название «серологической биопсии» с определением уровней ПГI и ПГII, а также их соотношения получила высокую оценку экспертов, в том числе Глобального Киотского консенсуса для определения индивидуального повышенного риска развития РЖ [12,13].

В ранее проведённом нами популяционном проспективном исследовании была выявлена связь полиморфизма 511C/T (rs16944) гена IL1B с формированием ракового фенотипа гастрита [30]. При проведении многофакторного регрессионного анализа показано, что риск РЖ при носительстве генотипа T/T гена IL1B многократно возрастает, особенно при сопоставлении с генотипом C/C (OR=10,9; 95% CI 1,03–116,04).

В настоящем исследовании «серия случаев» пациентов с серологически выявленным атрофическим гастритом проанализирована частота генотипов и аллелей полиморфизмов –511C/T (rs16944) гена IL1B и 174G/C (rs1800795) гена IL6. Необходимо отметить, что серологически *H. pylori* инфекция была выявлена в 54,8% случаев (с представительством цитотоксического Cag+ штамма почти в половине случаев), т.е далеко не у всех пациентов с разными стадиями атрофического гастрита. Известно, что часть пациентов со временем оказывается серонегативной в связи с естественной элиминацией *H. pylori* на фоне выраженных атрофических изменений в слизистой. В нашем исследовании 48,7% пациентов получала эрадикационную терапию, и у 35% из них антитела к *H. pylori* не были обнаружены. Кроме того, в исследуемую группу с АГ могли попасть пациенты с аутоиммунным атрофическим гастритом (в 36% случаев мы это могли предположить на основании выявления аутоиммунного фенотипа гастрита, т.е. сочетание низкого ПГI с высоким уровнем гастрина-17).

В отношении полиморфизма гена IL1B, редкий вариант T/T генотипа гена IL1B у пациентов с АГ был выявлен в небольшом проценте случаев (9,3%). Однако у пациентов с признаками выраженного АГ (ПГI менее 30 мкг/л), что составило 60% от общего количества исследованных, объединённый вариант с редким аллелем T (T/T + C/T) был выявлен достоверно чаще (68,8%), чем гомозиготный вариант C/C (31,3%, p=0,004). Более того, у лиц с показателем соотношения ПГI/ПГII менее 3, что является свидетельством выраженной фундальной атрофии (28 человек), гомозиготный вариант T/T встречался чаще (29,6%), чем более распространённый генотип C/C (7,4%, p=0,04).

Важная роль T полиморфизма гена IL1B в развитии хронического гастрита, атрофии, кишечной метаплазии, дисплазии и инициации канцерогенеза также и другими исследователями [31, 32].

Данные в отношении влияния полиморфизма гена IL6 на его плазменный уровень достаточно противоречивы. Есть работы о выявлении более высоких уровней IL-6 в слизистой оболочке желудка при инфицировании *H. pylori* в сравнении с *H. pylori* негативными случаями [24]. Некоторыми исследователями было обнаружено, что однонуклеотидный полиморфизм в промоторном регионе гена IL6 в позиции –174 может регулировать плазменный уровень IL-6 in vivo [33].

По данным Fishman с соавторами (более высокая продукция IL-6 была связана с носительством аллеля IL6–174G по сравнению с носителями генотипа C/C у пациентов с ювенильным артритом [23]. Однако другие авторы отмечали повышение уровня этого цитокина у пациентов с C/C генотипом [34].

Анализ данного полиморфизма у пациентов с РЖ, пептической язвой, неязвенной диспепсией и у здоровых субъектов выявил связь IL6–174 G/G и G/C генотипов с риском развития диффузного типа РЖ (OR: 6,809, p=0,034), но не с интестинальной его формой (OR: 1,109, p=0,908) или такими предраковыми изменениями как атрофия и кишечная метаплазия [35]. Однако в исследовании Sampio и соавторов (2015) более высокую распространённость диффузного типа РЖ в португальской популяции связывают с гомозиготным вариантом C/C IL6–174 (OR = 3,8, 95% ДИ: 1,7–8,7, P = 0,002) [25].

В настоящем исследовании у пациентов с признаками атрофии слизистой оболочки желудка у носителей C/C варианта гена IL6 средний уровень ПГI оказался в 2,5 раза ниже (19,6±16,3 мкг/л) в сравнении с гетерозиготным вариантом C/G (46,9±35,8 мкг/л, p=0,04). С другой стороны, у пациентов с морфологически подтверждённой атрофией объединённый вариант с редким аллелем G (G/G+C/G) встречался достоверно чаще, чем гомозиготный вариант C/C (71,4% против 28,6%, p=001). В других исследованиях сообщалось об отсутствии ассоциации полиморфизма гена IL6 с гастритом или инфекцией *H. pylori*, но наблюдалась связь между генотипом IL6–174CG и аденокарциномой, независимо от гистологического типа опухоли в исследовании из северной Бразилии [36].

Таким образом, в представленном исследовании мы получили ряд фактов, подтверждающих негативную роль изученных полиморфизмов провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-6 в формировании атрофического гастрита, как основного предракового состояния (в частности, достоверно большая частота при атрофическом фундальном гастрите гомозиготного варианта IL1B с редким аллелем T, по сравнению с гомозиготным вариантрм C/C; более низкие средние показатели ПГI при C/C генотипе гена IL6, в сравнении с гетерозиготным вариантом C/G).

Понимая ограниченность настоящего исследования (малочисленность наблюдений, отсутствие контрольной группы), мы считаем необходимость дальнейших исследований, в т.ч. проспективных, для уточнения роли полиморфизмов цитокинов при предраковых состояниях и РЖ, а также механизмов, связывающих воспалительный ответ с процессами канцерогенеза в желудке. Для разработки стратегии профилактики РЖ, необходимы также исследования с использованием многовариантных моделей для проверки модифицирующего эффекта инфекции *H. pylori* на взаимосвязи между генетическими вариантами генов воспалительных цитокинов и предраковыми состояниями, а также взаимодействия между вариантами генов *H. pylori* и цитокинов.

Работа выполнена по Государственному заданию в рамках бюджетной темы № АААА-А17–117112850280–2.

Литература | References

1. *Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018. GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*, 2019, 144, pp.1941–1953.
2. *Correa P.* Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*., 1992, vol. 52(24), pp. 6735–40.
3. *Salim D.K., Sahin M., Koksoy S et al.* Local Immune Response in *Helicobacter pylori* Infection. Medicine (Baltimore), 2016, vol. 95(20), pp.1–8.
4. Kim J.Y., Bae *B. N.,* Kang *G.* et al. Cytokine expression associated with *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinogenesis. APMIS, 2017, vol. 25(9), pp. 808–815.
5. *Graham D. Y. Helicobacter pylori* update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits. *Gastroenterology*, 2015, vol.148, pp. 719–31.
6. *Del Prete A., Allavena P., Santoro G., Fumarulo R., Corsi M. M., Mantovani A.* Molecular pathways in cancer-related inflammation. *Biochem Med (Zagreb)*, 2011, vol.21, pp. 264–275.
7. *Multhoff G., Radons J.* Radiation, inflammation, and immune responses in cancer. *Front Oncol.* 2012, 2:58.
8. *Qu X., Tang Y., Hua S.* Immunological Approaches Towards Cancer and Inflammation: A Cross Talk. *Front Immunol*, 2018, 9:563.
9. *Hussain S.P., Harris C.* C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer*, 2007, vol.121, pp. 2373–2380.
10. *Gigek C.O., Calcagno D. Q., Rasmussen L. T., Santos L. C., Leal M. F. et al.* Genetic variants in gastric cancer: Risks and clinical implications. *Exp Mol Pathol*, 2017, vol.103, pp.101–111.
11. *Hosono K., Yamada E., Endo H., Takahashi H., Inamori M. et al.* Increased tumor necrosis factor receptor 1 expression in human colorectal adenomas. *World J Gastroenterol*, 2012, vol.18, pp. 5360–5368.
12. Agréus *L.,* Kuipers *E..J,* Kupcinskas *L.,* Malfertheiner *P. et al.* Rationale in diagnosis and screening of atrophic

gastritis with stomach-specific plasma biomarkers. *Scand J Gastroenterol*, 2012, vol. 47(2), pp. 136–147.

13. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. Gut, 2015, vol. 64 (9), pp.1353–1367.
14. Negovan *A.*, Iancu *M.*, Fülöp *E.*, Bănescu *C. Helicobacter pylori* and cytokine gene variants as predictors of premalignant gastric lesions. World J Gastroenterol, 2019, vol.25(30), pp. 4105–4124.
15. *Schepp W., Dehne K., Herrmuth H. et al.* Identification and functional importance of IL-1 receptors on rat parietal cells. Am. J. Physiol, 1998, vol. 275, pp. 1094–1105.
16. *Маев И.В., Кучерявый Ю. А., Оганесян Т. С.* Аллельный полиморфизм интерлейкина-1β при геликобактериозе. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии*. 2008, 8: 4–11.

    Maev I. V., Kucheryavyy Yu. A., Oganesyan T. S. Allelic polymorphism of interleukin-1β in helicobacteriosis. Russian journal of gastroenterology, hepatology and coloproctology. 2008; 8: 4–11.
17. *Hitzler I., Sayi A., Kohler E., Engler D. B. et al.* Caspase-1 has both proinflammatory and regulatory properties in Helicobacter infections, which are differentially mediated by its substrates IL-1β and IL-18. *J. Immunol*, 2012, vol. 188 (8), pp. 3594–3602.
18. *Gonzalez C.A., Sala N., Capella G.* Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer*, 2004, vol. 100, pp. 249–260.
19. *El-Omar E.M., Carrington M., Chow W. H., McColl K.E., Bream J. H. et al.* Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, 2000, vol. 404, pp. 398–402.
20. *Gehmert S., Velapatiño B., Herrera P., Balqui J., Santivañez L. et al.* Interleukin-1 beta single-nucleotide polymorphism's C allele is associated with elevated risk of gastric cancer in *Helicobacter pylori*-infected Peruvians. *Am J Trop Med Hyg.*, 2009, vol. 81, pp. 804–810.
21. *Leja M., Wex T., Malfertheiner P.* Markers for gastric cancer premalignant lesions: where do we go? *Dig Dis*, 2012, vol.30, pp. 268–276.
22. *Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N. et al.* Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity.*1997, vol. 6, pp. 315–325.
23. *Fishman D., Faulds G., Jeffery R., Mohamed-Ali V., Yudkin J. S. et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.*, 1998, vol.102, pp.1369–1376.
24. *Yamaoka Y., Kita M., Kodama T., Sawai N., Imanishi J. Helicobacter pylori* cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology*, 1996, vol. 110, pp. 1744–1752.
25. *Sampaio A.M., Balseiro S. C., Silva M. R., Alarcão A., d'Aguiar M.J. et al.* Association Between IL-4 and IL-6 Expression Variants and Gastric Cancer Among Portuguese Population. *GE Port J Gastroenterol*, 2015, vol. 22, pp.143–152.
26. *Crusius J.B., Canzian F., Capellá G. et al.* Cytokine gene polymorphisms and the risk of adenocarcinoma of the stomach in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC-EURGAST) *Ann Oncol*, 2008, vol. 19, pp. 1894–1902.
27. *Manniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* (1982). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring harbor, New York.
28. *Zhang D. et al.* Association of IL-1beta gene polymorphism with cachexia from locally advanced gastric cancer. *BMC Cancer*, 2007, vol.7, pp.45.
29. *Macri A., Versaci A., Loddo S., Scuderi G., Travagliante M., Trimarchi G., Teti D., Famulari C.* Serum levels of interleukin-1 beta, interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha as markers of gastric cancer. *Biomarcers*, 2006, vol. 11 (2), pp. 184–193.
30. *Белковец А.В., Курилович С. А., Максимов В. Н., Рагино Ю. И., Щербакова Л. В., Алёшкина А. В., Черемисина О. В., Чердынцева Н. В., Воевода М. И.* Полиморфизм гена IL1B в сибирской популяции ассоциирован с повышенным риском развития рака желудка. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*, 2017, vol. 145(9), pp. 10–17.

    Belkovets A. V., Kurilovich S. A., Maksimov V. N., Ragino Yu.I., et al. IL1B polymorphism is associated with an increased risk of gastric cancer in the population of western siberia. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2017;(9):10–17. (In Russ.)
31. *Hnatyszyn A., Wielgus K., Kaczmarek-Rys M. et al.* Interleukin-1 Gene Polymorphisms in Chronic Gastritis Patients Infected with *Helicobacter pylori* as Risk Factors of Gastric Cancer Development. Arch. Immunol. *Ther. Exp.*, 2013, vol. 61, pp. 503–512.
32. *He C, Tu H, Sun L. et al. Helicobacter pylori*-related host gene polymorphisms associated with susceptibility of gastric carcinogenesis: a two-stage case-control study in Chinese. *Carcinogenesis,* 2013, vol. 34, pp.1450–7.
33. Bennermo M., Held C., Stemme S., Ericsson C. *G. et al.* Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: implications for a variety of major diseases? Clin Chem., 2004, vol. 50(11), pp. 2136–40.
34. *Hwang I.R., Hsu P. I., Peterson L. E., Gutierrez O. et al.* Interleukin-6 genetic polymorphisms are not related to *Helicobacter pylori* associated gastroduodenal diseases. *Helicobacter*, 2003, vol. 8, pp. 142–8.
35. Pohjanen V.M., Koivurova O. *P.*, Mäkinen J. *M.*, Karhukorpi J. *M. et al.* Interleukin 6 gene polymorphism – 174 is associated with the diffuse type gastric carcinoma. Genes Chromosomes Cancer, 2013, vol. 52(10), pp. 976–82.
36. *Gatti L.L, Burbano R.R, Zambaldi-Tunes M., de-Lábio R.W., de Assumpção P. P. et al.* Interleukin-6 polymorphisms, *Helicobacter pylori* infection in adult Brazilian patients with chronic gastritis and gastric adenocarcinoma. *Arch Med Res.*, 2007, vol. 38, pp. 551–555.