



ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ IL6 И IL1B У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ЖЕЛУДКА В КЛИНИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ «СЛУЧАЙ-КОНТРОЛЬ»

Белковец А. В.¹, Курилович С. А.^{1,2}, Максимов В. Н.^{1,2}, Рагино Ю. И.¹, Щербакова Л. В.¹, Черемисина О. В.³, Чердынцева Н. В.^{3,4}, Андрияшина Н. А.⁵, Воевода М. И.¹

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

² ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России (630091, Россия, г. Новосибирск, Красный проспект, 52)

³ Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН (634009, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5)

⁴ Томский Государственный университет (634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36)

⁵ Негосударственное учреждение здравоохранения «Дорожная клиническая больница на станции Новосибирск-главный» ОАО РЖД (630003, Россия, г. Новосибирск, Владимировский спуск, 2а)

POLYMORPHISM OF THE GENES OF INFLAMMATORY CYTOKINES IL6 AND IL1B IN PATIENTS WITH GASTRIC CANCER IN A CLINICAL CASE-CONTROL STUDY

Belkovets A. V.¹, Kurilovich S. A.^{1,2}, Maksimov V. N.^{1,2}, Ragino Y. I.¹, Scherbakova L. V.¹, Cheremisina O. V.³, Cherdynzeva N. V.³, Andryschina N. A.⁵, Voevoda M. I.¹

¹ IPM — 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" (Russia, 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 (Russia, 630091, Novosibirsk, Krasnyj prospect, 52)

³ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre RAS (Russia, 634009, Tomsk, per. Kooperativnyj, 5)

⁴ Tomsk State University (Russia, 634050, Tomsk, pr. Lenina, 36)

⁵ Non-State Healthcare Institution «Road Clinical Hospital on Novosibirsk-Main station» of Russian Railways Joint stock company (Russia, 630003, Novosibirsk, Vladimirovskij spusk, 2a)

Для цитирования: Белковец А. В., Курилович С. А., Максимов В. Н., Рагино Ю. И., Щербакова Л. В., Черемисина О. В., Чердынцева Н. В., Андрияшина Н. А., Воевода М. И. Полиморфизм генов воспалительных цитокинов IL6 и IL1B у пациентов с раком желудка в клиническом исследовании «Случай-контроль». Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018;152(4): 9–17.

For citation: Belkovets A. V., Kurilovich S. A., Maksimov V. N., Ragino Y. I., Scherbakova L. V., Cheremisina O. V., Cherdynzeva N. V., Andryschina N. A., Voevoda M. I. Polymorphism of the genes of inflammatory cytokines IL6 and IL1B in patients with gastric cancer in a clinical case-control study. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2018;152(4): 9–17.

Белковец Анна Владимировна — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии, зав. клиникой, зав. гастроэнтерологическим отделением клиники НИИТПМ — филиал ИЦиГ СО РАН

Курилович Светлана Арсентьевна — д.м.н., профессор, зав. лабораторией гастроэнтерологии НИИТПМ — филиал ИЦиГ СО РАН, зав. курсом гастроэнтерологии кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии Новосибирского Государственного медицинского университета

Максимов Владимир Николаевич — д.м.н., зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИТПМ — филиал ИЦиГ СО РАН

Рагино Юлия Игоревна — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе, зав. лабораторией клинических биохимических и гормональных исследований НИИТПМ — филиал ИЦиГ СО РАН

Щербакова Лилия Валерьевна — ведущий научный сотрудник лаборатории клинко-популяционных и профилактических исследований терапевтических и эндокринных заболеваний НИИТПМ — филиал ИЦиГ СО РАН

Черемисина Ольга Владимировна — д.м.н., заведующая эндоскопическим отделением научно-исследовательского института онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук

Чердынцева Надежда Викторовна — д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе Томского НИМЦ (Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН)

**Белковец
Анна Владимировна**
Belkovets Anna V.
belkovets@gmx.de

Андрюшина Наталья Анатольевна — к.м.н., зам. директора по терапевтической помощи негосударственного учреждения здравоохранения «Дорожная клиническая больница на станции Новосибирск-главный» ОАО РЖД
Воевода Михаил Иванович — д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель НИИТПМ — филиал ИЦиГ СО РАН

Belkovets Anna — candidate of medical sciences, MD, senior researcher of laboratory of gastroenterology, head of Clinic of 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"

Kurilovich Svetlana — doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of gastroenterology of 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"

Maksimov Vladimir — doctor of medical sciences, head of laboratory of molecular and genetic researches of therapeutic diseases of 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"

Ragino Yulia — doctor of medical sciences, professor, corresponding member of Russian Academy of Science, head of laboratory of clinical, biochemical and hormonal researches of 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"

Scherbakova Lilia — leading researcher of laboratory of population, preventive researches of therapeutic and endocrine diseases of 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"

Cheremisina Olga — MD., DSc, Head of the Endoscopy Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences

Cherdyntseva Nadezhda — doctor of science, professor, corresponding member of Russian Academy of Science, Science Director of Tomsk NRMC (Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences)

Andryschina Natalia — candidate of medical sciences, deputy director of Non-State Healthcare Institution «Road Clinical Hospital on Novosibirsk-Main station» of Russian Railways Joint stock company

Voevoda Michail — doctor of medical sciences, professor, academic RAN, head of the 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"

Резюме

Актуальность: генетический полиморфизм некоторых воспалительных цитокинов ассоциирован с риском развития специфических, ассоциированных с *H.pylori* инфекцией заболеваний, включая рак желудка (РЖ).

Цель исследования: изучить частоты генотипов и аллелей полиморфизма 174G/C (rs1800795) гена IL6 и полиморфизма –511C/T (rs16944) гена IL1B, а также их связь с биомаркерами атрофии у пациентов с РЖ в клиническом исследовании «случай-контроль».

Материалы и методы исследования: в исследование вошли 80 человек с РЖ (45 мужчин и 35 женщин, средний возраст $61,0 \pm 13,4$ лет), лечившихся в 2-х лечебных учреждениях («случаи»). В качестве «контроля» из базы многоцентрового когортного исследования НАРПЕЕ были использованы образцы ДНК 87 человек, подобранных к «случаям» по полу и возрасту. Выделение ДНК из венозной крови проводили методом фенол-хлороформной экстракции. Образцы ДНК генотипировали по опубликованным методикам. Образцы сыворотки тестировали с помощью набора диагностикумов для иммуноферментного анализа с определением уровней пепсиногена I (ПГ I), ПГ II, соотношения ПГ I/ПГ II, гастрин-17 и IgG антител к *H.pylori*.

Результаты: в общей группе не найдено связи полиморфизмов 174 G/C гена IL6 и –511C/T гена IL1B с РЖ. Однако у женщин частота G/G генотипа гена IL6 оказалась в 2 раза выше в группе с РЖ, чем в контроле ($p=0,03$). У пациентов с признаками фундальной атрофии генотип G/G встречался в 2 раза чаще, чем гомозиготный вариант генотипа C/C ($p=0,002$). У пациентов с РЖ генотип с редким аллелем T (C/T + T/T) гена IL1B встречался достоверно чаще, чем гомозиготный C/C вариант ($p=0,03$). У пациентов с РЖ и отсутствием признаков фундальной атрофии (ПГ I более 30 мкг/л) редкий гомозиготный вариант генотипа T/T встречался достоверно реже: 11,3% против 47,2% (генотип C/T) и против 41,5% (генотип C/C) ($p<0,001$).

Выводы: Полученные данные позволяют предполагать связь изученных полиморфизмов с формированием ракового фенотипа гастрита, что требует дальнейшего изучения их значимости (веса) в рискметрии РЖ.

Ключевые слова: рак желудка, полиморфизм, rs1800795, rs16944, IL6, IL1B, пепсиногены, *H.pylori*

Summary

Background: Genetic polymorphism of some inflammatory cytokines is associated with the risk of developing specific, *H. pylori*-associated diseases, including gastric cancer (GC).

Aim: To study the genotypes and alleles frequencies of polymorphism 174G / C (rs1800795) of the IL6 gene and polymorphism –511C / T (rs16944) of the IL1B gene, as well as their association with biomarkers of atrophy in patients with GC in the clinical «case-control» study.

Materials and methods: 80 patients with GC (45 mails and 35 females with an average age of 61.0 ± 13.4 years) from two medical centers were studied. In the control, DNA samples from 87 subjects were matched by sex and age from the base of the multicenter cohort study HAPIEE. DNA was isolated from venous blood using phenol-chloroform extraction. DNA samples were genotyped according to published methods. Serum samples were tested using a diagnostic kit for enzyme-linked immunosorbent assays to determine the levels of pepsinogen I (PGI), PGI, PGI/PGII ratios, gastrin-17 and IgG antibodies to *H. pylori*.

Results: In the general group, association of polymorphisms of 174 G/C of the IL6 gene and the –511C/T gene of the IL1B gene with the GC was not found. However, in women, the frequency of the G/G genotype of the IL6 gene was 2 times higher in the group with G/C than in the control ($p=0.03$). In patients with corpus atrophy, the G/G genotype was revealed twice as often as homozygous C/C variant of the IL6 gene ($p=0.002$). In patients with GC, the genotype with a rare T allele (C/T + T/T) of the IL1B gene was significantly more frequent than the common homozygous C/C variant ($p=0.03$). The rare homozygous T/T genotype was significantly less frequent in patients with GC and no signs of corpus atrophy ($\text{PGI} > 30 \mu\text{g/l}$): 11.3% vs 47.2% (C/T genotype) and vs 41.5% (genotype C/C) ($p < 0.001$).

Conclusions: The received data allow assuming the possible connection of studied polymorphisms with the formation of a cancer phenotype of the gastritis, which requires further study of their significance (weight) in the GC riskometry.

Key words: gastric cancer, polymorphism, rs1800795, rs16944, IL6, IL1B, pepsinogenes, *H. pylori*

Введение

В последние десятилетия наблюдается снижение заболеваемости и смертности от рака желудка (РЖ) в большинстве стран, включая и Россию, однако, несмотря на это РЖ остаётся поздно диагностируемым заболеванием с плохим прогнозом и высоким уровнем смертности [1,2,3].

Канцерогенез в желудке – это мультифакторальный и многоступенчатый процесс, занимающий десятилетия [4]. Целый ряд факторов, таких как инфекция, ассоциированная с *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), факторы окружающей среды, стиль жизни и особенности питания вносят свой вклад в развитие этого заболевания [5,6]. Хронический атрофический гастрит (АГ) является основным предраковым заболеванием интестинального РЖ [4]. Для неинвазивной диагностики АГ широко используется иммуноферментный анализ уровня пепсиногенов I и II (ПГИ, ПГИI), их соотношения (ПГИ/ПГИI), снижающихся в случае атрофии в теле и дне желудка, а также уровня гастрина-17, который повышается в случае преимущественно фундального АГ и снижается, если атрофия развивается в только в антральном отделе или обоих отделах желудка [7]. На основании результатов мета-анализа с оценкой более 40 исследований и включением 300000 человек, Miki и соавт. пришли к выводу, что тесты на определение сывороточных пепсиногенов не подходят для скрининга РЖ, но могут быть использованы для идентификации пациентов с предраковыми изменениями, т.е. с высоким риском развития РЖ [8].

Воспаление – это неотъемлемая часть канцерогенеза, а хронический поверхностный гастрит, ассоциированный с *H. pylori* является одной из ранних стадий этого многоступенчатого процесса, приводящего к интестинальному РЖ. Локальная продукция таких провоспалительных цитокинов как интерлейкин – 6 (IL-6) и интерлейкин – 1 β (IL-1B) вовлечена в процесс клеточного иммунного ответа в слизистой оболочке желудка в ответ на *H. pylori* инфекцию [9]. Воспалительный процесс в антральном отделе желудка приводит к снижению кислотной продукции как через воздействие провоспалительных цитокинов, так и из-за прямого действия *H. pylori* на париетальные клетки [10].

IL-6 – это плейотропный провоспалительный цитокин продуцируемый как иммунными, так и целым рядом других клеток [11]. В некоторых исследованиях при *H. pylori* ассоциированном гастрите было продемонстрировано повышение в слизистой оболочке желудка уровня IL-6, участвующего в процессе миграции и пролиферации Т-лимфоцитов в очаге воспаления [12]. Показано, что IL-6 через продукцию Th17 приводит к блокировке дифференцировки CD4+ клеток в Treg клетки, а баланс между Th17 и Treg клетками в свою очередь может быть вовлечён в развитие и прогрессию рака [13]. Ген IL6 локализован в 7p21 хромосоме и включает 5 экзонов и 4 интрона [14]. До 90% всех вариаций генома, приводящих к нарушениям на транскрипционном или трансляционном уровнях, составляют однонуклеотидные замены

(Single Nucleotide Polymorphism, SNP). В промоторном регионе гена IL6 идентифицированы следующие однонуклеотидные замены (SNPs), связанные с его продукцией: rs1800795 (–174 G/C), rs1800796 (–572 C/G) и rs1800797 (–597 G/A) [15]. Целый ряд исследований посвящён изучению связи полиморфизма –174 G/C гена IL6 и риска развития РЖ. Мета-анализ шести исследований (672 пациента с РЖ и 957 человек из контрольной группы) не выявил значимой ассоциации между IL6–174 G/C полиморфизмом и риском РЖ, а также различий между европейскими и азиатскими популяциями [16].

IL-1β – это провоспалительный цитокин, относящийся к семейству IL-1 и активирующий Т-лимфоциты и макрофаги, с последующим синтезом острофазовых белков и других цитокинов [17]. Ингибирующее влияние IL-1β на кислотообразование в желудке реализуется через непосредственное воздействие на рецепторы к IL-1β, расположенные на мембране париетальных клеток, а также через стимуляцию синтеза простагландина E2 – сильного ингибитора соляной кислоты [18]. *H. pylori* инфекция стимулирует повышенную выработку многих цитокинов, включая IL-1β, как в экспериментальных моделях, так и *in vivo* [19]. Было показано, что нокаутные мыши по гену IL1B неспособны к клеточному иммунитету против *H. pylori* и развитию воспалительных и метапластических изменений в слизистой оболочке желудка [20]. Было также установлено, что практически все опухолевые клетки и клетки микроокружения опухоли способны продуцировать секретруемую форму IL-1β, являющегося потенциальным стимулятором клеточной пролиферации [20]. Более того, в качестве диагностического маркера РЖ, некоторыми исследователями рекомендуется определять концентрацию IL-1β в сыворотке крови,

учитывая значимое превышение уровня последнего у пациентов с РЖ [21]. Ген, кодирующий IL-1β, локализован на хромосоме 2q13–21. Однонуклеотидный полиморфизм гена IL1B в позиции –511 с заменой цитозина на тимин (C-T) является одним из наиболее изученных. Варианты гена IL1B с редким аллелем являются высокопродуктивными, т.е. у носителей таких генотипов вырабатывается в разы больше этого цитокина в сравнении с лицами гомозиготными по распространённому аллелю этого гена [22]. Повышенная продукция цитокина сопровождается большим ингибированием кислотной продукции с расширением колонизации *H. pylori* в другие отделы желудка и прогрессированием воспаления и развитием атрофии – основного предракового состояния [22].

Исследования ассоциации полиморфизма гена IL1B с риском развития РЖ продолжаются, так как данные, посвящённые этой проблеме достаточно противоречивы. Первыми о наличии ассоциации между полиморфизмом гена IL1B и риском развития РЖ сообщили El-Omag и соавт. [23]. Связь между полиморфизмом гена IL1B и восприимчивостью к инфекции *H. pylori*, выраженностью АГ, а также развитием РЖ, продемонстрирована во многих популяционных и клинических исследованиях, проводимых в разных регионах мира [23,24,25,26]. Однако есть исследования, в которых связь между РЖ и наличием полиморфизма IL1B-511 не обнаружена [27,28].

Цель исследования: изучить частоты генотипов и аллелей полиморфизма –174G/C (rs1800795) гена IL6 и полиморфизма –511C/T (rs16944) гена IL1B, а также их связь с биомаркерами атрофии у пациентов с раком желудка в клиническом исследовании «случай-контроль».

Материалы и методы

В исследование вошли 80 человек с раком желудка (со средним возрастом $61,0 \pm 13,4$ лет), последовательно обратившихся в два лечебных учреждения Западной Сибири, преимущественно европейцы. Только 9 человек были монголоидами (якуты, тувинцы, буряты). У 45 мужчин средний возраст составил $60,0 \pm 13,6$ лет и у 35 женщин $62,4 \pm 13,3$ лет. Кроме стандартных исследований, необходимых для установления диагноза, все пациенты анкетированы о курении, потреблении алкоголя и наличии гастроинтестинальных жалоб. Была составлена родословная и собраны образцы венозной крови. После центрифугирования сыворотку и сгусток замораживали и хранили при температуре -20°C . К каждому случаю РЖ был подобран контроль (образцы ДНК 87 человек, соответствующие случаям по полу и возрасту) из Новосибирской базы международного многоцентрового когортного исследования HAPPEE.

Образцы сыворотки тестировали с помощью набора диагностикумов для иммуноферментного анализа. Фундальную атрофию определяли как выраженную, если уровень ППГ был ниже 30 мкг/л, концентрация ППГ ниже 3 мкг/л также

оценивалась как низкая. Умеренную фундальную атрофию определяли как умеренную при показателях ППГ в пределах 31–50 мкг/л. Учитывали также соотношение ППГ/ППГII (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 [29].

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

Полиморфизм промоторного региона гена IL1B исследовался в позиции –511T/C (rs16944) по методике (ПЦР с ПДРФ), описанной D. Zhang и соавт. [30].

Полиморфизм 174G/C гена IL6	РЖ (1) n=80 n (%)	Контроль (2) n=87 n (%)	ОШ (95% ДИ)	p ₁₋₂
C/C	20 (24,7)	16 (18,4)	1,46 (0,69–3,05)	0,320
C/G	30 (37,0)	42 (48,3)	0,63 (0,34–1,17)	0,141
G/G	30 (38,3)	29 (33,3)	1,24 (0,66–2,33)	0,504
G аллель	92 (56,8)	100 (57,5)	0,97 (0,63–1,50)	0,900
C аллель	70 (43,2)	74 (42,5)	1,03 (0,67–1,58)	

Таблица 1.
Частота аллелей и полиморфных вариантов 174G/C гена IL6 в группах «случай» и «контроль»

Генотипы гена IL6	Средние значения биомаркёров (M±б)			
	ПГІ мкг/л	ПГІІ мкг/л	Гастрин-17 пмоль/л	ПГІ/ПГІІ
C/C	111,0 ± 98,2	22,2 ± 31,9	19,6 ± 15,4	7,3 ± 4,9
C/G	68,4 ± 46,3	12,4 ± 8,4	14,9 ± 16,1	6,2 ± 3,8
G/G	105,4 ± 126,5	27,1 ± 33,6	23,7 ± 24,3	5,4 ± 5,9

Таблица 2.
Средние показатели биомаркёров у носителей разных генотипов гена IL6

Примечание:
достоверных различий между группами не получено.

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. Отношение шансов (ОШ) с доверительным интервалом (95% ДИ) рассчитывали по таблице сопряженности.

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 исследования

По полиморфизму rs1800795 гена IL6 в контрольной группе частота генотипов соответствовала равновесию Харди–Вайнберга ($\chi^2=0,01$). Частота аллеля C составила 42,5%, а аллеля G 57,5%. Распределение частот аллелей совпадает с полученными для других европейских популяций.

В группе с РЖ генотип C/C выявлен в 24,7% случаев, C/G генотип в 37,0% случаев и генотип G/G у 38,3% пациентов. Статистически достоверной разницы между частотами генотипов и аллелей между группами контроля и РЖ не получено (табл. 1).

При сравнении разных вариантов генотипов между двумя группами также не выявлено статистически значимой разницы: CC с (CG + GG) $p=0,320$; CG с (CC + GG) $p=0,141$; GG с (CC + CG) $p=0,504$.

В обеих группах проведено сравнение частоты генотипов гена IL6 в зависимости от пола. У женщин частота G/G генотипа в группе с РЖ оказалась выше, чем в контроле (68,2% vs 31,8%, $p=0,03$). Напротив, гетерозиготный C/G генотип у женщин с РЖ встретился в 37,5% vs 62,5% у женщин из контрольной группы ($p=0,04$). При объединении генотипов с G аллелем (C/G+G/G), достоверных различий между двумя группами у женщин не получено ($p=0,9$).

Сравнение частот генотипов в 2-х возрастных группах (27–50 лет и старше 50 лет) у пациентов с РЖ и контролем не выявил статистически значимой разницы. Однако у пациентов с РЖ различия по аллельным частотам выявлены в возрастной группе старше 50 лет и в общей группе. Так,

носительство C аллеля встречалось реже в сравнении с носительством G аллеля в общей группе (43,2% vs 56,8%, $p=0,02$) и у пациентов с РЖ старше 50 лет (43,2% vs 56,8%, $p=0,03$).

В группе с РЖ средние значения ПГІ, ПГІІ, соотношения ПГІ/ПГІІ и гастрин-17 не отличались при разных генотипах гена IL6 (табл. 2). Однако у пациентов с признаками фундальной атрофии разной степени выраженности (ПГІ менее 50 мкг/л) генотип G/G встречался в 2 раза чаще, чем генотип C/C: 47,1% vs 20,6%, $p=0,002$. Та же закономерность выявлена и для низкого соотношения ПГІ/ПГІІ (менее 3): 57,1% vs 17,9% ($p=0,004$).

При этом у преобладающего большинства носителей гомозиготного варианта G/G диагноз РЖ установлен на поздних стадиях заболевания: в 80% случаев – на III и IV стадии и только в 10% на I и II стадиях ($p < 0,001$). Кроме того, у пациентов со стадиями заболевания III и IV по классификации TNM генотип G/G встречался достоверно чаще (48,5%) в сравнении с генотипом C/C (18,2%), $p=0,01$. У пациентов с IV стадией заболевания (T4) генотип C/C встречался реже в сравнении с генотипом C/G 12,5% vs 41,7% ($p=0,03$) и генотипом G/G (45,8%, $p=0,01$).

По полиморфизму гена IL1B в контрольной группе частота генотипов соответствовала равновесию Харди–Вайнберга ($\chi^2=2,5$). Частота аллеля C составила 63,8%, а аллеля T составила 36,2%. В группе с РЖ генотип C/C выявлен у 33 человек (41,3%), C/T генотип в 43,8% случаев (35 человек) и генотип T/T у 12 пациентов (15,0%). Частота аллеля C составила 63,1%, а аллеля T – 36,9%. Статистически

Таблица 3.
Частоты аллелей и полиморфных вариантов 511C/T (rs16944) гена IL1B в группах «случай» и «контроль»

Полиморфизм гена IL1B	РЖ (1) n=80 n (%)	Контроль (2) n=87 n (%)	ОШ (95% ДИ)	p ₁₋₂
C/C	33 (41,2)	32 (36,8)	1,21 (0,65–2,25)	0,554
C/T	35 (43,8)	47 (54,0)	0,66 (0,36–1,22)	0,185
T/T	12 (15,0)	8 (9,2)	1,74 (0,67–4,51)	0,248
C аллель	101 (63,1)	111 (63,8)	0,97 (0,62–1,52)	0,899
T аллель	59 (36,9)	63 (36,2)	1,03 (0,66–1,61)	

Таблица 4.
Частоты генотипов гена IL1B у пациентов с РЖ в зависимости от пола

Генотипы гена IL1B	Пациенты с РЖ			p ₁₋₂
	Мужчины (1) n (%)	Женщины (2) n (%)	Оба пола n (%)	
C/C (1) n (%)	19 (57,6) (42,2)	14 (42,4) (40,0)	33 (100) (41,3)	0,2
C/T (2) n (%)	18 (51,4) (40,0)	17 (48,6) (48,6)	35 (100) (43,8)	0,8
T/T (3) n (%)	8 (66,7) (17,8)	4 (33,3) (11,4)	12 (100) (15,0)	0,1
Всего:	45 (56,3) (100)	35 (43,8) (100)	80 (100) (100)	0,1
C аллель	56 (68,3)	45 (64,3)	101 (63,1)	-
T аллель	26 (31,7)	25 (35,7)	59 (36,9)	-
p ₁₋₂	0,83	0,47	0,75	-
p ₁₋₃	0,01	0,007	<0,001	
p ₂₋₃	0,02	0,001	<0,001	
p _{C-T}	<0,001	0,001	<0,001	

Таблица 5.
Средние показатели биомаркёров в зависимости от генотипа IL1B

Генотипы IL1B	Средние значения биомаркёров (M±δ)			
	ПГІ, мкг/л	ПГІІ, мкг/л	Гастрин-17, пмоль/л	ПГІ/ПГІІ
C/C	98,3 ± 107,2	18,0 ± 24,7	22,0 ± 18,2	6,4 ± 4,6
C/T	97,2 ± 88,2	20,4 ± 21,5	21,7 ± 22,7	5,8 ± 4,0
T/T	67,9 ± 102,1	28,5 ± 46,4	10,9 ± 9,8	6,6 ± 8,8

достоверной разницы между частотами генотипов и аллелей между группами контроля и РЖ не получено (табл. 3).

После объединения генотипов с редким аллелем Т (С/Т + Т/Т) также не выявлено статистически значимой разницы между группами «случай» и «контроль» (p=0,263).

Однако, у пациентов с РЖ, как в общей группе, так и в подгруппах мужчин и женщин, гомозиготный вариант С/С и гетерозиготный вариант генотипа С/Т гена IL1B встречались чаще, чем редкий вариант генотипа Т/Т (табл. 4). Но в общей группе (оба пола) объединённый генотип с редким аллелем Т (С/Т + Т/Т) оказался более частым, чем гомозиготный С/С вариант (43,8% vs 41,3%, p=0,03).

Различий по частоте генотипов гена IL1B между группами РЖ и контролем в зависимости от пола не получено.

Сравнение частот генотипов в 2-х возрастных группах (27–50 лет и старше 50 лет) у пациентов с РЖ и контролем не выявил статистически значимой разницы, в т.ч. и после объединения генотипов с редким аллелем Т в одну группу. Однако,

у пациентов с РЖ частота генотипов С/Т+Т/Т больше, чем частота распространённого генотипа С/С как в общей группе (37,0% vs 24,7%, p=0,03), так и в возрастной группе старше 50 лет (61,6% vs 38,5%, p=0,009).

У носителей генотипа Т/Т средний показатель ПГІ заметно ниже, чем при других вариантах генотипа, однако эта разница статистически не значима. Не выявлено разницы и для других показателей «ГастроПанели» (табл. 5).

Большинство носителей генотипа С/С и С/Т не имели признаков фундальной атрофии (соотношение ПГІ/ПГІІ выше 3): 65,6% и 62,9% vs 34,4% и 37,1% с соотношением ПГІ/ПГІІ менее 3 (p=0,02 и p=0,03, соответственно). Однако у пациентов с РЖ и уровнем ПГІ более 30 мкг/л гомозиготный вариант генотипа Т/Т встречался достоверно реже: 11,3% vs 47,2% (генотип С/Т) и vs 41,5% (генотип С/С) (p<0,001). У пациентов с РЖ носителей гомозиготного генотипа Т/Т признаки выраженной фундальной атрофии (ПГІ менее 30 мкг/л) встречались достоверно чаще, чем высокие показатели ПГІ (более 160 мкг/л) (54,5% vs 9,1%, p=0,03).

Обсуждение

Роль иммунных механизмов и их генетических детерминант в этиологии РЖ подтверждается многими исследователями. Генетический полиморфизм некоторых провоспалительных цитокинов ассоциирован с риском развития специфических, ассоциированных с *H.pylori* инфекцией заболеваний, включая РЖ [31].

Что касается IL-6, то данные о влиянии полиморфизма гена IL6 на его плазменный уровень достаточно противоречивы. В некоторых исследованиях было обнаружено, что SNP в промоторном регионе IL6 гена в позиции -174 может регулировать плазменный уровень IL-6 in vivo [32]. Так, носительство С аллеля в позиции -174 в сравнении с G аллелем было связано с более низким уровнем IL-6. Однако другими исследователями было показано, что пациенты с C/C генотипом имеют повышенный уровень IL-6 [33]. Pohjanen V. M. и соавт. анализировали -174 G/C (rs1800795) полиморфизм у пациентов с РЖ, пептической язвой, неязвенной диспепсией и у здоровых субъектов. Была выявлена 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 [34].

В настоящем исследовании у пациентов с интестинальной и диффузной формами РЖ генотип C/C встречался реже (25,4% и 22,7%) в сравнении с генотипами C/G+G/G (74,6% и 77,3%, $p<0,001$). Однако мета-анализ W. Junn et al., с включением 672 пациентов с РЖ и 957 человек из контрольной группы не выявил значимой ассоциации между IL6-174 G/C полиморфизмом и риском РЖ [16]. Причём использовались разные варианты моделей: CC генотип против GG ($p=0,968$); CC + CG против GG ($p=0,392$); GG + CG против CC ($p=0,749$); носительство С аллеля против G аллеля ($p=0,143$) [16]. По результатам нашего исследования статистически достоверной разницы по частоте генотипов, разных их комбинаций и частоте аллелей между группой с РЖ и контролем не получено. Однако у женщин частота G/G генотипа выше в группе с РЖ, чем в контроле (68,2% vs 31,8%, $p=0,03$). Частоты генотипов гена IL6 были проанализированы в двух возрастных группах (27–50 лет и старше 50 лет). Различия по аллельным частотам выявлены у пациентов с РЖ в возрастной группе старше 50 лет и в общей группе. Так, носительство С аллеля встречалось реже в сравнении с носительством G аллеля в общей группе (43,2% vs 56,8%, $p=0,02$) и у пациентов с РЖ старше 50 лет (43,2% vs 56,8%, $p=0,03$). Средние значения биомаркёров не отличались при разных генотипах гена IL6 у пациентов

с РЖ. Однако у пациентов с серологически выявленной атрофией (низкий ППГ и соотношение ППГ/ППП) генотип G/G встречался чаще в 2–3 раза, чем генотип C/C (47,1% vs 20,6%, $p=0,002$ и 57,1% vs 17,9%, $p=0,004$). Также, у пациентов со стадиями заболевания III и IV по классификации TNM генотип G/G встречается достоверно чаще (48,5%) в сравнении с генотипом C/C (18,2%, $p=0,01$).

Полиморфизм гена IL1B в позиции -511 C/T ассоциирован с целым рядом патологических состояний, включая канцерогенез. Было показано, что носительство Т аллеля в позиции -511 связано с риском развития предраковых изменений слизистой желудка и РЖ особенно у *H.pylori* инфицированных субъектов [35]. В настоящем исследовании подавляющее большинство пациентов с РЖ оказались инфицированными *H.pylori* (72,8%).

Е. М. El-Omag и соавт. в 2000 году опубликовали первые результаты по выявлению связи полиморфизма гена IL1B с гипохлоргидрией и атрофией слизистой желудка [23]. Носители полиморфных вариантов IL1B-511/-31 гена IL1B, а также родственники больных РЖ имели повышенный риск развития как предраковых изменений, так и РЖ [23]. Такая же связь была выявлена у американцев европейского происхождения [36].

Что касается настоящего исследования, то статистически достоверной разницы между генотипами в группах контроля и РЖ не получено. Эти результаты совпадают с данными, полученными другими исследователями. Так, в исследованиях из Финляндии и на примере азиатской популяции не выявлено связи между РЖ и наличием полиморфизма IL1B-511 [27,28].

Доказано, что IL-1 β является потенциальным ингибитором кислотной продукции с последующим развитием атрофических изменений слизистой желудка и гипохлоргидрии у носителей редкого Т аллеля гена IL1B [23]. При снижении кислотной продукции идёт параллельное снижение уровня пепсиногенов сыворотки крови, поэтому определение уровня ППГ и ППП, а также их соотношения является методом неинвазивной диагностики атрофии как основного предракового состояния, что подтверждено и положениями Глобального Киотского консенсуса [37]. По результатам настоящего исследования, у носителей генотипа Т/Т средний уровень ППГ оказался несколько ниже, чем при других вариантах генотипа IL1B, не достигая, однако, статистической значимости. При этом, у пациентов с РЖ и уровнем ППГ более 50 мкг/л гомозиготный вариант генотипа Т/Т встречался в 4 раза реже, чем генотип C/T и C/C ($p<0,001$ и $p=0,002$, соответственно).

Заключение

В настоящем исследовании «случай-контроль» не найдено связи полиморфизма 174G/C (rs1800795) гена IL6 и полиморфизма -511C/T (rs16944) гена IL1B с риском развития РЖ в общей группе, что, возможно, связано со сравнительно небольшим

размером исследуемых групп или их неоднородностью. Однако получен ряд признаков связи указанных полиморфизмов с формированием ракового фенотипа гастрита. Так, по сравнению с контролем, в группе с РЖ у женщин частота G/G

генотипа IL6 достоверно выше в группе с РЖ, чем в контроле. У пациентов с признаками фундальной атрофии генотип G/G встречался достоверно чаще, чем гомозиготный вариант генотипа C/C. У носителей гомозиготного варианта G/G диагноз РЖ установлен на поздних стадиях заболевания (III и IV) в 8 раз чаще, чем на I и II стадиях. В группе с РЖ объединённый генотип с редким аллелем T (C/T + T/T) гена IL1B, с которым связывают повышенную продукцию IL-1β, встречался достоверно чаще, чем гомозиготный

C/C вариант, а у пациентов с РЖ носителей гомозиготного генотипа T/T признаки фундальной атрофии встречались в 6 раз чаще, чем высокие показатели ППГ (более 160 мкг/л, $p=0,03$). При этом, при РЖ и отсутствии признаков выраженной фундальной атрофии редкий гомозиготный вариант генотипа T/T встречался в 4 раза реже, чем гетерозиготный вариант C/T и распространённый C/C генотип. Необходимо дальнейшее изучения значимости (веса) изученных полиморфизмов в рискметрии РЖ.

Работа выполнена в рамках ГЗ № 0324–2018–0002.

Литература | Reference

1. Crew K. D., Neugut A. I. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2006, vol. 12(3), pp. 354–362.
2. Jemal A., Thomas A., Murray T., Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2002, vol. 52, pp. 23–47.
3. Давыдова М. И., Аксель Е. М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 году. Москва, 2014. 226 с.
Davydova M. I., Aksel' E. M. Statistics of malignant tumors in Russia and CIS countries in 2012. Moscow: Izdatel'skaya gruppa RONTs, 2014. 226 p. (In Russ.).
5. 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.
6. Schlemper R. J., Riddell R. H., Kato Y., Borchard F. et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*, 2000, vol. 47(2), pp. 251–5.
7. Parkin D. M. International variation. *Oncogene*, 2004, vol. 23, pp. 6329–40.
8. 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.
9. Miki K. Gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. *Gastric Cancer*, 2006, vol. 9, pp. 245–253.
10. 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. 1744–52.
11. McColl K. E., El-Omar E., Gillen D. *Helicobacter pylori* gastritis and gastric physiology. *Gastroenterol Clin North Am*, 2000, vol. 29, pp. 687–703.
12. Lowry S. F. Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg*, 1993, vol. 128, pp. 1235–1241.
13. 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.
14. Chi L. J., Lu H. T., Li G. L., Wang X. M. et al. Involvement of T helper type 17 and regulatory T cell activity in tumour immunology of bladder carcinoma. *Clin Exp Immunol*, 2010, vol. 161, pp. 480–489.
15. Ray A., LaForge K. S. and Sehgal P. B. On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol Cell Biol*, 1990, vol. 10, pp. 5736–5746.
16. Du Y., Gao L., Zhang K., Wang J. Association of the IL6 polymorphism rs1800796 with cancer risk: a meta-analysis. *Genetics and Molecular Research*, 2015, vol. 14(4), pp. 13236–13246.
17. Juni W., Wenjun H., Jinxin L., Legen N. et al. Association of IL-6 polymorphisms with gastric cancer risk: evidences from a meta-analysis. *Cytokine*, 2012, vol. 59(1), pp. 176–83.
18. Маев И. В., Кучерявый Ю. А., Оганесян Т. С. Аллельный полиморфизм интерлейкина-1β при геликобактериозе. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2008, № 8, с. 4–11.
Mayev I. V., Kucheryavy Yu. A., Oganesyanyan T. S. Interleukin-1β allelic polymorphism at *H. pylori* infection. *RJGHC*. 2008. Vol. 18. No 5. P. 4–11.
18. 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.
19. 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.
20. Berezhnaya N. M. The role of immune cells in the tumor microenvironment: The interaction of cells of the immune system with the other components of the microenvironment. *Oncology* 2009; 11 (2): 86–93.
Бережная, Н. М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения. *Онкология* 2009; 11 (2): 86–93 (In Russ.)
21. Macri A., Versaci A., Loddo S., Scuderi G. et al. Serum levels of interleukin-1 beta, interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha as markers of gastric cancer. *Biomarkers*, 2006, vol. 11(2), pp. 184–193.
22. Gonzalez CA, Sala N, Capella G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer*, 2004, vol. 100, pp. 249–260.
23. El-Omar E. M., Carrington M., Chow W. H. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, 2000, vol. 404, pp. 398–402.
24. Jyh-Ming Liou et al. IL-1β-511 polymorphism is associated with increased host susceptibility to *Helicobacter pylori* infection in Chinese. *Helicobacter*, 2007, vol. 12, pp. 142–149.
25. Machado J. C., Pharoah P., Sousa S. Interleukin-1β and interleukin-1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 2001, vol. 121(4), pp. 823–829.
26. Rad R., Dossumbekova A., Neu B. et al. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation

- during *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 2004, vol. 53, pp. 1082–1089.
27. Farin Kamangar et al. Polymorphisms in inflammation related genes and risk of gastric cancer (Finland). *Cancer Causes Control*, 2006, vol. 17, pp. 117–125.
28. Matsukura N., Yamada S., Kato S. et al. Genetic differences in interleukin-1 β polymorphisms among four Asian populations: an analysis of the Asian paradox between *H. pylori* infection and gastric cancer incidence. *J Exp Clin Cancer Res*, 2003, vol. 22, pp. 47–55.
29. Manniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring harbor, New York, 1982.
30. Zhang D. et al. Association of IL-1beta gene polymorphism with cachexia from locally advanced gastric cancer. *BMC Cancer*, 2007, vol. 7, pp. 45.
31. Bartchewsky W. Jr., Martini M. R., Masiero M., Squasconi A. C., Alvarez M. C., Ladeira M. S., Salvatore D., Trevisan M., Pedrazzoli J. Jr. Effect of *Helicobacter pylori* infection on IL-8, IL-1beta and COX- 2 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. *Scand J Gastroenterol*, 2009, vol. 44 (2), pp. 153–161.
32. 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.
33. 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.
34. 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, 2013, vol. 52(10), pp. 976–82.
35. 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.
36. El-Omar E.M, Carrington M., Chow W. H., McColl K.E. et al. The role of interleukin-1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer. *Nature*, 2001, vol. 5, pp. 6842–99.
37. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*, 2015, vol. 64 (9), pp.1353–1367.