

ПОЛИМОРФИЗМ RS1800629 (G-308A) ГЕНА TNF У ДЕТЕЙ С ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНФИЦИРОВАНИЯ HELICOBACTER PYLORI

З.С. Камалов¹, З.М. Абдужабарова^{2,3}, М.С. Шодиева⁴, М.Р. Рузибакиева¹

¹Институт иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан

²Центр развития профессиональных квалификации медицинских работников

³Национальный детский медицинский центр

⁴Бухарский государственный медицинский институт имени Абу Али ибн Сино

Иммунный ответ на инфекцию H. pylori у детей является более ранним патологическим ответом и может служить своеобразной моделью для изучения характерных ics течения H. pylori. В условиях Республики Узбекистан такие исследования не проводились, в то же время тенденция к набору веса, омоложению и высокая частота осложнений диктуют необходимость изучения данного вопроса.

Цель: Изучение клинической и прогностической значимости полиморфизма rs1800629 (G-308A) гена TNF у детей гастроудоденальной патологией в зависимости от инфицирования H. Pylori.

Обследовано 182 детей в возрасте от 7 до 18 лет с гастроудоденальной патологией. Из них 98 (53,8%) больных с HP ассоциированной патологией и 84 (46,2%) больных с HP отрицательной патологией гастроудоденальной зоны. Определено полиморфизма rs1800629 (G-308A) гена TNF. Проведено статистическая обработка данных.

Наличие генотипа GA ФНО-а rs1800629 является неблагоприятным прогностическим маркером в развитии данной патологии при наличии HP инфекции. В тоже время GG генотип rs1800629 является протективным генотипом для основной патологии вне зависимости от наличия HP инфекции.

Ключевые слова: дети, гастроудоденит, язвенный болезнь, Helicobacter pylori, иммунология, генетика.

RS1800629 (G-308A) TNF GENE POLYMORPHISM IN CHILDREN WITH GASTRODUODENAL PATHOLOGY DEPENDING ON HELICOBACTER PYLORI INFECTION

Z.S. Kamalov¹, Z.M. Abdujabarova^{2,3}, M.S. Shodieva⁴, M.R. Ruzibakieva¹

¹Institute of Immunology and Human Genomics Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

²Center for the Development of Professional Qualification of Medical Workers

³National Children's Medical Center

⁴Bukhara State Medical Institute named after Abu Ali ibn Sino

The immune response to H. pylori infection in children is an earlier pathological response and can serve as a kind of model for studying the characteristic course of H. pylori. In the conditions of the Republic of Uzbekistan, such studies have not been carried out, at the same time, the tendency towards weight gain, rejuvenation and a high frequency of complications dictate the need to study this issue.

Purpose. To study the clinical and prognostic significance of the rs1800629 (G-308A) polymorphism of the TNF gene in children with gastroduodenal pathology, depending on H. pylori infection.

Examined 182 children aged 7 to 18 years with gastroduodenal pathology. Of these, 98 (53.8%) patients with HP associated pathology and 84 (46.2%) patients with HP negative pathology of the gastroduodenal zone. The rs1800629 (G-308A) polymorphism of the TNF gene was determined. Statistical data processing has been carried out.

The presence of the GA TNF-a genotype rs1800629 is an unfavorable prognostic marker in the development of this pathology in the presence of HP infection. At the same time, the GG genotype rs1800629 is a protective genotype for the underlying pathology, regardless of the presence of HP infection.

Keywords: children, gastroduodenitis, peptic ulcer, Helicobacter pylori, immunology, genetics.

Инфекция *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) в настоящее время рассматривается как ведущий этиопатогенетический фактор язвенной болезни (ЯБ) и хронического гастрита (ХГ) в детском возрасте [1]. Результаты масштабных исследований показали, что на долю язвенной болезни, связанной с инфекцией *Helicobacter pylori*, приходится 70-80% случаев выявления язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и 50-60% язв желудка [2]. Появляется все больше доказательств роли, которую играет инфекция *Helicobacter pylori* в возникновении и развитии рака желудка [3].

Фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) представляет собой провоспалительный цитокин, синтезируемый преимущественно макрофагами и моноцитами, который играет важную роль в инициации и усилении иммунно-воспалительного ответа на инфекцию *H. pylori* [5]. На клеточном уровне TNF- α стимулирует выработку провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1, -6, -8. Отвечающих за иммунную и воспалительную реакцию, включая некроз [6, 7]. Гены, кодирующие их, являются одними из основных генов-кандидатов язвенной болезни. Полиморфные варианты генов цитокинов и их рецепторов могут оказывать существенное влияние на риск развития язвы желудка и ДПК. Кроме того, бактерия, индуцируя иммунновоспалительную реакцию, способствует гибели собственных клеток макроорганизма, что вызывает развитие глубоких дистрофических и атрофических изменений слизистой оболочки желудка с явлениями метаплазии и дисплазии. Дальнейшие гиперпластические процессы приводят к развитию рака желудка [8]. В связи с этим актуальным является раннее выявление, своевременная диагностика и лечение детей с предраковыми состояниями и изменениями слизистой оболочки желудка.

На сегодняшний день не существует исследований, проведенных для изучения иммунного ответа в отношении *H. pylori* – инфекции, которые нашли отражение в зарубежной литературе. Однонуклеотидные полиморфизмы в некоторых генах, кодирующих цитокины, изменяют экспрессию цитокинов в сыворотке крови и могут влиять на клинический исход инфекции *H. pylori* [1]. Полиморфизмы, которые приводят к повышению уровня IL-1 β и TNF α , а также полиморфизмы, вызывающие снижение экспрессии IL-1RA, вызывают более тяжелое воспаление и связаны с повышенным риском развития атрофического гастрита и рака желудка [9].

Данные об особенностях производства провоспалительных цитокинов в сыворотке крови у детей мало представлены в научной литературе. По некоторым данным, у детей, как и у взрослых, наблюдается преобладание иммунного ответа на *H. pylori* с участием Th1 с выработкой соответствующих цитокинов [10]. По другим данным, цитокиновый ответ в крови на *H. pylori* у детей может быть ниже, чем у взрослых [4]. Это может защитить детей от развития тяжелых заболеваний желудочно-кишечного тракта, таких как язва желудка. Несколько исследований показали увеличение местной продукции IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-18 и IFN- γ у детей, инфицированных *H. pylori*, по сравнению с неинфицированными детьми. При этом увеличения производства IL -4 не произошло [1].

Инфекция *H. pylori* поражает всю слизистую желудка и ДПК из-за наличия в этом микроорганизме различных патогенных факторов. Инфекция *H. pylori* является хронической, при которой наблюдается выработка IFN- γ , IL-12, IL-18, IL-23, TNF- α . Развитие воспалительных и иммунных реакций приводит к увеличению продукции провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-8, TNF- α , IFN- γ , местная продукция цитокинов в сыворотке крови может служить маркером инфекции *H. pylori*, плотности микробной колонизации и тяжести заболевания. Иммунный ответ на инфекцию *H. pylori* у детей является более ранним патологическим ответом и может служить своеобразной моделью для изучения характера течения *H. pylori*. В условиях Республики Узбекистан такие исследования не проводились, в то же время тенденция к набору веса, омоложению и высокая частота осложнений диктуют необходимость изучения данного вопроса.

Цель исследования

Изучение клинической и прогностической значимости полиморфизма rs1800629 (G-308A) гена TNF у детей с гастродуоденальной патологией в зависимости от инфицирования *H. pylori*.

Материалы и методы

Обследовано 182 ребенка в возрасте от 7 до 18 лет с гастродуоденальной патологией. Из них 98 (53,8%) больных с HP ассоциированной патологией и 84 (46,2%) больных с HP отрицательной патологией гастродуоденальной зоны. Возраст больных составлял от 7 до 18 лет, в том числе мальчиков – 79 (43,4%), девочек – 103 (56,6%). У 28 (15,4%) из них была диагностирована язвенная болезнь, у 154 (84,6%) диагностирован хронический гастродуоденит.

Определение полиморфизма **rs1800629 (G-308A) гена TNF**

Выделение ДНК

Материалом для выделения ДНК была венозная кровь объемом 3-5 мл (для забора крови использовались вакутайны Бектона-Дикинсона) с антикоагулянтом/консервантом 15% цитратом калия, ЭДТА (этилендиан-тетрауксусная кислота). Для получения геномной ДНК был использован двухэтапный метод лизиса клеток крови.

Методы выявления аллельных вариаций генов

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на тепловом цикле Rotor-Gene-2000 (CorbettResearch) с использованием соответствующих праймеров и 10 мкл ПЦР-смеси (производитель «NPO Lyteh»), содержащей 2 мм MgCl₂, ДНК-полимеразу Taq и «Cresolred».

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакетов статистического программного обеспечения и ряда формул.

В медицинской статистике общеприняты следующие показатели:

1. Расчет частоты генов у здоровых и больных людей осуществляется по формуле отношения числа определенного аллеля к удвоению общего числа особей в выборке. генную частоту встречаемости отдельных специфичностей TNF α у здоровых и больных рассчитывали по формуле:

$GF = \frac{a}{2 \cdot n}$ где: а – число аллелей в исследовании, n – число лиц, в фенотипе которых присутствует вариант гена.

2. Основным показателем для гаплотипов является неравновесие связей.

3. Частота генов определяется с учетом закона Харди-Вайнберга для биаллелевой системы. Значение χ^2 , превышающее 3,841 (что соответствует $p < 0,05$), считается показателем значимости.

Результаты и обсуждение

Ген TNF- α расположен на коротком плече 6-й хромосомы в области p21.3 и содержит 4 экзона. Имеются данные о взаимосвязи полиморфизма гена TNFA с количеством его продукции. Учеными выявлены несколько SNP гена TNFA: -1031T/C, -863C/A и -857C/A, -308G/A и -238G/A. Среди них наиболее изучены два полиморфных варианта гена TNFA: -238G/A -308G/A, имеющие разнонаправленное влияние на продукцию данного цитокина: в положении -308 замена гуанина на аденин способствует повышению продукции цитокина TNF- α .

При сравнительном изучении распределения частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров гена TNF α -308G/A в группе детей с H.pilory позитивной гастроудоденальной патологией и в контроле установлено статистически значимое увеличение частоты А аллеля у больных по сравнению с контрольной группой (35,16% и 8,42% соответственно; OR = 4,64; 95% CI: 2.573 > 4.64 > 8.368; $\chi^2=29,255$). В тоже время G аллель исследуемого полиморфизма встречался значительно реже по сравнению с контрольной группой (82,42% и 91,58% соответственно; OR = 0,216; 95% CI: 0.119 > 0.216 > 0.389; $\chi^2=29,255$) (табл.1).

При сравнительном анализе генотипов TNF- α -308 G/A по GG генотипу были выявлены достоверные различия между больными с HP и контрольной группой (64,84% и 83,16% соответственно; OR = 0,373; 95% CI: 0.188 > 0.373 > 0.743; $\chi^2=8,15$). При анализе гетерозиготного генотипа GA были выявлены различия между частотой встречаемости у больных с HP и контрольной группой (35,16% и 16,84% соответственно; OR = 2,678; 95% CI: 1.345 > 2.678 > 5.33; $\chi^2=8,15$). Как уже было описано выше, была обнаружена достоверная разница в частоте встречаемости аллеля А, исследуемого полиморфизма TNF- α -308G/A, но при генотипическом анализе гомозиготного AA генотипа не выявлено.

Таблица 1.

Распределение аллелей и генотипов TNF- α rs1800629 в группе детей с H.pilory позитивной гастроудоденальной патологией

Генотип	Пациенты n=91		Генотип	Контроль n=95		χ^2	OR (95% CI)
	n	%		n	%		
G	150	82,42	G	174	91,58	29,255	0,119 > 0,216 > 0,389
A	64	35,16	A	16	8,42		2,573 > 4,64 > 8,368
GG	59	64,84	GG	79	83,16	8,15	0,188 > 0.373 > 0,743
GA	32	35,16	GA	16	16,84	8,15	1.345 > 2.678 > 5.33
AA	0	0,00	AA	0	0,00		0.119 > 0.216 > 0.389

Примечание: χ^2 – показатель достоверности по Пирсону; OR– относительный риск;

При изучении распределения частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров гена TNF- α -308G/A в группе детей с H.pilory негативной гастроудоденальной патологией и в контроле установлено статистически значимое увеличение частоты А аллеля у больных по сравнению с контрольной группой, как и в группе больных с HP (21,35% и 8,42% соответственно; OR = 2,599; 95% CI: 1.395 > 2.599 > 4.843; $\chi^2=9,515$). В тоже время G аллель исследуемого полиморфизма встречался значительно реже по сравнению с контрольной группой (89,33% и 91,58% соответственно; OR = 0,385; 95% CI: 0.206 > 0.385 > 0.717; $\chi^2=9,515$). При сравнительном анализе генотипов TNF α -308G/A по

GG генотипу не были выявлены достоверные различия между больными без HP и контрольной группой – 78,65% и 83,16%, соответственно; OR = 0,746; 95% CI: 0.356 > 0.746 > 1.562; $\chi^2=0,6$). При анализе гетерозиготного генотипа GA также не были выявлены различия между частотой встречаемости у больных без HP и контрольной группой (21,35% и 16,84% соответственно; OR = 1,34; 95% CI: 0.64 > 1.34 > 2.80; $\chi^2=0,6$). Как уже было описано выше, была обнаружена достоверная разница в частоте встречаемости аллеля А, исследуемого полиморфизма TNF- α -308G/A, но при генотипическом анализе гомозиготного AA генотипа не выявлено (табл.2).

Таблица 2.

Распределение аллелей и генотипов TNF- α rs1800629 в группе детей с *H. pylori* негативной гастродуоденальной патологией

Генотип	Пациенты n=91		Генотип	Контроль n=95		χ^2	OR (95% CI)
	n	%		n	%		
G	159	89,33	G	174	91,58	9,515	0.206 >0.385> 0.717
A	38	21,35	A	16	8,42		1.395 >2.599> 4.843
GG	70	78,65	GG	79	83,16	0.606	0.356 >0.746> 1.562
GA	19	21,35	GA	16	16,84	0.606	0.64 >1.34> 2.80
AA	0	0,00	AA	0	0,00		

Примечание: χ^2 - показатель достоверности по Пирсону; OR – относительный риск;

После проведения анализа распределения аллелей и генотипов в группах больных с НР инфекцией и без наличия НР инфекции в сравнении с контрольной группой, был проведен анализ между двумя группами больных.

При анализе распределения частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров гена TNF- α -308G/A в группах больных было выявлено статистически значимое

увеличение частоты А аллеля у больных с НР по сравнению с больными без НР, (35,16% и 21,35%, соответственно; OR = 1,785; 95% CI: 1.128 >1.785> 2.826; $\chi^2=6,197$). G аллель исследуемого полиморфизма встречался значительно реже в группе с НР инфекцией по сравнению с группой без сопутствующей данной инфекции (82,42% и 89,33% соответственно; OR =0,56; 95% CI: 0.354> 0.56> 0.887; $\chi^2=6,197$) (табл. 3).

Таблица 3.

Распределение аллелей и генотипов TNF- α rs1800629 в группе детей с *H. pylori* с позитивной и негативной гастродуоденальной патологией

Генотип	Пациенты n=91		Генотип	Контроль n=95		χ^2	OR (95% CI)
	n	%		n	%		
G	150	82,42	G	159	89,33	6,197	0,354 >0,56> 0,887
A	64	35,16	A	38	21,35		1,128>1,785> 2,826
GG	59	64,84	GG	70	78,65	4,23	0,257 >0,5> 0,973
GA	32	35,16	GA	19	21,35	4,23	1,028>1,998> 3,885
AA	0	0,00	AA	0	0,00		

Примечание: χ^2 - показатель достоверности по Пирсону; OR – относительный риск;

При сравнительном анализе генотипов TNF α -308G/Апо GG генотипу не были выявлены достоверные различия между больными с наличием НР инфекции и без НР (64,84% и 78,65% соответственно; OR =0,5; 95% CI: 0.257> 0.5> 0.973; $\chi^2=4,23$). Гетерозиготный генотип GA также выявлялся чаще у больных с НР, по сравнению с больными без НР и контрольной группой (35,16% и 21,35% соответственно; OR =1,99; 95% CI: 1.028> 1.998> 3.885; $\chi^2=4,23$). Гомозиготного AA генотипа не выявлено.

Заключение

Наличие генотипа GA TNF α rs1800629 является неблагоприятным прогностическим маркером в развитии *H. pylori* позитивной гастродуоденальной патологией.

GG генотип rs1800629 является протективным генотипом для гастродуоденальной патологии вне зависимости от наличия *H. pylori* инфекции.

Литература

1. Algood H.M., Cover T.L. Helicobacter pylori persistence: an overview of interactions between H. pylori and host immune defenses. Clin Microbiol Rev. -2016. -№ 19. -P. 597-613.
2. Garcia-Gonzalez M.A., Savelkoul P.H., Benito R., Santolaria S., Crusius J.B., et al. No allelic variant associations of the IL-1 and TNF gene polymorphisms in the susceptibility to duodenal ulcer disease. Int J Immunogenet. -2015. -№32. -P. 299-306.
3. Harris T.D., Buzby P.R., Babcock H, et al. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. Science. -2018. -Vol. 320. -№5872. -P. 106-1099.
4. Katagiri M., Asaka M., Kobayashi M., et al. Increased cytokine production by gastric mucosa in patients with Helicobacter pylori infection // J. Clin. Gastroenterol. - 1997. - Vol. 25, Suppl. 1. - P. S211-214/
5. Lee S.G., Kim B., Yook J.H., Oh S.T., Lee I., Song K. TNF/LTA polymorphisms and risk for gastric cancer/duodenal ulcer in the Korean population. Cytokine. -2014. -№ 28 -P. 75-82.
6. Malekzadeh R., Mohamadnejad M., Siavoshi F., Massarrat S. Treatment of Helicobacter pylori infection in Iran: low efficacy of recommended western regimens. Arch Iranian Med. -2014. -№7. -P. 1-8.
7. Ruzibakieva M., Aripova T., Azizova Z. et al. Interleukin-1 gene polymorphisms role in development of chronic glomerulonephritis and ESRD. European Journal of pharmaceutical and medical research. -2019 -Vol. 6. -№6. -P.300-303.
8. Suerbaum S., Michetti P, Helicobacter pylori infection. N Engl J Med. -2012. Vol. 347. №15. -P. 1175-86. doi: 10.1056/NEJMra020542. PMID: 12374879.
9. Watari J., Chen N., Amenta P.S., Fukui H., Oshima T., Tomita T., Miwa H., Lim K.J., Das K.M. Helicobacter pylori associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. World J Gastroenterol. -2014. -Vol. 20 №18. -P. 5461-73. doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5461. PMID: 24833876; PMCID: PMC4017061.
10. Xuan J., Deguchi R., Watanabe S. et al. Relationship between IL-1 β gene polymorphism and gastric mucosal IL-1 β levels in patients with Helicobacter pylori infection. J Gastroenterol. -2015. №40. -P. 796-801. <https://doi.org/10.1007/s00535-005-1630-z>

Автор-корреспондент:

Абдужабарова Зулфия Муратходжаевна – д.м.н., доцент кафедры педиатрии Центра развития профессиональной квалификаций медицинских работников.

E-mail: zulfiya.m@mail.ru