

Изучение роли полиморфизмов генов цитокинов 511С>Т *IL1*, 174G>С *IL6*, 1082G>А *IL10* в развитии хронического панкреатита у русских жителей Центрального Черноземья

Самгина Т.А., Назаренко П.М., Лазаренко В.А., Животова Г.А., Полоников А.В.

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курск, Россия

Цель — изучить связь полиморфизмов (rs16944) гена интерлейкина-1, (rs1800795) гена интерлейкина-6, (rs1800896) гена интерлейкина-10 с развитием хронического панкреатита (ХП) в русской популяции. Материалом для исследования послужили 365 образцов ДНК, полученных от 233 больных с ХП и 132 относительно здоровых индивидов. Генотипирование полиморфизмов изучаемых генов выполнено с помощью метода ПЦР с дискриминацией аллелей с помощью TaqMan-зондов. В рамках настоящего исследования установлено, что генотип 511СТ *IL1* (OR = 1,58 95%CI 1,01–2,48, p = 0,04) и генотип 1082GA *IL10* (OR = 1,58 95%CI 1,03–2,42, p = 0,04) были ассоциированы с повышенным риском развития ХП. Комбинации генотипов *IL1* и *IL6* – 511ТТх174GC (OR = 0,46, 95%CI 0,22–0,98, p = 0,04), *IL1* и *IL10* – 511ССх1082АА (OR = 0,19 95%CI 0,07–0,50, p = 0,0002) и 511ТТх1082GG (OR = 0,41 95%CI 0,17–0,96, p = 0,04); *IL6* и *IL10* – 174GGх1082GG (OR = 0,42, 95%CI 0,19–0,93, p = 0,03), напротив, свидетельствовали о низком риске развития заболевания.

Ключевые слова: хронический панкреатит, полиморфизм генов (rs16944) интерлейкина-1, (rs1800795) интерлейкина-6, (rs1800896) интерлейкина-10.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Study of the role of cytokine genes polymorphisms 511C> T *IL1*, 174G> C *IL6*, 1082G> A *IL10* in the development of chronic pancreatitis in residents of Central Russia

Samgina T.A.¹, Nazarenko P.M.¹, Lazarenko V.A.³, Zhivotova G.A.³, Polonikov A.V.²

Kursk State Medical University, 305000, Kursk, Russian Federation surgery.facultetskaya@mail.ru

The aim of the study was to assesses the relationship between the polymorphisms (rs16944) of the interleukin-1, (rs1800795) of the interleukin-6 and (rs1800896) of the interleukin-10 genes with the development of chronic pancreatitis (CP) in the Russian population. Peripheral venous blood samples were obtained from 233 patients with CP and 132 healthy individuals. Genotyping of polymorphisms of the studied genes was carried out using the PCR method with discrimination of alleles with the TaqMan probes. Was found: the genotype 511CT *IL1* (OR = 1,58 95%CI 1,01–2,48, p = 0,04) and the genotype 1082GA *IL10* (OR = 1,58 95%CI 1,03–2,42, p = 0,04) were associated with an increased risk of developing chronic pancreatitis. Combinations of genotypes *IL1* and *IL6* – 511ТТх174GC (OR = 0,46, 95%CI 0,22–0,98, p = 0,04), *IL1* and *IL10* – 511ССх1082АА (OR = 0,19 95%CI 0,07–0,50, p = 0,0002) and 511ТТх1082GG (OR = 0,41 95%CI 0,17–0,96, p = 0,04); *IL6* and *IL10* – 174GGх1082GG (OR = 0,42, 95%CI 0,19–0,93, p = 0,03), on the contrary, were associated with low risk of the disease.

Key words: chronic pancreatitis, polymorphism of genes (rs16944) of interleukin-1, (rs1800795) interleukin-6, (rs1800896) interleukin-10.

Введение

В основе развития хронического панкреатита (ХП) лежит рецидивирующее воспаление поджелудочной железы (ПЖ), приводящее к прогрессирующей атрофии железистой ткани органа, замещению соединительной тканью клеточных элементов паренхимы, поражению протоков, болевому синдрому и потере экзо- и эндокринной функций железы. Важнейшую роль в патогенезе хронического панкреатита играет сочетание деструкции ацинарного аппарата с прогрессирующим хроническим воспалительным процессом, сопровождающимся выбросом цитокинов и приводящим к замещению паренхимы органа соединительной тканью [1, 2].

Провоспалительные цитокины интерлейкин-1 (ИЛ-1) и фактор некроза опухолей альфа (ФНО-α) вызывают образование на внутренней оболочке стенки сосудов очагов адгезии лейкоцитов, которые проникая через сосудистую стенку, стимулируют синтез и выделение лейкоцитами и эндотелиальными клетками интерлейкинов 6 и 8 (ИЛ-6 и ИЛ-8), и тем самым активируют клетки на продукцию медиаторов воспаления (лейкотриенов, гистамина, простагландинов, оксида азота и других) [3]. ИЛ-6 — основной медиатор ответа белков острой фазы воспаления, его уровень отражает активность всех провоспалительных цитокинов [4–6]. Нарушение продукции ИЛ-1 может служить одним из звень-

ев патогенеза ХП в связи с потенцированием фиброгенеза [7]. Интерлейкин-10 (ИЛ-10) относится к группе противовоспалительных цитокинов и является ингибитором активности Т-хэлперов 1 типа, функция его состоит в угнетении синтеза цитокинов и в снижении активности макрофагов, в том числе продукции провоспалительных цитокинов [3].

В связи с повышенным интересом к изучению генетических аспектов патогенеза хронического панкреатита в мире и малым количеством работ по изучению в русской популяции целью настоящего исследования было изучение роли полиморфизмов генов цитокинов 511С>Т *IL1*, 174G>С *IL6*, 1082G>А *IL10* в развитии ХП у жителей Центральной России.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 365 образцов ДНК, полученных от 233 больных с хроническим панкреатитом и 132 относительно здоровых индивидов. Все пациенты были русскими, проживающими на территории Центральной России (преимущественно Курской области) и неродственными друг другу. Больные ХП (186 женщин и 47 мужчин) находились на стационарном лечении в хирургических отделениях города Курска по поводу желчнокаменной болезни в период с 2012 по 2015 гг. и не имели в анамнезе острого панкреатита. Средний возраст больных составил $58,9 \pm 12,1$ года, здоровых лиц — $57,8 \pm 12,5$ года. Контрольная группа формировалась в ходе профилактиче-

ских осмотров на предприятиях и государственных учреждениях, а также в стационарах ЛПУ г. Курска. В контрольную группу включали пациентов (93 женщины и 39 мужчин), не имеющих заболеваний желудочно-кишечного тракта и хронической патологии других органов и систем. Исследование одобрено биоэтическим комитетом КГМУ, все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

У всех обследуемых проводился забор венозной крови для проведения молекулярно-генетических исследований. Геномную ДНК выделяли стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфизмов (rs16944) гена *IL1*, (rs1800795) гена *IL6*, (rs1800896) гена *IL10* проводилось методом ПЦР в режиме реального времени путем дискриминации аллелей с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием протоколов, опубликованных в литературе [8]. С целью проверки качества генотипирования 10% проб было выбрано случайным образом с целью повторного генотипирования, полученные результаты не отличались от первоначальных. Для оценки ассоциаций аллелей и генотипов изучаемых полиморфизмов генов с риском развития ХП использовали критерий χ^2 и отношение шансов (OR) с 95%-ными доверительными интервалами (CI). Статистический анализ осуществлялся с использованием программы Statistica 6,0 («StatSoft», США). Уровень статистической значимости принимали при $p < 0,05$.

Таблица

Частоты аллелей и генотипов полиморфизмов 511С>Т (rs16944) гена *IL1*, 174G>С (rs1800795) гена *IL6*, 1082G>А (rs1800896) гена *IL10* в группах больных хроническим панкреатитом и здоровых лиц

Генотипы/ аллели	Больные ОП (n = 233)		Здоровые лица (n = 132)		χ^2 (p)	OR (95%CI)
	n	%	n	%		
511CC	91	39,1	55	41,7	0,24 (0,62)	1,11 (0,72-1,72)
511CT	101	43,3	43	32,6	4,09 (0,04)	1,58 (1,01-2,48)
511TT	41	17,6	34	25,8	3,44 (0,06)	0,62 (0,37-1,03)
511C	0,607		0,580		0,54 (0,46)	0,89 (0,66-1,21)
511T	0,393		0,420			
174GG	54	23,2	32	24,2	0,05 (0,82)	1,06 (0,64-1,75)
174GC	112	48,1	69	52,3	0,60 (0,44)	0,85 (0,55-1,30)
174CC	67	28,8	31	23,5	1,19 (0,27)	1,32 (0,80-2,15)
174G	0,472		0,504		0,68 (0,41)	1,14 (0,84-1,54)
174C	0,528		0,496			
1082GG	64	27,5	44	33,3	1,39 (0,24)	1,32 (0,83-2,10)
1082GA	134	57,5	61	46,2	4,32 (0,04)	1,58 (1,03-2,42)
1082AA	35	15,0	27	20,5	1,76 (0,18)	0,69 (0,39-1,20)
1082G	0,562		0,564		0,01 (0,95)	1,01 (0,74-1,37)
1082A	0,438		0,436			

Результаты

Частоты аллелей и генотипов полиморфизмов 511C>T (rs16944) гена *IL1*, 174G>C (rs1800795) гена *IL6*, 1082G>A (rs1800896) гена *IL10* представлены в таблице. Генотипы исследуемых полиморфизмов находились в соответствии с распределением Харди—Вайнберга ($p > 0,05$). Как видно из таблицы, генотип 511CT *IL1* (OR = 1,58 95%CI 1,01—2,48, $p = 0,04$) и генотип 1082GA *IL10* (OR = 1,58 95%CI 1,03—2,42, $p = 0,04$) были ассоциированы с повышенным риском развития ХП.

Статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов полиморфизмов 174G>C гена *IL6* не установлено.

Анализ ассоциации парных сочетаний генотипов позволил установить, что комбинации генотипов *IL1* и *IL6* — 511TTx174GC (OR = 0,46, 95%CI 0,22—0,98, $p = 0,04$), *IL1* и *IL10* — 511CCx1082AA (OR = 0,19 95%CI 0,07—0,50, $p = 0,0002$) и 511TTx1082GG (OR = 0,41 95%CI 0,17—0,96, $p = 0,04$); *IL6* и *IL10* — 174GGx1082GG (OR = 0,42, 95%CI 0,19—0,93, $p = 0,03$) ассоциированы с пониженным риском развития ХП.

Обсуждение

Изучению роли полиморфизмов генов цитокинов в развитии заболеваний желудочно-кишечного тракта посвящено большое количество работ, основная часть их связана с острым панкреатитом [9—11].

Однако известно, что важнейшую роль в патогенезе ХП играет сочетание деструкции ацинарного аппарата с прогрессирующим хроническим воспалительным процессом, сопровождающимся выбросом цитокинов и приводящим к замещению паренхимы органа соединительной тканью.

Исследуя влияние генов цитокинов на развитие ХП у 100 пациентов, Sri Manjari K с соавт. обнаружили повышенный уровень *TNF-α* у носителей аллеля А полиморфизма 308G/A гена *TNF-α* [12]. Однако Talar-Wojnagowska R с соавт. не обнаружили ассоциаций между уровнем интерлейкинов в плазме и полиморфизмами генов 308G/A *TNFα* и 874A/T *INFγ* у 56 пациентов с ХП, 41 с аденокарциномой ПЖ и 50 здоровых индивидов [13].

В рамках настоящего исследования установлено, что генотип 511CT *IL1* (OR = 1,58 95%CI 1,01—2,48, $p = 0,04$) и генотип 1082GA *IL10* (OR = 1,58 95%CI 1,03—2,42, $p = 0,04$) были ассоциированы с повышенным риском развития ХП. Комбинации генотипов *IL1* и *IL6* — 511TTx174GC (OR = 0,46, 95%CI 0,22—0,98, $p = 0,04$), *IL1* и *IL10* — 511CCx1082AA (OR = 0,19 95%CI 0,07—0,50, $p = 0,0002$) и 511TTx1082GG (OR = 0,41 95%CI 0,17—0,96, $p = 0,04$); *IL6* и *IL10* — 174GGx1082GG (OR = 0,42, 95%CI 0,19—0,93, $p = 0,03$), напротив, свидетельствовали о низком риске развития заболевания.

Поскольку генотип AA ассоциирован с низким синтезом ИЛ-10, а генотипы GA и GG связаны с умеренной и высокой продукцией, соответственно, можно ожидать снижения иммунологической защиты на локальном уровне при наличии мутации в гене ИЛ-10.

Известно, что уровень ИЛ-6 в сыворотке крови выше у носителей генотипа GG (mean 2209 pgmL(-1)), ниже у носителей генотипа CG (mean 1113 pgmL(-1)) и самый низкий у носителей генотипа CC (mean 256 pgmL(-1)). Мутантный С-аллель коррелирует с низким уровнем ИЛ-6 в сыворотке крови [14], тогда как наличие Т-аллеля в промоторе гена *IL1* сопряжено с избыточной продукцией цитокина [15, 16].

Проведенное нами изучение вклада полиморфизмов генов цитокинов 511C>T *IL1*, 174G>C *IL6*, 1082G>A *IL10* в развитие ХП у русских жителей позволило выявить ассоциации генотипов и комбинаций генотипов полиморфизмов с развитием заболевания.

Таким образом, полученные нами результаты, свидетельствуют о повышенном риске развития ХП у носителей генотипа 511CT гена *IL1*, генотипа 1082GA гена *IL10*, которые показали преимущества проявления провоспалительного эффекта в гетерозиготном состоянии, эффект сверхдоминирования в сравнении с гомозиготным. Комбинации генотипов *IL1* и *IL6* — 511TTx174GC (OR = 0,46, 95%CI 0,22—0,98, $p = 0,04$), *IL1* и *IL10* — 511CCx1082AA (OR = 0,19 95%CI 0,07—0,50, $p = 0,0002$) и 511TTx1082GG (OR = 0,41 95%CI 0,17—0,96, $p = 0,04$); *IL6* и *IL10* — 174GGx1082GG (OR = 0,42, 95%CI 0,19—0,93, $p = 0,03$), напротив, были протективными.

В перспективе с практической точки зрения данные генетического тестирования полиморфизмов генов *IL1*, *IL6*, *IL10* можно будет использовать для формирования среди населения, а также членов семей, отягощенных развитием панкреатита, группы риска развития болезни и проведения необходимых профилактических мероприятий по ее предупреждению, а также при проведении генетического контроля цитокинового статуса в процессе развития ХП с целью оптимизации иммунорекции, варианты которой определяются индивидуально в зависимости от клинико-лабораторных показателей и генетического статуса пациента.

Список литературы

1. URL: <http://общество-хирургов.рф/stranica-pravlenija/unkr/>.
2. Goh K L Chronic pancreatitis: aetiology, epidemiology and clinical presentation. *Med j malaysia*. 2005;60(suppl b): 94-98.
3. Синенченко ГИ, Пивоварова ЛП, Шилиев АВ и др. Прогностические критерии тяжести острого деструктивного панкреатита. *Вестн. Рос. военно-мед. Академии*. 2007; 1(17):100-105.
4. Biffi W, Moore E, Moore F et al. Interleukin-6 in the injured patient. *Ann. Surg.* 1996; 224: 647-664.
5. Castell JV, Gomes-Lechon MJ, David M et al. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein in synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett.* 1989;242: 237-239.

6. Opal S, De Palo V. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000; 1(17):1162-1172.
7. Heath D, Cruickshank A, Gudgeon M et al. Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response potential as early means of severity assessment in acute pancreatitis. *Gut*. 1993;34(1):41-45.
8. Koressar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 2007;23:1289-1291.
9. Самгина ТА, Животова ГА, Полоников А.В. Роль полиморфизмов генов цитокинов в развитии острого панкреатита: анализ межгенных и генно-средовых взаимодействий. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2017;27(3):27-33.
10. La Rusch J, Whitcomb DC. Genetics of pancreatitis. *Curr. Opin. Gastroenterol*. 2011;(27):467-474.
11. Yin YW, Sun QQ, Feng JQ et al. Influence of interleukin gene polymorphisms on development of acute pancreatitis: asystematic review and meta-analysis. *Mol. Biol. Rep*. 2013;40(10):5931-5941.
12. Sri Manjari K, Jyothy A, Shravan Kumar P et al. A single-nucleotide polymorphism in tumor necrosis factor- α (-308 G/A) as a biomarker in chronic pancreatitis. *Gene*. 2014; 539(2):186-189.
13. Talar-Wojnarowska R, Gasiorowska A, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H et al. Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma genes polymorphisms and serum levels in pancreatic adenocarcinoma. *Neoplasma*. 2009;56(1):56-62.
14. Tischendorf JJ, Yagmur E, Scholten D et al. The interleukin-6 (IL6)-174 G/C promoter genotype is associated with the presence of septic shock and the ex vivo secretion of IL6. *Int. J. Immunogenet*. 2007;34(6):413-418.
15. Ferri C, Sciacca FL, Grimaldi LME et al. Lack of association between IL1A and IL1B promoter polymorphisms and multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*,2000;69:564-565.
16. Furuta T, EL-Omar EM, Xiao F et al. Interleukin 1 beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology*,2002;123(1):92-105.