

УДК 616.366-003.7

## ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИЙ КОМБИНАЦИЙ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ С ФОРМИРОВАНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО КАЛЬКУЛЕЗНОГО ХОЛЕЦИСТИТА

Черкашина О.В.

*ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ») (Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85) e-mail: info@bsu*

Анализ связи сочетаний генетических полиморфизмов интерлейкинов с формированием хронического калькулезного холецистита (ХКХ) осуществлялся на выборке из 544 человек: 250 больных ХКХ и 294 человек популяционного контроля, являющихся уроженцами Центрального Черноземья России. Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 4-5 мл. Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществлялось методом фенольно-хлороформной экстракции. Выделенную ДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК. Установлено, что носительство аллеля -511Т IL-1В и генотипа -511ТТ IL-1В, а также комбинаций генетических маркеров: -889Т IL-1А, -511Т IL-1В и -113Т IL-9; -889Т IL-1А, -511Т IL-1В и -703С IL-5; 511Т IL-1В и -113Т IL-9; -889Т IL-1А и -511Т IL-1В; -511Т IL-1В и -703С IL-5; -174С IL-6 и -703ТС IL-5; -113ТТ IL-9 и -703С IL-5 обуславливает повышенный риск развития ХКХ. А наличие генотипа -511СС IL-1В и сочетания генетических вариантов -113М IL-9 и -703С IL-5 обладает протективным действием.

Ключевые слова: хронический калькулезный холецистит, желчнокаменная болезнь, интерлейкины

## STUDYING OF ASSOCIATIONS OF COMBINATIONS OF GENETIC OPTIONS INTERLEUKINOV WITH FORMATION OF CHRONIC KALKULEZNY CHOLECYSTITIS

Cherkashina O.V.

*"The Belgorod state national research university" ("BELGU'S" NIU) (Russia, 308015, Belgorod, Pobedy St., 85) e-mail: info@bsu*

The analysis of communication of combinations of genetic polymorphisms of interleykin to formation of the chronic kalkulezny of cholecystitis (CKC) was carried out on selection of 544 people: 250 sick HKH and 294 people of population control who are natives of the Central Chernozem region of Russia. As material for research the blue blood of 4-5 ml served. Allocation of genomic DNA from peripheral blood was carried out by method of phenolic and chloroformic extraction. The allocated DNA was used for carrying out polimerazny chain reaction of synthesis of DNA. It is established that a carriage аллеля - 511Т IL-1В and a genotype - 511ТТ IL-1В, and also combinations of genetic markers: - 889Т IL-1А, - 511Т IL-1В and - 113Т IL-9; - 889Т IL-1А, - 511Т IL-1В and - 703С IL-5; 511Т IL-1В and - 113Т IL-9; - 889Т IL-1А and - 511Т IL-1В; - 511Т IL-1В and - 703С IL-5; - 174С IL-6 and - 703ТС IL-5; - 113ТТ IL-9 and - 703С IL-5 causes the increased risk of development of HKH. And existence of a genotype - 511СС IL-1В and combinations of genetic options - 113М IL-9 and - 703С IL-5 possesses protective action.

Keywords: chronic kalkulezny cholecystitis, cholelithiasis, interleykina

Желчнокаменную болезнь (ЖКБ) принято считать одной из болезней XXI века. Исследование заболеваемости ЖКБ свидетельствует о том, что количество больных в мире каждое десятилетие увеличивается как минимум вдвое. В целом в Европе и других регионах мира ЖКБ выявляется у 10-40% населения различного возраста. В Северной Америке около 20-30 миллионов взрослого населения страдают ЖКБ. Только в Канаде ежегодно регистрируется около 130 тысяч обращений к врачу по поводу данного заболевания и проводится более 100 тысяч холецистэктомий, что в 6-7 раз больше, чем в Великобритании и Франции [3].

В России частота ЖКБ колеблется от 5 до 20%, а симптоматическая форма этого заболевания (хронический калькулезный холецистит – ХКХ) является наиболее распространенной причиной острой хирургической патологии. Каждый 10-ый мужчина и каждая 5-ая женщина страдают ЖКБ [2].

ЖКБ в настоящее время рассматривается как многофакторное и многостадийное заболевание. Существует целый ряд факторов, приводящих к образованию конкрементов в желчном пузыре и в желчных протоках: избыточная масса тела, возраст, женский пол, ятрогенные факторы и др. [1]. Значимую роль в формировании ЖКБ играют генетические факторы. В ряде иностранных исследований показана роль отдельных генетических полиморфизмов, участвующих в регуляции воспаления, клеточной пролиферации, метаболизма липидов и желчных кислот в формировании ЖКБ [5, 6]. Среди генов-кандидатов, регулирующих преимущественно процессы воспаления, важное значение имеют интерлейкины. Интерлейкины представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма. Им принадлежит важная роль в развитии и течении различных заболеваний, в том числе и органов пищеварения. Интерлейкины, взаимодействуя со специфическими рецепторами, являются одними из главных звеньев в воспалительном каскаде при ЖКБ, изменяя интенсивность и длительность воспалительных, склеротических и литогенных процессов в желчном пузыре [4].

**Цель исследования:** изучение роли сочетаний генетических полиморфизмов *-889T/C IL-1A*, *-511C/T IL-1B*, *-584C/T IL-4*, *-703C/T IL-5*, *-174G/C IL-6*, *-251A/T IL-8*, *-113T/M IL-9*, *-592C/A IL-10* в формировании ХКХ.

**Материалы и методы:** группу исследования составили 544 человека: 250 больных ХКХ и 294 человека популяционного контроля. В выборки больных и популяционного контроля включались индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья России и не имеющие родства между собой. Среди 250 больных ХКХ мужчин было 42 человека (16,80%), женщин – 208 (83,20%). В популяционной выборке (294 человека) распределение по полу было аналогичным: мужчины – 50 человек (17,00%), женщины – 244 (83,00%). Средний возраст больных составил  $54,66 \pm 13,08$  лет (варьировался от 23 до 85 лет), популяционной выборки –  $48,20 \pm 6,28$  лет (варьировался от 18 до 79 лет). Таким образом, группа популяционного контроля не отличалась от группы больных по полу, возрасту, национальности и месту рождения.

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 4-5 мл, взятая из локтевой вены пробанда. Забор венозной крови осуществлялся в пробирки с консервантом, содержащим 0,5М раствор ЭДТА (рН=8.0).

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществлялось методом фенольно-хлороформной экстракции в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови добавляли 25 мл лизирующего буфера, содержащего 320 мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10мМ трис-HCl (pH=7,6). Полученную смесь перемешивали и центрифугировали при 4°C, 4000 об./мин. в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли 4 мл раствора, содержащего 25 мМ ЭДТА (pH=8,0) и 75 мМ NaCl, ресуспензировали. Затем прибавляли 0,4 мл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10мг/мл) и инкубировали образец при 37°C в течение 16 часов.

На втором этапе из полученного лизата последовательно проводили экстракцию ДНК равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа с центрифугированием при 4000 об./мин. в течение 10 минут. После каждого центрифугирования производили отбор водной фазы. ДНК осаждали из раствора двумя объемами охлажденного 96% этанола. Сформированную ДНК растворяли в бидистиллированной, деионизованной воде и хранили при -20°C. Выделенную ДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

Генотипирование ДНК-маркеров производилось методом анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) продуктов ПЦР-амплификации специфических участков генома с использованием соответствующих ферментов рестрикции производства фирмы «Сибэнзим» (Новосибирск) (локусы -889T/C IL-1A, -511C/T IL-1B, -703C/T IL-5, -113T/M IL-9, -592C/A IL-10).

Генотипирование локусов -590C/T IL-4, -174G/C IL-6, -251A/T IL-8 осуществлялось методом детекции TagMan зондов по данным величин RFU (уровень относительной флуоресценции) каждого зонда на амплификаторе IQ5 с детектирующей системой в режиме реального времени. Для дискриминации аллелей использовалась программа «Bio-Rad IQ5-Standard Edition».

Ассоциации аллелей и генотипов с качественными признаками ХКХ оценивали с помощью показателя отношения шансов (OR).

Для сравнения частот аллелей и генотипов между различными группами использовали критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность.

С целью решения проблемы множественных сравнений, связанной с получением ложноположительных результатов (ошибка 1-го рода), использовали пермутационный тест.

### **Результаты**

При проведении сравнительного анализа распределения генетических полиморфизмов -889T/C IL-1A, -511C/T IL-1B, -584C/T IL-4, -703C/T IL-5, -174G/C IL-6, -251A/T IL-8, -113T/M IL-9, -592C/A IL-10 в исследуемых выборках установлена более высокая частота

аллеля *-511T IL-1B* (43,21%) и генотипа *-511TT IL-1B* (21,72%) и низкая концентрация генотипа *-511CC IL-1B* (35,29%) среди больных ХКХ по сравнению с контрольной группой, где анализируемые показатели составили 30,85% ( $\chi^2=14,43$ ,  $p=0,001$ ); 11,49% ( $\chi^2=7,95$ ,  $p=0,01$ ) и 49,79% ( $\chi^2=9,19$ ,  $p=0,003$ ) соответственно. Таким образом, наличие аллеля *-511T IL-1B* (OR=1,71) и генотипа *-511TT IL-1B* (OR=2,14) повышает риск развития хронического калькулезного холецистита, а наличие генотипа *-511CC IL-1B* является протективным фактором в формировании данной патологии (OR=0,55). По другим рассматриваемым генетическим полиморфизмам достоверных различий в частотах аллелей и генотипов не обнаружено ( $p>0,05$ ).

В результате анализа носительства комбинаций аллелей и генотипов исследуемых локусов интерлейкинов установлен ряд достоверных отличий больных от группы контроля. В формировании значимых сочетаний генетических вариантов, отличающих больных ХКХ от контрольной группы участвуют 5 полиморфизмов (*-889T/C IL-1A*, *-511C/T IL-1B*, *-703C/T IL-5*, *-174G/C IL-6*, *-113T/M IL-9*) из 8 рассмотренных.

Стоит отметить, что из восьми полученных сочетаний, имеющих ключевое значение для формирования ХКХ, семь определяют повышенный риск развития данного заболевания и лишь одно обладает протективным действием.

Установлено, что в формировании двух комбинаций, определяющих повышенный риск развития ХКХ, принимают участие по три генетических варианта исследуемых локусов интерлейкинов. Сочетания *-889T IL-1A*, *-511T IL-1B* и *-113T IL-9*; *-889T IL-1A*, *-511T IL-1B* и *-703C IL-5* наблюдаются у 63,37% и 62,84% больных ХКХ, тогда в группе контроля у 40,23% (OR=2,57; 95% CI 1,54-4,3) и 44,17% (OR=2,14; 95% CI 1,39-3,28) соответственно.

В состав оставшихся пяти комбинаций, являющихся факторами повышенного риска развития ХКХ, входят по два генетических маркера. Сочетания *-511T IL-1B* и *-113T IL-9*; *-889T IL-1A* и *-511T IL-1B* отмечаются у 65,37% и 62,67% пациентов с ХКХ, а в контрольной группе лишь в 43,82% (OR=2,42; 95% CI 1,45-4,02) и 47,19% (OR=1,88; 95% CI 1,29-2,74) случаев соответственно. Частота сочетаний *-511T IL-1B* и *-703C IL-5*; *-174C IL-6* и *-703TC IL-5*; *-113TT IL-9* и *-703C IL-5* среди больных ХКХ в 1,5 раз выше (64,52%; 35,27% и 74,49%), чем в группе контроля: 47,59% (OR=2,0; 95% CI 1,31-3,07); 24,0% (OR=1,73; 95% CI 1,12-2,66); и 55,32% (OR=2,35; 95% CI 1,22-4,56) соответственно.

Сочетание двух генетических маркеров *-113M IL-9* и *-703C IL-5*, которое наблюдается у 19,39% больных ХКХ и у 38,3% популяционного контроля, является протективным фактором развития данного заболевания (OR=0,39; 95% CI 0,2-0,77).

**Выводы:** обобщая полученные данные, можно заключить, что изученные полиморфные маркеры играют важную роль в развитии хронического калькулезного

холецистита. Причем наличие у пациентов аллеля *-511T IL-1B* и генотипа *-511TT IL-1B*, а также комбинаций генетических маркеров: *-889T IL-1A*, *-511T IL-1B* и *-113T IL-9*; *-889T IL-1A*, *-511T IL-1B* и *-703C IL-5*; *511T IL-1B* и *-113T IL-9*; *-889T IL-1A* и *-511T IL-1B*; *-511T IL-1B* и *-703C IL-5*; *-174C IL-6* и *-703TC IL-5*; *-113TT IL-9* и *-703C IL-5* обуславливает повышенный риск развития ХКХ. А наличие генотипа *-511CC IL-1B* и сочетания генетических вариантов *-113M IL-9* и *-703C IL-5* обладает протективным действием. Это согласуется с литературными данными, свидетельствующими о значимой роли генов интерлейкинов в патогенезе ХКХ.

### Список литературы

1. Григорьева И.Н. Основные факторы риска желчнокаменной болезни / И.Н. Григорьева // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.– 2007.– т.17.– № 6.– С.17-21.
2. Желчнокаменная болезнь / С.А. Дадвани с.- М.: Видар-М; 2000.- 315 с.
3. Ильченко А.А. Желчнокаменная болезнь / А.А. Ильченко.– М.: Анахарсис.– 2004.– 200 с.
4. Царегородцева Т.М. Цитокины при гастроэнтерологической патологии / Т.М. Царегородцева // Медицинская газета.- 2005.- № 63.– С. 3-4.
5. Beckingham I.J. ABC Of Liver, Pancreas and Gall Bladder // Edited by I.J. Beckingham.- BMJ Books, BMA House, Tavistock Square, London.- 2001. – P. 54.
6. Bellows C.F. Management of gallstones / C.F. Bellows, D.H. Berger, R.A. Crass // Am Fam Physician. – 2005. – V. 72(4). – P. 637 – 642.

### Рецензенты:

Чурносов М.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой медико-биологических дисциплин, медицинский факультет, ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород;

Сорокина И.Н., д.м.н., доцент, профессор, заведующий кафедрой медико-биологических дисциплин, медицинский факультет, ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород.