

УДК 616.36-002.2-08:612.017

*Ю.І. Бажора, О.М. Усиченко, К.М. Усиченко***КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОМБІНАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМУ
ГЕНІВ ЦИТОКІНІВ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ С**

Одеський національний медичний університет

Резюме. Обстежено 100 хворих на хронічний гепатит С віком від 18 до 62 років. У результаті проведеного дослідження встановлено зворотний кореляційний зв'язок між генотипами IL-4 і TNF α . Прямий кореляційний зв'язок виявлено між ступенем фіброзу і генотипами IL-4 з меншим ступенем фіброзу у носіїв генотипу CC та більшим у носіїв генотипу TT. Зворотний кореляційний зв'язок виявлено між ступенем фіброзу і геноти-

пами TNF α з меншим ступенем фіброзу в носіїв генотипу GG та більшим – у носіїв генотипу AA. Прямий кореляційний зв'язок відзначається між ступенем фіброзу і генотипами SMAD7 з меншим ступенем фіброзу в носіїв генотипу CC та більшим – у носіїв генотипу TT.

Ключові слова: хронічний гепатит С, поліморфізм генів, фіброз печінки.

Вступ. Актуальність проблеми хронічного гепатиту С (ХГС) пов'язана з його широкою розповсюдженістю, недостатньою ефективністю сучасної противірусної терапії, а також можливим розвитком цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми [6, 10, 15].

Відомо, що генетична неоднорідність вірусу гепатиту С і імуногенетичні особливості хазяїна зумовлюють гетерогенність імунної відповіді на HCV-інфекцію та відмінності перебігу і наслідків хвороби.

У зв'язку з цим триває пошук генетичних маркерів, що дозволяють прогнозувати стійку вірусологічну відповідь на противірусну терапію, а також на швидкість прогресування фіброзу печінки.

У роботах останніх років показано, що рівень продукції цитокінів та їх антагоністів, експресія рецепторів до різних цитокінів визначається індивідуально успадкованим набором алельних варіантів генів цитокінів та їх рецепторів [7, 9].

На думку багатьох дослідників, є певна асоціація поліморфізму генів цитокінів з варіантами перебігу ХГС, однак, результати вивчення такої асоціації нерідко суперечливі [6].

Вибір генів - кандидатів для вивчення значення їх поліморфізму в прогнозуванні наслідків ХГС визначається впливом певних цитокінів у патогенезі інфекційних і запальних процесів.

Особливий інтерес становить вивчення у хворих на ХГС транскрипційного контролю гена IL-10 як продукту Th2 клітин. IL-10 виконує основну роль у регуляції запальних реакцій і імунної відповіді, пригнічує синтез IFN γ , TNF α , IL-1, IL-2, IL-6 [6, 7]. Встановлено, що поліморфізм гена IL-10 у промоторних зонах 1082 G / A і 592 C / A впливає на перебіг ХГС [1,12].

Відомо, що IL-4 є провідним протизапальним цитокіном, обмежує поширеність і інтенсивність запалення, а також пригнічує синтез прозапальних цитокінів – IL-6, IL-8, IL-12, TNF α в макрофагах. Встановлено зв'язок поліморфних варіантів гена IL-4 (590 C / E) з морфологічними особливостями гепатиту С [3, 8].

TNF α -цитокін, який регулює процеси запалення, стимулює фагоцитарну, цитотоксичну

активність Th1, а також бере участь у регуляції апоптозу, індукує синтез прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6, IL-8. Крім того, він підвищує цитотоксичні властивості NK-клітин, продукцію ними IFN γ , який індукує диференціювання Т-клітин за Th1-шляхом [11].

У дослідженнях ряду авторів показана асоціація між прогресуванням фіброзу печінки і генетичного поліморфізму гена TNF α у промоторній зоні у хворих на ХГС [2, 13].

Цитокін TGF β 1 є найважливішим медіатором фіброгенезу і контролю апоптозу. Крім того, TGF β 1 пригнічує активність натуральних кілерів і продукцію IFN γ і IL-12. Зв'язування TGF β 1 з гетеродимерним рецептором веде до ініціації ряду сигнальних шляхів [18].

Дослідження з вивчення поліморфізму генів цитокінів у хворих на хронічні вірусні гепатити спрямовані на визначення механізмів взаємодії різних сигналів як результат поліморфізму не одного гена, спектра декількох генів. Одним із таких механізмів є BMP / SMAD сигнальний шлях [10].

Як зазначає В.Т. Івашкін, сучасний стан гепатології викликає необхідність вивчення ряду ключових шляхів регуляції проходження внутрішньоклітинних сигналів [4].

Встановлено, що білок SMAD7 належить до сімейства TGF-лігандів (трансформуючий фактор росту). SMAD7 бере участь у регуляції клітинної сигналізації, проліферації, диференціації та апоптозу клітин [14]. Встановлено, що SMAD7 транскрипційний фактор знаходиться в ядрі одного з найбільш мінливих цитокінів – трансформуючого фактора росту та є його найважливішим антагоністом [16].

В експерименті встановлено, що SMAD7 запобігає активації зірчастих клітин і фіброзу клітин печінки [17]. Модуляція BMP / SMAD7 сигнального шляху може бути використана для лікування вірусних інфекцій і надалі стати підставою для нових підходів до лікування HCV і HBV-інфекції, грипу тощо [19].

Мета дослідження. Визначити взаємозв'язок між поліморфізмом генів IL-4, IL-10, TNF α , SM-

AD family member 7 (SMAD7 C>T) у хворих на ХГС від ступеня фіброзу печінки.

Матеріал і методи. Обстежено 100 хворих на ХГС віком від 18 до 62 років, при цьому середній вік становив $42 \pm 3,08$ року. Всі обстежені хворі перебували на диспансерному спостереженні в гепатологічному центрі Одеської міської клінічної інфекційної лікарні. Пацієнти є жителями Одеського регіону, у групі дослідження чоловіків було 44 %, а жінок – 56 %. Давність захворювання становила не більше 10 років.

Контрольна група складена з 30 практично здорових осіб, середній вік яких $32 \pm 1,05$ року. Кількість жінок і чоловіків була однаковою (по 15 осіб).

Верифікація діагнозу ХГС включала: біохімічні тести (підвищення активності АсАТ і АлАТ, концентрація білірубину і переважання його прямої фракції), і серологічні маркери (НСV-IgM, якісне і кількісне визначення і РНК НСV методом ПЛР, генотипування вірусу).

Оцінка морфологічних змін у печінці (ступінь активності і виразність фібротичних змін) визначали за шкалою METAVIR з використанням неінвазивного методу Fibrotest. Оцінка ступеня фіброзу визначалася за рівнем таких показників, як альфа-2-макроглобулін, гаптоглобін, аполіпопротеїн А1, загальний білірубін, ГГТ, АлАТ і АсАТ.

Молекулярно-генетичні дослідження включали визначення поліморфних варіантів генів ІЛ-4 (С589Т), ІЛ-10 (G1082А), TNF α (G308А), SMAD family member 7 (SMAD7 C> T). Виділення ДНК проводилося за допомогою набору «ДНК-ЕКСПРЕС-кров» (НПФ «Літех», РФ). Поліморфізм генів вивчався за допомогою ампліфі-

кації відповідних ділянок геному методом ПЛР. Структура використаних праймерів і параметри температурних циклів описані в літературі і геномній базі даних. Дослідження проводилися на базі Німецького діагностичного центру ім. Св. Павла (м. Одеса) та лабораторії ФНКЦ фізико-хімічної медицини (м. Москва).

Розподіл генотипів за дослідженими поліморфними локусами перевіряли за допомогою критерію χ^2 Пірсона. Частоти алелів і генотипів у групах порівнювали із застосуванням критерію χ^2 Пірсона з поправкою Сйтса на безперервність при числі ступенів свободи – 1.

Результати дослідження та їх обговорення. При дослідженні алельного поліморфізму ІЛ-10 (G1082А), ІЛ-4 (С589Т), TNF α (G308А), SMAD family member 7 (SMAD7 C> T) виявлені суттєві відмінності в контрольній і досліджуваній групах хворих (рис. 1-4).

У здорових осіб значно переважав гомозиготний генотип СС ІЛ-4 (С589Т). У хворих на ХГС також зазначалося його переважання, але в значно меншому його ступені ($p < 0,05$, $\chi^2 = 4,77$). Крім того, у хворих на ХГС значно частіше виявлявся гетерозиготний генотип СТ ІЛ-4 (С589Т) ($p < 0,05$, $\chi^2 = 6,78$). У здорових осіб частота алеля С складала 0,9; алеля Т – 0,1, у хворих – відповідно 0,81 і 0,19.

У здорових осіб переважав гомозиготний генотип СС ІЛ-10 (1082G / А) ($p < 0,05$, $\chi^2 = 9,33$). При дослідженні поліморфізму ІЛ-10 (1082G / А) у хворих на ХГС встановлено переважання гетерозиготного алеля (комбінація Ga у 53 % хворих) ($p < 0,05$, $\chi^2 = 6,44$). У здорових осіб частота алеля G складала 0,6; алеля А - 0,4, у хворих – відповідно 0,46 і 0,54.

Таблиця 1

Характеристики досліджених поліморфізмів

Ген	Поліморфізм	Назва праймеру	Нуклеотидна послідовність
ІЛ-4	С589Т	rs2243250	5'-TAAACTTGGGAGAACATGGT-3'
ІЛ-10	G1082А	rs1800896	5'-CCT ATC CCT ACT TCC CCT-3'
TNF α	G308А	rs1800620	5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GC-3'
SMAD family member 7	(SMAD7 C>T)	rs4939827	TGTCTCTAATCCACCATGCTCAC

Таблиця 2

Кореляційні зв'язки між різними генотипами цитокінів і ступенем фіброзу печінки у хворих на хронічний гепатит С

	ІЛ 4	ІЛ 10	TNF	SMAD7	F
ІЛ 4	1	-0,005	-0,285**	0,17	0,501**
ІЛ 10	-0,005	1	0,023	0,10	0,059
TNF	-0,285**	0,023	1	-0,14	-0,392**
SMAD7	0,17	0,10	-0,14	1	0,393**
F	0,501**	0,059	-0,392**	0,393**	1

Примітка. * – статистично значущий зв'язок ($p < 0,05$), ** – статистично значущий зв'язок ($p < 0,01$)

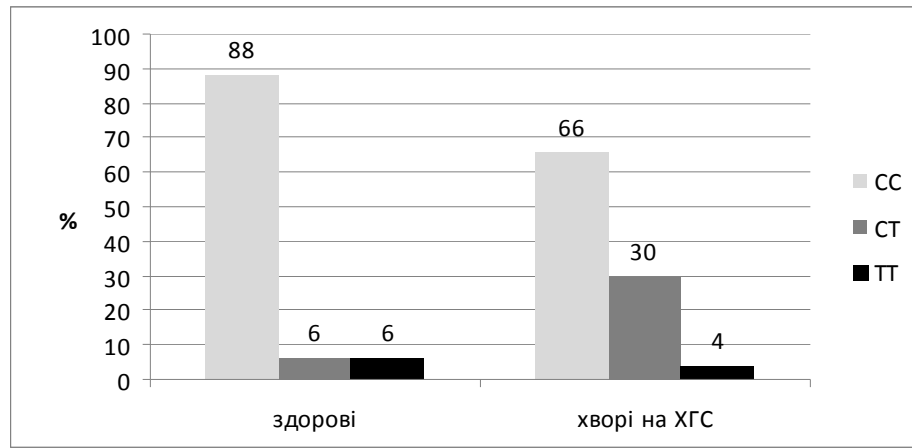


Рис. 1. Розподіл частот генотипів IL-4 (C589T) у хворих на хронічний гепатит С і здорових осіб

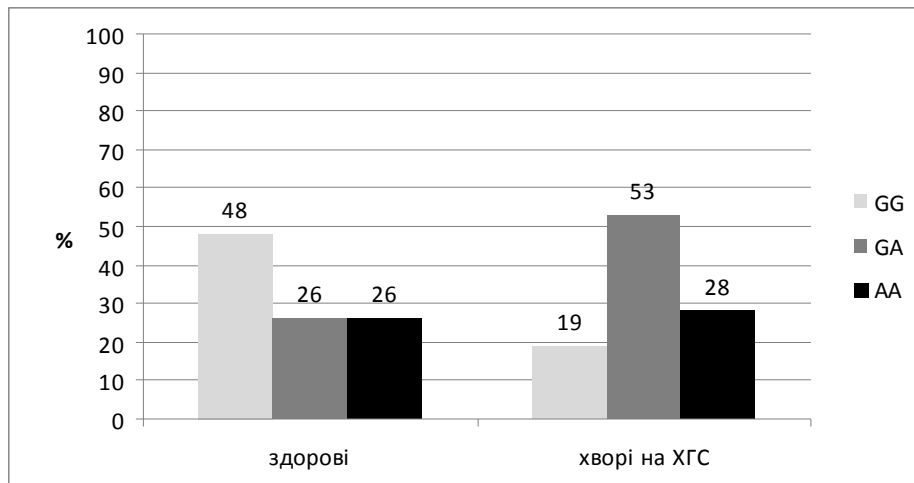


Рис. 2. Розподіл частот генотипів IL-10 (1082G / A) у хворих на хронічний гепатит С і здорових осіб

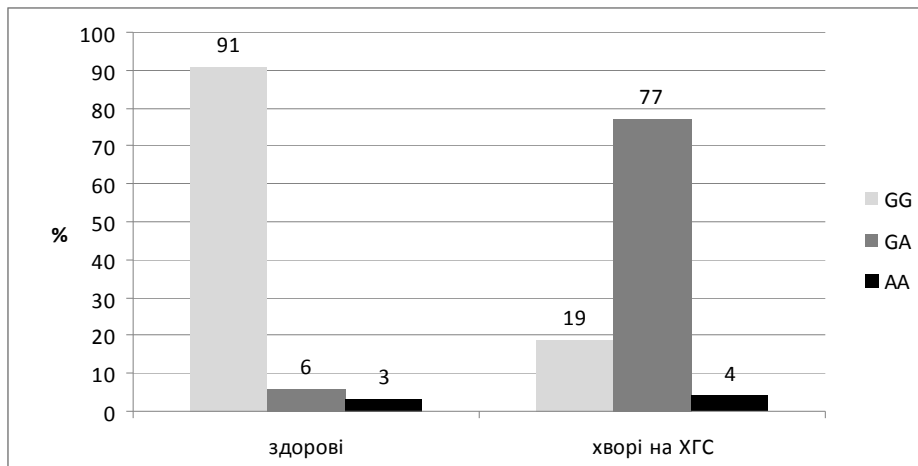


Рис. 3. Розподіл частот генотипів TNF α (G308A) у хворих на хронічний гепатит С і здорових осіб

При вивченні алельного поліморфізму TNF α (G308A) у контрольній групі виявлено переважання гомозиготного типу генотипу GG TNF α (G308A) у 91 % ($p < 0,05$, $\chi^2 = 50,88$). У хворих на ХГС зазначалося переважання гетерозиготного алеля GA (77 %) ($p < 0,05$, $\chi^2 = 47,88$). У здорових осіб частота алеля G складала 0,93; алеля А – 0,07, у хворих – 0,58 і 0,42, відповідно.

При вивченні алельного поліморфізму SMAD family member 7 (SMAD7 C>T) у контрольній

групі виявлено переважання гомозиготного типу генотипу CC SMAD7 у 50 % ($p < 0,05$, $\chi^2 = 88$). У хворих на ХГС зазначалося переважання гетерозиготного алеля СТ (56 %) ($p < 0,05$, $\chi^2 = 47,88$). У здорових осіб частота алеля С складала 0,6; алеля Т – 0,4, у хворих – відповідно 0,49 і 0,51.

Для оцінки асоціації ступеня змін печінкової тканини та алельного поліморфізму генів усі хворі були розподілені на три групи: з відсутнім або мінімальним фіброзом (F0-F1) – 46 %, помірним

фіброзом (F2) – 31 % і з виразним фіброзом (F3) – 23 %.

Взаємозв'язок фіброзних змін печінкової тканини та алельного поліморфізму досліджуваних генотипів оцінювали за допомогою коефіцієнта рангової кореляції Спірмена (табл. 2).

Встановлено наявність наступних кореляційних зв'язків:

- зворотний кореляційний зв'язок між генотипами IL-4 і TNF α , $p < 0,01$;

- прямий кореляційний зв'язок між ступенем фіброзу і генотипами IL-4, $p < 0,01$ (менший ступінь фіброзу відзначається у носіїв генотипу CC, більший ступінь фіброзу – у носіїв генотипу TT);

- зворотний кореляційний зв'язок між ступенем фіброзу і генотипами TNF α , $p < 0,01$ (менший ступінь фіброзу відзначається у носіїв генотипу GG, більший ступінь фіброзу – у носіїв генотипу AA);

- прямий кореляційний зв'язок між ступенем фіброзу і генотипами SMAD7, $p < 0,01$ (менший ступінь фіброзу відзначається у носіїв генотипу CC, більший ступінь фіброзу – у носіїв генотипу TT).

Висновки

1. У пацієнтів з гомозиготним генотипом CC IL-4 частіше виявляється гомозиготний генотип GG TNF α ($p < 0,01$).

2. Для пацієнтів із гомозиготним генотипом CC IL-4 характерні менші фіброзні зміни в печінці, ніж у носіїв гомозиготного генотипу TT ($p < 0,01$).

3. У пацієнтів із гомозиготним генотипом GG TNF α відзначається менший ступінь фіброзу печінки, ніж у носіїв гомозиготного генотипу AA ($p < 0,01$).

4. У пацієнтів із гомозиготним генотипом CC SMAD7 відзначається менший ступінь фіброзу печінки, ніж у носіїв гомозиготного генотипу TT ($p < 0,01$).

Перспективи подальших досліджень. Наявність взаємозв'язку ступеня фіброзу печінки і певних генотипів IL-4 SMAD7 і TNF α дозволяє використовувати отриману інформацію як один з критеріїв швидкості прогресування фіброзних процесів печінки. Комплексний підхід в обстеженні пацієнтів із ХГС дозволить скласти більш повноцінну картину про ступінь змін печінкової тканини.

Література

1. Анализ влияния генетических факторов вируса гепатита С и полиморфизма генов инфицированных людей на развитие фиброза печени / Л.И. Николаева, А.В. Колотвин, Л.М. Самоходка [и др.] // Эпидемиол. и инфекц. болезни. – 2012. – № 5. – С. 7-13.
2. Ассоциация полиморфных маркеров генов иммунной системы с количественными признаками, патогенетически значимыми для хронического вирусного гепати-

та / И.А. Гончарова, Е.В. Белобородова, М.Б. Фрейдin [и др.] // Молекуляр. биол. – 2008. – Т. 42, № 2. – С. 242-246.

3. Генетические факторы подверженности к хронизации вирусного гепатита и фиброзу печени / И.А. Гончарова, Е.В. Белобородова, М.Б. Фрейдin [и др.] // Молекуляр. биол. – 2008. – Т. 42, № 2. – С. 238-241.
4. Ивашкин В.Т. Иммуный гомеостаз и иммунные заболевания печени / В.Т. Ивашкин // РЖГГК. – 2009. – № 3. – С. 4-12.
5. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – СПб: ФОЛИАНТ, 2008. – С. 57-64.
6. Кучерявый Ю.А. Хронический гепатит, цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома – звенья одной цепи / Ю.А. Кучерявый, Н.Ю. Стукова, М.Л. Ахтаева // Клини. перспек. гастроэнтерол. гепатол. – 2012. – № 5. – С. 3-11.
7. Полиморфизм одиночных нуклеотидов в генах цитокинов и их рецепторов: биологический эффект и методы идентификации / Д.Д. Абрамов, И.А. Кофнади, К.В. Уткин [и др.] // Иммунология. – 2011. – № 5. – С. 275-278.
8. Прогноз предрасположенности человека к развитию вирусного гепатита С по полиморфизмам генов цитокинов G-308A, TNFA, T-330G IL-2, C-590T IL-4, -703T IL-5 и C-592A IL-10 / В.В. Авдошина, В.В. Дортман, В.И. Коненков [и др.] // Мед. иммунол. – 2006. – Т. 8, № 5. – С. 715-720.
9. Разработка методов для проведения широкомасштабных исследований полиморфизма генов, регулирующих различные компоненты иммунного ответа / И.В. Сергеев, М.Р. Хаитов, Д.Ю. Трофимов [и др.] // Физиол. и патол. иммун. системы. – 2009. – № 4. – С. 21.
10. Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С / В.Т. Ивашкин, Н.Д. Юшук, М.В. Маевская [и др.] // РЖГГК. – 2013. – № 23. – С. 41-70.
11. Хаитов Р.М. Иммунология: атлас / Р.М. Хаитов, А.А. Ярилин, Б.В. Пинегин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – С. 138-143.
12. Analysis of interleukin-10 gene polymorphisms and hepatitis C susceptibility in Pakistan / Muhammad Sohail Afzal, Sadia Tahir, Amna Salman [et al.] // J. Infect. Dev. Ctries. – 2011. – Vol. 5 (6). – P. 473-479.
13. Genome-wide association study identifies variants associated with progression of liver fibrosis from HCV infection / E. Patin, Z. Kutali, J. Guergnon [et al.] // Gastroenterology. – 2012. – Vol. 143. – P. 1244-1252.
14. Derynck R. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression / R. Derynck, R.J. Akhurst, A. Balmain // Nat. Genet. – 2001. – № 29. – P. 117-129.
15. Kanda T. Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma / T. Kanda, O. Yokosuka, M. Omata // Biology. – 2013. – Vol. 2. – P. 304-316.
16. Massagué J. Transcriptional control by the β /Smad signaling system / J. Massagué, D. Wotton // EMBO J. – 2000. – № 19. – P. 1745-1754.
17. Massague J. Smad transcription factors / J. Massague, J. Seoane, D. Wotton // Genes&Development. – 2005. – № 19. – P. 2783-2810.
18. Monika Rau. Host Genetic Variants in the Pathogenesis of Hepatitis C / Rau Monika, Baur Katharina, Geier Andreas // Viruses. – 2012. – № 4. – P. 3281-3302.
19. Pat. US2013012429 Unated States of America, Anti-viral therapy / Lucy Ann Eddowes, Narayan Ramamurthy, Paul Klenerman, Alexander Hal Drakesmith; заявл. 06.07.2011; опубл. 10.01.2013.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОМБИНАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С*Ю.И. Бажора, Е.М. Усыченко, Е.Н. Усыченко*

Резюме. Обследовано 100 больных хроническим гепатитом С в возрасте от 18 до 62 лет. В результате проведенного обследования установлена обратная корреляционная связь между генотипами IL-4 и TNF α . Прямая корреляционная связь выявлена между степенью фиброза и генотипами IL-4 с меньшей степенью фиброза у носителей генотипа CC и большей у носителей генотипа TT. Обратная корреляционная связь определена между степенью фиброза и генотипами TNF α с меньшей степенью фиброза у носителей генотипа GG и большей – у носителей генотипа AA. Прямая корреляционная связь отмечена между степенью фиброза и генотипами SMAD7 с меньшей степенью фиброза у носителей генотипа CC и большей – у носителей генотипа TT.

Ключевые слова: хронический гепатит С, полиморфизм генов, фиброз печени.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF CYTOKINE GENES POLYMORPHISM COMBINATION DETERMINATION IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C*Y.I. Bazhora, O.M. Usychenko, K.M. Usychenko*

Abstract. One hundred patients with chronic hepatitis C, aged 18 to 62 years were examined. As a result of the study we found an inverse correlation between genotypes of IL-4 and TNF- α . The direct correlation is found between the degree of fibrosis and IL-4 genotypes, with a lesser fibrosis degree in the CC-genotype carriers and higher in TT-genotype carriers. Reciprocal correlation between the degree of fibrosis and TNF- α genotypes with a lower degree of fibrosis in GG-genotype carriers and higher – in the AA-genotype carriers is revealed. Direct correlation is observed between the degree of fibrosis and SMAD7 genotypes with lower degree of fibrosis in CC-genotype carriers and higher in the TT-genotype carriers.

Key words: chronic hepatitis C, gene's polymorphism, liver fibrosis.

National Medical University (Odessa)

Рецензент – проф. В.Д. Москалюк

Buk. Med. Herald. – 2016. – Vol. 20, № 4 (80). – P. 7-11

Надійшла до редакції 13.11.2016 року