

УДК 575.113:616-002.5

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПОДВЕРЖЕННОСТИ К ХРОНИЗАЦИИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА И ФИБРОЗУ В ПЕЧЕНИ

© 2008 г. И. А. Гончарова<sup>1</sup>, Е. В. Белобородова<sup>2</sup>, М. Б. Фрейдин<sup>1</sup>,  
Э. И. Белобородова<sup>2</sup>, Г. Э. Черногорюк<sup>2</sup>, В. П. Пузырев<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского научного центра  
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Томск, 634050

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050

Поступила в редакцию 12.03.2007 г.

Принята к печати 12.11.2007 г.

Изучена ассоциация полиморфных маркеров С(-590)Т гена *IL4*, Ile50Val гена *IL4RA* и G(-308)А гена *TNF* со степенью хронизации вирусного гепатита, определяемой стадией фиброза печени. Показано, что частота аллеля А полиморфного маркера G(-308)А гена *TNF* в группе больных со слабой степенью фиброза выше (24.5%), чем в группе с умеренным и выраженным фиброзом (13.4%) и циррозом печени (8.7%). Частота гетерозиготного генотипа СТ полиморфного маркера С(-590)Т гена *IL4* в группе больных циррозом печени (68.2%) отличалась от частоты в группе с хроническим гепатитом с умеренным и выраженным фиброзом (39.1%).

**Ключевые слова:** хронический вирусный гепатит, генетика инфекционных заболеваний, генетический полиморфизм, гены цитокинов.

GENETIC FACTORS DETERMINING PREDISPOSITION TO CHRONIC COURSE OF VIRUS HEPATITIS AND FIBROSIS IN LIVER, by I. A. Goncharova<sup>1</sup>, E. V. Beloborodova<sup>2</sup>, M. B. Friedin<sup>1</sup>, E. I. Beloborodova<sup>2</sup>, G. E. Chernogoruk<sup>2</sup>, V. P. Puzyrev<sup>1, 2\*</sup> (<sup>1</sup>Institute of Medical Genetics, Tomsk Research Center, Siberian Division, Russian Academy of Medical Science, Tomsk, 634050 Russia, \*e-mail: valery.puzyrev@medgenetics.ru; pk\_ssmu@ssmu.net.ru; <sup>2</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia). Polymorphic variants of several genes *IL4* C(-590)T, *IL4RA* Ile50Val, *TNF* G(-308)A were studied for their association with extent of the disease chronization which is marked by hepatic fibrosis stage. Gradual decrease in A allele frequency of polymorphic marker G(-308)A in *TNF* gene, from patients with weak fibrosis to patients with cirrhosis. Group of patients with weak fibrosis was characterized by higher frequency of A allele (24.5%) comparing with patients with moderate and pronounced fibrosis (13.4%) and cirrhosis (8.7%). Differences in heterozygous genotype frequencies of *IL4* C(-590)T were found between patients with cirrhosis (68.2%) and groups of patients with moderate and marked fibrosis (39.1%).

**Key words:** chronic viral hepatitis, hepatic fibrosis, genetic polymorphism.

Фиброз представляет собой коллагенизацию ткани печени и является типичной реакцией на хроническое поражение, вызванное множеством причин как экзогенной (персистирующие вирусные и гельминтные инфекции, алкогольная интоксикация), так и эндогенной (наследственные нарушения обмена металлов и другие генетические факторы, определяющие ответ организма человека на воздействие различных агентов) природы [1, 2].

Особенности генной регуляции синтеза и распада коллагена у носителей определенных генотипов могут лежать в основе генетической предрасположенности к активному фиброгенезу и быстрому

прогрессированию заболевания в условиях воздействия повреждающих агентов. Выявлены мутации и полиморфные варианты генов, ассоциированные с темпами фиброобразования при хронических вирусных гепатитах. Так, например, быстрое прогрессирование связано с мутациями в генах гемохроматоза (*HFE*) и/или рецептора трансферрина (*TFR1*), которые приводят к избыточному накоплению железа в тканях печени [3]. Генетически обусловленная  $\alpha$ 1-антитрипсиновая недостаточность (мутация гена ингибитора протеиназ Pi) также способствует быстрому развитию фиброза. Увеличение частоты гетерозиготного генотипа MZ Pi отмечено в группах с тяжелыми патологиями печени [4].

\* Эл. почта: valery.puzyrev@medgenetics.ru; pk\_ssmu@ssmu.net.ru

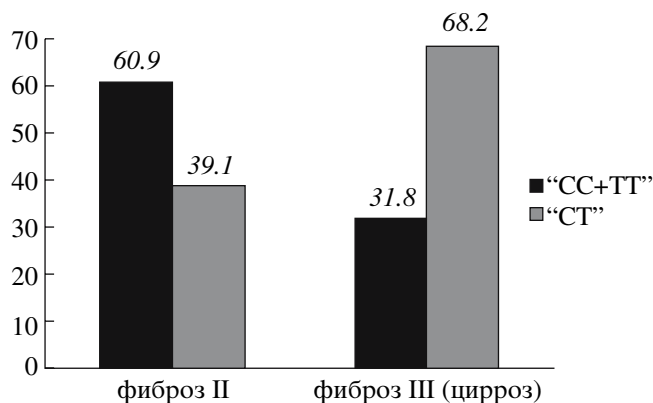
В последнее время большое внимание уделяется изучению полиморфных вариантов генов, вовлеченных в формирование иммунного ответа. Анализ многочисленных данных о связи полиморфных маркеров различных генов иммунной системы с хроническим вирусным гепатитом (ХВГ), особенностями его течения и осложнениями показывает, что в развитии инфекционного процесса значимую роль играет адекватный иммунный ответ, который определяется генетическими особенностями организма-хозяина [5]. Известно, что интерлейкины (IL) не только вовлечены в формирование иммунного ответа, но и модулируют метаболизм и активность ферментов, участвующих в процессе образования коллагена в печени. Например, синтез протеолитического фермента коллагеназы контролируется IL1, 6, 10,  $\gamma$ - и  $\beta$ -интерферонами, трансформирующим фактором роста  $\alpha$ , фактором некроза опухолей- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), а его подавление – IL4, IL11 и IL13 [6, 7].

Цель нашей работы состояла в оценке ассоциации полиморфных маркеров некоторых генов иммунной системы, участвующих в контроле синтеза коллагена (IL4 C(-590)T, IL4RA Ile50Val, TNF G(-308)A), с особенностями течения ХВГ, определяемыми степенью фиброза. Работа выполнена с привлечением дополнительных генетических маркеров и на более многочисленной выборке, чем проведенная нами ранее оценка ассоциации полиморфного маркера Ile50Val гена IL4RA с ХВГ [8].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В группу больных ХВГ вошли 130 человек. Критериями для включения в исследование служили: 1) серологические маркеры ХВГ В и/или С, обнаруженные в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (набор фирмы "ELISA"); 2) ДНК вируса гепатита В и РНК вируса гепатита С, выявленная с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). У всех больных проведена морфологическая верификация диагноза с определением индекса гистологической активности по Knodell [9] и стадии фиброза по Desmet [10]. Для оценки ассоциации полиморфных маркеров генов со стадией фиброза больных ХВГ разделили на три подгруппы. К первой подгруппе (I) отнесены больные (44 человека) со слабой степенью фиброза (стадия I). Вторую группу (II) составили 64 человека с умеренным и выраженным фиброзом (стадии II и III соответственно). В третью группу (III) вошли 22 больных с циррозом печени (стадия фиброза IV).

Ассоциацию полиморфных маркеров генов иммунной системы, участвующих в контроле синтеза коллагена, с ХВГ и стадией фиброза в печени анализировали с использованием следующих маркеров: C(-590)T гена IL4, Ile50Val гена IL4RA, G(-308)A гена TNF.



Распределение частот генотипов CC + TT и CT полиморфного маркера C(-590)T гена IL4 в группах больных хроническим вирусным гепатитом с умеренным и выраженным фиброзом (II) и циррозом печени (III).

**ДНК из лимфоцитов периферической крови выделяли** по стандартной неферментативной методике [11]. Генотипирование проводили путем анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) продуктов амплификации согласно [12, 13].

**Распределение генотипов** по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона [14]. Частоты аллелей и генотипов в группах сравнивали с использованием критерия  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность при числе степеней свободы равном 1, а также точного теста Фишера.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружена ассоциация полиморфных маркеров C(-590)T гена IL4 и G(-308)A гена TNF, расположенных в промоторных областях, со степенью фиброза печени при ХВГ. В группе с циррозом печени (группа III) частоты генотипов полиморфного маркера C(-590)T гена IL4 (таблица) отличались от частот в группе с умеренным и выраженным фиброзом (группа II) ( $p = 0.047$ ). Это различие обусловлено увеличением частоты гетерозиготного генотипа CT за счет уменьшения частоты гомозиготных генотипов CC и TT ( $\chi^2 = 4.47$ ;  $p = 0.030$ ) среди больных с циррозом печени (рисунок).

Различия в частотах генотипов маркера C(-590)T гена IL4 обнаружены ранее в группах ВИЧ-инфицированных, в которых до 10% увеличена частота гомозиготного генотипа TT, не обнаруженного в группе здоровых лиц [15]. Среди больных ХВГ жителей Томска гомозиготные носители аллеля T гена IL4 встречались с частотой 6.7%, в зависимости от стадии фиброза частота этого генотипа варьировала от 0% (группа III) до 9.1% (группа I) (таблица).

Ранее показали, что аллель T, ассоциированный с повышенной продукцией IL4, усиливает предрас-

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов у больных хроническим вирусным гепатитом с разной стадией фиброза

Ген	Поли-мор-физм	Генотип	Стадия фиброза						<i>p</i>		
			I		II		III		I и II	I и III	II и III
			n	%	n	%	n	%			
<i>IL4</i>	C-590T	CC	16	36.4	35	54.7	7	31.8	0.172*	0.279*	<b>0.047*</b>
		CT	24	54.5	25	39.1	15	68.2			
		TT	4	9.1	4	6.2	0	0			
		T	32	36.4	33	25.8	15	34.1	0.129	0.948	0.386
<i>IL4RA</i>	Ile50Val	Ile/Ile	19	36.5	20	26.7	9	34.6	0.129*	0.603*	0.752*
		Ile/Val	29	55.8	40	53.3	13	50			
		Val/Val	4	7.7	15	20	4	15.4			
		Val	37	35.6	70	46.7	21	40.4	0.103	0.681	0.533
<i>TNF</i>	G-308A	GG	29	59.2	54	76	19	82.6	0.134*	0.135*	0.870*
		GA	16	32.6	15	21.2	4	17.4			
		AA	4	8.2	2	2.8	0	0			
		A	24	24.5	19	13.4	4	8.7	<b>0.041</b>	<b>0.045</b>	0.412

Примечание. n – Абсолютное число наблюдаемых генотипов и аллелей; *p* – уровень значимости, полученный с помощью критерия  $\chi^2$  и точного теста Фишера\*.

положенность к atopическому дерматиту, астме, ревматоидному артриту [16]. Известно, что IL4, будучи ведущим противовоспалительным цитокином, ограничивает распространенность и интенсивность воспаления, подавляет синтез провоспалительных цитокинов IL6, IL8, IL12, TNF- $\alpha$  в макрофагах, уменьшает образование высокоактивных метаболитов кислорода и азота. Отсутствие в группе больных циррозом печени генотипа TT можно объяснить тем, что дефицит IL4 способствует увеличению интенсивности воспалительных реакций, активации апоптоза мононуклеарных клеток и гепатоцитов и, как следствие, прогрессированию процесса. Повышенную же частоту гетерозиготного генотипа CT в этой группе больных невозможно объяснить особенностями биохимических процессов, ассоциированных с разными аллелями. Скорее всего, в случае гетерозиготного состояния гена нужно исходить из особенностей функционирования промоторных участков. Вероятно, структурный полиморфизм в области промотора отражается на эффективности и специфичности связывания факторов транскрипции. Это может влиять на количество конечного продукта гена и, в конечном счете, на специфичность клеточных реакций и ответ организма на воздействие агентов различной природы.

В группах больных ХВГ с разными стадиями фиброза также выявлены различия в частотах аллеля A полиморфного маркера G(-308)A гена *TNF*, обусловленные снижением частоты аллеля A по мере развития фиброза – от слабо выраженного (груп-

па I – 24.5%) до цирроза печени (группа III – 8.7%) (таблица).

Аллель A маркера G(-308)A гена *TNF* связан, по-видимому, с более высоким уровнем продукции TNF- $\alpha$  как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [17]. Известно, что ключевой провоспалительный цитокин TNF- $\alpha$  играет значительную роль в развитии местных и общих системных патологических процессов, запуская каскад воспалительных реакций, способствует индукции некроза и апоптоза гепатоцитов [18]. Исходя из этих данных, можно предположить, что аллель A полиморфного маркера G(-308)A гена *TNF* должен быть ассоциирован с высокой скоростью фиброобразования и прогрессирования заболевания. Однако результаты нашей работы показывают, что у носителей аллеля A, заболевших вирусным гепатитом, возникнет слабый фиброз печени. Частота этого аллеля повышена у больных с первой стадией хронизации, что должно сопровождаться высоким уровнем продукции TNF- $\alpha$ . При этом самая низкая частота аллеля A выявлена в группе больных с циррозом печени. Этот факт требует осмысления и анализа ассоциации генотипов полиморфного маркера G(-308)A гена *TNF* с уровнем продукции TNF- $\alpha$  мононуклеарными клетками.

Следует отметить, что данные о влиянии полиморфных вариантов гена *TNF* на гистологическую тяжесть заболевания неоднозначны. С одной стороны, не выявлена ассоциация полиморфных маркеров (-308, -238) гена *TNF* со стадией заболевания [19]. С другой, предполагают, что эти полиморфные маркеры влияют на риск развития цирроза у больных

ХВГ-С [20]. Например, частота аллеля А в группе больных биллиарным циррозом печени европеоидов значимо ниже, чем у здоровых индивидов [21].

Таким образом, нами показано, что генотип СТ полиморфного маркера С-(590)Т гена *IL4*, ассоциированный с циррозом печени, служит маркером более тяжелого течения ХВГ, в то время как аллель А полиморфного маркера G(-308)А гена *TNF*, ассоциированный со слабым фиброзом, обуславливает благоприятное течение заболевания.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (06-04-08326-офи).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Покровский В.И., Непомнящих Г.И., Толоконская Н.П. 2003. Хронический гепатит С: современные представления о пато- и морфогенезе. Концепция антивирусной стратегии гепатоцитов. *Бюл. эксп. биологии и медицины*. **135**, 364–376.
2. Павлов Ч.С., Шутьпекова Ю.О., Золотаревский В.Б., Ивашкин В.Т. 2005. Современные представления о патогенезе, диагностике и лечении фиброза печени. *Росс. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. **2**, 13–20.
3. Gehrke S.G., Stremmel W., Mathes I., et al. 2003. Hemochromatosis and transferrin receptor gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype. *J. Mol. Med.* **81**, 780–787.
4. Буйкин С.В., Пузырев В.П. 2004. Альфа-1-антитрипсиновая недостаточность. Перспективы скрининга. Сообщение 1. *Бюл. СО РАМН*. **1**, 92–97.
5. Фрейдин М.Б., Гончарова И.А., Рудко А.А. 2006. Генные основы подверженности инфекционным заболеваниям. *Молекуляр. медицина*. **3**, 39–46.
6. Ishii T., Asuwa N. 2000. Collagen and elastin degradation by matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in aortic dissection. *Hum. Pathol.* **31**, 640–646.
7. Saarialho-Kere U., Jeskanen K.L., Hasan T., et al. 1999. Accumulation of matrilysin (MMP-7) and macrophage metalloelastase (MMP-12) in actinic damage. *J. Investigative Dermatol.* **113**, 664–672.
8. Гончарова И.А., Фрейдин М.Б., Дунаева Л.Е., Белобородова Е.В., Белобородова Э.И., Пузырев В.П. 2005. Анализ связи полиморфизма Ile50Val гена рецептора интерлейкина-4 (*IL4RA*) с хроническим вирусным гепатитом. *Молекуляр. биология*. **39**, 379–384.
9. Knodell R.G., Ishak K.G., Black W.C. 1981. Formulation and application of numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*. **1**, 431–435.
10. Desmet V.J., Gerber M., Hoofnagle J.H., et al. 1994. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology*. **19**, 1513–1520.
11. Lahiri D.K., Bye S., Nunberg J.I., et al. 1992. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods used. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **25**, 193–205.
12. Mitsuyasu H., Izuhara K., Mao X.-Q., et al. 1998. Ile50Val variants or *IL4Rα* upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat. Genet.* **19**, 119–120.
13. Noguchi E., Shibasaki M., Arinami T., et al. 1999. Lack of association of atopy/asthma and the interleukin-4 receptor  $\alpha$  gene in Japanese. *Clin. Exp. Allergy*. **29**, 228–233.
14. Вейр Б. 1995. *Анализ генетических данных*. М.: Мир.
15. Смольникова М.В., Коненков В.И. 2001. Клиническая иммуногенетика заболеваний человека. *Медицинская иммунология*. **3**, 379–389.
16. Kawashima T., Noguchi E., Arinami T., et al. 1998. Linkage and association of an IL-4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J. Med. Genet.* **35**, 502–504.
17. Wilson A.G., Symons J.A., McDowell T.L., et al. 1997. Effects of a polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 3195–3199.
18. Rosen H.R., McHutchison J.G., Conrad A.J., Lentz J.J., et al. 2002. Tumor necrosis factor genetic polymorphisms and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Am. J. Gastroenterol.* **97**, 714–720.
19. Barrett S., Collins M., Kenny C., et al. 2003. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J. Med. Virol.* **71**, 212–218.
20. Yee L.J., Tang J., Herrera J., et al. 2000. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun.* **1**, 386–390.
21. Gordon M.A., Oppenheim E., Camp N.J., et al. 1999. Primary biliary cirrhosis shows association with genetic polymorphism of tumour necrosis factor alpha promoter region. *J. Hepatol.* **31**, 242–247.