

УДК 575.113:616-002.5

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ С КОЛИЧЕСТВЕННЫМИ ПРИЗНАКАМИ, ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫМИ ДЛЯ ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА

© 2008 г. И. А. Гончарова^{1*}, Е. В. Белобородова², М. Б. Фрейдin¹,
Э. И. Белобородова², Г. Э. Черногорюк², В. П. Пузырев^{1,2}

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

²Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050

Поступила в редакцию 12.03.2007 г.

Принята к печати 11.10.2007 г.

Изучена связь полиморфных вариантов С(-590)Т гена *IL4*, Ile50Val гена *IL4RA* и G(-308)А гена *TNF* с такими значимыми для течения хронического вирусного гепатита количественными признаками, как уровень интерлейкинов 4, 10, 12, фактора некроза опухолей α , фибронектина, коллагеназы, ингибитора протеиназ, макроглобулина, эластазы и фракций оксипролина – свободной и белковосвязанной. Показано, что аллель А полиморфного маркера G(-308)А гена *TNF* связан с более низкой продукцией фактора некроза опухолей α мононуклеарными клетками, повышенным синтезом интерлейкинов 4 и 12 и с более низким уровнем оксипролина, связанного с белком. Выявлена связь генотипа СТ маркера С(-590)Т гена *IL4* с высоким уровнем оксипролина, связанного с белком.

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

ASSOCIATION OF IMMUNE SYSTEM GENE POLYMORPHISMS WITH QUANTITATIVE FEATURES WHICH ARE PATHOGENETICALLY IMPORTANT IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS, by I. A. Goncharova^{1*}, E. V. Beloborodova², M. B. Friedin¹, E. I. Beloborodova², G. E. Chernogoruk², V. P. Puzyrev¹ (¹Institute of Medical Genetics, Tomsk Research Center, Siberian Division, Russian Academy of Medical Science, Tomsk, 634050 Russia, *e-mail: irina.goncharova@medgenetics.ru; ²Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia). Association study was performed for genetic polymorphisms *IL4* C(-590)T, *IL4RA* Ile50Val, *TNF* G(-308)A, to estimate their effect on quantitative features which are pathogenetically important for chronic viral hepatitis course, i.e. levels of IL4, IL10, IL12, tumor necrosis factor α , fibronectin, collagenase, protease inhibitors, macroglobulines, elastases, free and protein-bound hydroxyproline. It has been shown that A allele of *TNF* G(-308)A polymorphism is associated with decreased TNF- α , increased IL4 and IL12, as well as with low level of protein-bound hydroxyproline. In addition, association of CT genotype of *IL4* C(-590)T polymorphism and high level of protein-bound hydroxyproline has been identified.

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

Выяснение механизмов фиброгенеза и факторов, инициирующих этот процесс и влияющих на скорость его протекания, необходимо для прогнозирования течения и исхода заболеваний печени. Многочисленные белки, в том числе, протеолитические ферменты (коллагеназа, эластаза); факторы, контролирующие их метаболизм, – интерлейкины (IL) 1, 4, 6, 10, 11, 13, интерфероны γ и β , трансформирующий фактор роста α , фактор некроза опухолей α (TNF- α); фибронектин, отражаю-

щий процессы регенерации в ткани печени, являются звеньями цепи превращений, приводящих к образованию фиброзной ткани [1–4]. В основе этих процессов лежат генетические особенности человека, влияющие на функционирование всех систем организма как в норме, так и при воздействии повреждающих факторов различной природы.

С конца 90-х годов прошлого столетия началось активное изучение генетических основ предрасположенности к различным инфекционным заболеваниям. Изучена связь различных генов как с фенотипом заболевания, так и с патогенетически значимы-

* Эл. почта: irina.goncharova@medgenetics.ru

ми качественными и количественными признаками, в том числе, связь генов цитокинов с гепатитами В и С [3] – тяжестью их течения, прогрессированием, ответом на терапию и исходом [5–9]. Данные же о влиянии генотипа по тем или иным полиморфным маркерам генов на изменчивость количественных показателей, значимых для развития и прогрессирования хронического вирусного гепатита, немногочисленны. Вместе с тем, такие исследования могут помочь более точно определить структуру генетической подверженности к патологии и зачастую объяснить ассоциацию генетических маркеров с заболеванием и характером его прогрессии. Так, например, не установлена ассоциация полиморфных вариантов генов *SLC11A1*, *VDR*, *IL1B*, *IL1RA* и *IL12B* с туберкулезом у тувинцев и русских, однако выявлена их связь с размером очагов инфильтрации, деструкцией и размером полостей распада легочной ткани, цитологическими и биохимическими показателями крови. Это позволило рассматривать данные полиморфизмы как маркеры, определяющие особенности течения туберкулеза и формирование эндотипов заболевания [10]. Не найдено связи между полиморфизмом генов *SLC11A1*, *IL1B* и *IL1RA* и клещевым энцефалитом, но установлена ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов этих генов с уровнем антигенной нагрузки вируса клещевого энцефалита и нарастанием титра IgM и IgG [11]. Все это свидетельствует о том, что этиологическая роль анализируемых генов остается недоказанной, но особенности их функционирования (количество и качественный состав продуктов экспрессии) при различных патологических состояниях могут существенно повлиять на течение болезни.

В связи с этим целью настоящей работы стало выявление ассоциации полиморфных маркеров C(-590)T гена *IL4*, Ile50Val гена *IL4RA* и G(-308)A гена *TNF* с количественными признаками, влияющими на фиброзообразование в ткани печени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В выборку больных хроническим вирусным гепатитом (ХВГ) вошли 60 человек. Критериями для включения в исследование служило обнаружение серологических маркеров вирусных гепатитов В и/или С в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (набор фирмы “ELISA”) и выявление ДНК вируса гепатита В и РНК вируса гепатита С с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Способность мононуклеарных клеток периферической крови продуцировать IL4, 10, 12, TNF- α и содержание в сыворотке крови фибронектина, коллагеназы, ингибитора протеиназ α_1 , макроглобулина α_2 , эластазы и фракций оксипролина – свободной и связанной с белком (БСО), определяли по стандартным методикам [12–15].

Ассоциацию полиморфных маркеров генов *IL4* (C-590T), *IL4RA* (I50V), *TNF* (G-308A) анализировали, сравнивая средние значения количественных показателей у носителей различных генотипов. Нормальность распределения значений количественных признаков проверяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. При нормальном распределении использовали однофакторный дисперсионный анализ, в случае отклонения от нормального распределения – критерии Краскала–Уоллиса и Манна–Уитни [16].

ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови по стандартной неферментативной методике [17]. Генотипирование осуществляли с помощью анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов продуктов амплификации согласно [18, 19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Не выявлено ассоциации полиморфных маркеров C(-590)T гена *IL4* и Ile50Val гена *IL4RA* с уровнем IL4, IL10, IL12, TNF- α (табл. 1). Носители разных генотипов маркера G(-308)A гена *TNF* отличались по распределению уровней IL4, IL12 и TNF- α (табл. 1). Если предполагать, что различные аллели маркера G(-308)A гена *TNF* ассоциированы с определенным уровнем выработки этих цитокинов, то можно ожидать, что количественные показатели изменяются линейно в направлении от гомозигот первого класса (GG) через гетерозиготный генотип (GA) к гомозиготам второго класса (AA). Однако наибольшие изменения показателей наблюдались у носителей гетерозиготного генотипа GA, которые характеризовались самым высоким уровнем IL4 и самым низким уровнем IL12 среди носителей этих генотипов (табл. 1). Только количество TNF- α постепенно снижалось в зависимости от генотипа маркера G(-308)A гена *TNF* в направлении от гомозигот GG к гомозиготам AA (табл. 1). Данные о влиянии полиморфизма G(-308)A гена *TNF* на уровень выработки его белкового продукта противоречивы. С одной стороны, с аллелем А связывают более активную экспрессию гена *TNF* и повышенный уровень продукции белка в культуре клеток Raji В человека [20]. С другой стороны, показана ассоциация этого аллеля с пониженным уровнем TNF- α в сыворотке крови больных хронической обструктивной болезнью легких [21]. Вероятно, в культуре клеток и в организме человека, особенно у представителей различных популяций, на ассоциацию аллеля А с уровнем продукции белка влияет характер сцепления этого полиморфного маркера с близлежащими участками генома. Например, известно, что ген *TNF* локализован вблизи локуса *HLA-DR*, аллель HLADR2 которого ассоциирован с низким уровнем TNF- α , а аллель HLADR3 – с его высоким уровнем [20].

Для подтверждения связи между количественными показателями и аллелями полиморфного марке-

Таблица 1. Зависимость продукции цитокинов от генотипа полиморфных маркеров генов у больных хроническим вирусным гепатитом*

Ген	Генотип	IL4	<i>p</i>	IL10	<i>p</i>	IL12	<i>p</i>	TNF- α	<i>p</i>
<i>IL4RA</i>	II	37.2 \pm 7.3	0.716•	232.6 \pm 39.2	0.323	203.7 \pm 35.1	0.425•	74.9 \pm 19.3	0.301•
	IV	44.5 \pm 8.0		172.2 \pm 23.4		241.6 \pm 33.1		125.7 \pm 39.4	
	VV	16.3 \pm 4.2		122.0		317.5 \pm 46.7		248.2 \pm 155.6	
<i>IL4</i>	CC	35.7 \pm 6.7	0.840•	204.5 \pm 35.6	0.654	244.6 \pm 35.1	0.959•	111.1 \pm 43.2	0.828•
	CT	37.4 \pm 7.9		191.2 \pm 29.1		224.7 \pm 35.7		137.8 \pm 49.2	
	TT	46.2 \pm 18.2		130.2 \pm 9.7		208.0 \pm 72.5		71.3 \pm 23.0	
<i>TNF</i>	GG	33.2 \pm 5.6	0.026•	221.7 \pm 32.1	0.327	274.1 \pm 25.1	0.009•	137.9 \pm 36.5	0.018•
	GA	53.9 \pm 11.1		168.0 \pm 28.4		131.9 \pm 34.3		48.7 \pm 16.1	
	AA	38.3 \pm 12.2		126.2 \pm 24.7		168.2 \pm 125.9		31.0 \pm 1.0	

Примечание: *p* – уровень значимости, полученный с помощью однофакторного дисперсионного анализа и с использованием критерия Краскала–Уоллиса (•).

* Приведены средние значения ($\bar{X} \pm S.E.$).

Таблица 2. Ассоциация генотипа генов *IL4* и *TNF* с патогенетически значимыми количественными признаками ($\bar{X} \pm S.E.$)

Ген	Генотип	IL4	<i>p</i>	IL12	<i>p</i>	TNF- α	<i>p</i>	Оксипролин, связанный с белком	<i>p</i>
<i>TNF</i>	GG	33.2 \pm 5.6	0.032	274.1 \pm 25.1	0.003	137.9 \pm 36.6	0.025	10.5 \pm 0.6	0.039
	GA + AA	50.8 \pm 9.2		138.4 \pm 33.9		46.4 \pm 13.9		8.3 \pm 0.8	
<i>IL4</i>	CC + TT	–		–		–		8.5 \pm 0.7	0.008
	CT							11.4 \pm 0.8	

Примечание: *p* – уровень значимости, полученный критерием Манна–Уитни.

ра G(-308)A гена *TNF* объединили генотипы, содержащие аллель А (GA и AA) и также выявили повышенное содержание IL4 и низкое содержание IL12 и TNF- α в сыворотке крови носителей аллеля А по сравнению с носителями генотипа GG (табл. 2). Это доказывает, что различные аллели маркера G(-308)A гена *TNF* в определенной степени влияют на уровень выработки IL4 и IL12. Закономерны и данные о связи полиморфизма G(-308)A гена *TNF* с количеством TNF- α в сыворотке крови больных ХВГ. Редкий аллель А этого полиморфного маркера, как показано ранее, служит более сильным активатором транскрипции гена *TNF* и поэтому ассоциирован с повышенным уровнем синтеза TNF- α и более тяжелым течением таких инфекционных заболеваний, как малярия и лейшманиоз [20]. У больных ХВГ жителей Томска аллель А полиморфного маркера G(-308)A гена *TNF* связан с более низким уровнем TNF- α в сыворотке крови (табл. 1, табл. 3), что обуславливает меньшую интенсивность воспаления и фиброзообразования в печени. Это объясняет установленное ранее повышение частоты аллеля А полиморфного маркера

G(-308)A гена *TNF* у больных с благоприятным течением ХВГ (слабый фиброз) [22].

В нашей работе показано, что аллель А ассоциирован не только с более низким уровнем синтеза TNF- α , но и с высоким содержанием IL4, который влияет на образование антител, ограничивает распространенность и интенсивность воспаления, а также служит ключевым сигналом, направляющим иммунный ответ при хронизации вирусных гепатитов по Th-2-пути [5]. Противоположная направленность выработки IL4 и TNF- α у носителей аллеля А маркера G(-308)A гена *TNF* подтверждает генетическую детерминированность взаимного ингибирования про- и противовоспалительных цитокинов и подчеркивает протективное значение этого аллеля, обуславливающего благоприятное течение ХВГ.

При изучении связи полиморфных маркеров C(-590)T гена *IL4*, Ile50Val гена *IL4RA*, G(-308)A гена *TNF* с активностью протеолитических ферментов, содержанием фибронектина и фракций оксипролина (продукт метаболизма коллагена) в сыворотке крови, установлено, что маркеры G(-308)A

Таблица 3. Зависимость активности протеолитических ферментов, содержания фибронектина и фракций оксипролина в сыворотке крови больных хроническим вирусным гепатитом от генотипов полиморфных маркеров исследованных генов*

Ген	Генотип	Коллагеназа	<i>p</i>	Фибронектин	<i>p</i>	α_2 -макроглобулина	<i>p</i>	Эластаза	<i>p</i>	Свободный оксипролин	<i>p</i>	Оксипролин, связанный с белком	<i>p</i>
<i>IL4RA</i>	II	4.46 ± 0.4	0.393	172.7 ± 14.2	0.805	2.5 ± 0.2	0.536	187.1 ± 15.0	0.207•	1.46 ± 0.1	0.739	8.4 ± 0.9	0.759•
	IV	4.28 ± 0.3		165.2 ± 9.5		2.7 ± 0.2		157.1 ± 11.1		1.49 ± 0.1		10.7 ± 0.7	
	VV	3.48 ± 0.4		181.0 ± 12.8		5.2 ± 1.2		194.8 ± 34.4		1.62 ± 0.2		8.6 ± 1.6	
<i>IL4</i>	CC	4.25 ± 0.3	0.235	181.9 ± 6.6	0.296	3.04 ± 0.5	0.241•	167.3 ± 11.9	0.829•	1.52 ± 0.1	0.860	8.4 ± 0.8	0.071•
	CT	4.18 ± 0.3		166.9 ± 13.4		2.5 ± 0.2		184.7 ± 17.0		1.54 ± 0.1		11.4 ± 0.8	
	TT	5.89 ± 1.3		110.0		4.1 ± 1.1		200.2 ± 42.3		1.68 ± 0.4		8.9 ± 1.5	
<i>TNF</i>	GG	4.41 ± 0.3	0.647	165.5 ± 9.3	0.961	3.0 ± 0.3	0.509•	176.1 ± 11.6	0.583•	1.47 ± 0.1	0.094	10.5 ± 0.6	0.044•
	GA	3.93 ± 0.4		169.3 ± 12.3		2.5 ± 0.3		175.5 ± 18.2		1.72 ± 0.1		8.2 ± 0.8	
	AA	4.16 ± 1.3		168.3 ± 32.7		2.4 ± 0.8		145.1 ± 50.3		0.80		10.8	

Примечание: *p* – уровень значимости, полученный с помощью однофакторного дисперсионного анализа и с использованием критерия Краскала–Уоллиса (•).

* Приведены средние значения ($\bar{X} \pm S.E.$).

гена *TNF* и C(-590)T гена *IL4* ассоциированы с уровнем БСО (табл. 2, табл. 3). В случае объединения генотипов (GA и AA) гена *TNF* носители генотипа GA и аллеля A характеризуются более низким уровнем БСО (табл. 2, табл. 3), чем обладатели генотипа GG.

Содержание БСО в сыворотке крови прямо пропорционально активности процессов образования коллагена в печени, поэтому аллель A, ассоциированный с низким уровнем БСО, определяет, в свою очередь, и низкую активность синтеза коллагена. Этот факт еще раз подтверждает протективное значение аллеля A при формировании фиброза у больных ХВГ.

Кроме этого, с одной стороны, гетерозиготный генотип CT полиморфного маркера C(-590)T гена *IL4* ассоциирован с циррозом печени при ХВГ [22], а, с другой, выявлена тенденция к повышению уровня БСО у носителей этого генотипа по сравнению с гомозиготными носителями генотипов CC и TT (табл. 3). Для подтверждения значимости генотипа CT в изменении уровня БСО объединили гомозиготные генотипы (CC и TT) маркера C(-590)T гена *IL4* (табл. 2).

Установлена ассоциация гетерозиготного генотипа CT маркера C(-590)T гена *IL4* с повышенным уровнем БСО (табл. 2). Это указывает на активное образование коллагена у больных ХВГ, носителей генотипа CT, что определяет этот генотип как неблагоприятный маркер прогрессирования ХВГ. Полученные данные объясняют связь между гетерозиготным генотипом CT маркера C(-590)T гена *IL4* у больных ХВГ и циррозом печени [22]. Вероятно, в случае заболевания вирусным гепатитом носители генотипа CT полиморфного маркера C(-590)T гена *IL4* будут иметь тенденцию к быстрому прогрессированию заболевания с переходом в цирроз печени.

Таким образом, нами показано, что аллель A полиморфного маркера G(-308)A гена *TNF* связан с пониженным синтезом TNF- α , повышенным синтезом IL4 и IL12 и низким уровнем БСО, что свидетельствует о медленных темпах образования коллагена в печени. Вследствие этого аллель A полиморфного маркера G(-308)A гена *TNF* обуславливает, вероятно, благоприятное течение ХВГ. Ассоциация генотипа CT маркера (-590)T гена *IL4* с высоким уровнем БСО, указывающего на значимую активность процессов образования коллагена в печени, объясняет

установленную ранее ассоциацию данного генотипа с последней стадией фиброза печени – циррозом [22] и указывает на генотип СТ полиморфного маркера С(-590)Т гена *IL4* как на маркер неблагоприятного течения ХВГ.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Валенкевич Л.Н., Яхонтова О.И. 2000. Нецирротический фиброз печени. *Росс. гастроэнтерол. журн.* **4**, 21–23.
2. Зорин Н.А., Зорина Р.М., Горин В.С. 1993. Семейство макроглобулинов. *Клиническая лабораторная диагностика.* **1**, 52–56.
3. Harada N., Okajima K., Liu W., et al. 2000. Activated neutrophils impair gastric cytoprotection role of neutrophil elastase. *Dig. Dis. Sci.* **45**, 1210–1216.
4. Robert L. 1999. Interaction between cells and elastin, the elastin-receptor. *Connect. Tissue Res.* **40**, 75–82.
5. Царегородцева Т.М., Серова Т.И. 2003. *Цитокины в гастроэнтерологии.* М.: Анахарсис.
6. Knapp S., Yee L.J., Frodsham A.J., et al. 2003. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of *MxA*, *OAS-1* and *PKR*. *Genes Immun.* **4**, 411–419.
7. Toniutto P., Fabris C., Fumo E., et al. 2004. Carriage of the apolipoprotein E-epsilon4 allele and histological outcome of recurrent hepatitis C after antiviral treatment. *Am. J. Clin. Pathol.* **122**, 428–433.
8. Bahr M.J., Menuawy M., Boeker K.H., et al. 2003. Cytokine gene polymorphisms and the susceptibility to liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int.* **23**, 420–425.
9. Powell E.E., Edwards-Smith C.J., Hay J.L., et al. 2000. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology.* **31**, 828–833.
10. Рудко А.А., Ондар Э.А., Фрейдин М.Б., Пузырев В.П. 2004. Генетика подверженности к туберкулезу у тувицев. *Вестн. этнич. медицины.* **1**, 17–21.
11. Фрейдин М.Б., Гончарова И.А., Рудко А.А. 2006. Генетические основы подверженности инфекционным заболеваниям. *Молекуляр. медицина.* **3**, 39–46.
12. Кузнецова Т.П., Прошина Л.Я., Приваленко М.Н. 1982. Модификация содержания оксипролина в сыворотке крови. *Лабораторное дело.* **8**, 8–10.
13. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. 1979. Унифицированный метод определения активности α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека. *Вопр. мед. химии.* **25**, 494–499.
14. Шараев П.Н. 1981. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови. *Лабораторное дело.* **5**, 283–285.
15. Шараев П.Н., Пишков В.Н., Запорожская Н.Г. 1987. Определение коллагенолитической активности плазмы крови. *Лабораторное дело.* **1**, 60–62.
16. Лакин Г.Ф. 1990. *Биометрия.* М.: Наука.
17. 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.
18. Mitsuyasu H., Izuhara K., Mao X.-Q., et al. 1998. Ile50Val variants of *IL4R α* upregulate IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat. Genet.* **19**, 119–120.
19. Noguchi E., Shibasaki M., Arinami T., et al. 1999. Lack of association of atopy/asthma and the interleukin-4 receptor α gene in Japanese. *Clin. Exp. Allergy.* **29**, 228–233.
20. 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.
21. Seitova G.N., Bukreeva E.B., Puzyrev V.P. 2006. Association of the *TNF* gene promoter polymorphism with the level of tumor necrosis factor-alpha in serum of COPD patients. *16th ERS Annual Congr.* 2006. Munich, Germany. *Europ. Respiratory J.* 522–523.
22. Гончарова И.А., Белобородова Е.В., Фрейдин М.Б. и др. 2008. Генетические факторы, определяющие подверженность к хронизации вирусной инфекции и фиброгенезу в печени: анализ ассоциаций генов *IL4* (С-590Т), *IL4RA* (I50V), *TNF α* (G-308A) со стадией фиброза при хроническом вирусном гепатите. *Молекуляр. биология.* **42**, 238–241.