

УДК 616.36-002.2-08:612.017

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ НЕКОТОРЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ IL-10, IL-4, TNF У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В

Усыченко Е. Н. (*usichenko2006@yandex.ru*), Бажора Ю. И. (*bajyu@ukr.net*),
Усыченко Е. М. (*usichenko2006@mail.ru*)

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Целью данного исследования являлось сравнение частоты встречаемости полиморфизмов генов IL-10 (G1082A), IL-4 (C589T) и TNF α (G308A) у здоровых лиц и пациентов с хроническим гепатитом В (ХГВ), принадлежащих к этнически однородной группе жителей Одесского региона. Полиморфизм генов цитокинов изучался при помощи амплификации соответствующих участков генома методом ПЦР. Структура использованных праймеров и параметры температурных циклов использованы из Международной геномной базы данных. Были выявлены существенные различия частот полиморфизма указанных генов в группах здоровых и пациентов с ХГВ, что может в дальнейшем служить одним из генетических критериев прогрессирования гепатита В.

Ключевые слова: хронический гепатит В, полиморфизм генов цитокинов, прогрессирование болезни

Вирусные гепатиты В и С являются по-прежнему широко распространенными заболеваниями как в мире, так и в Украине. По данным ВОЗ, вирус гепатита В выявляют у 350-400 млн человек, что составляет около 5% населения всего земного шара.

Хронический гепатит В (ХГВ) является одной из основных причин хронических диффузных заболеваний печени. У пациентов с ХГВ имеется высокий риск развития цирроза печени, печеночно-клеточной недостаточности и гепатоцеллюлярной карциномы, в связи с чем летальный исход прогнозируют у 25-40% инфицированных лиц [8, 15, 6].

Несмотря на определенные успехи в изучении патогенеза хронических вирусных гепатитов, причины длительной персистенции в организме вирусов окончательно не изучены, до сих пор неизвестны многие детали механизма формирования хронического гепатита и дальнейшего его прогрессирования в цирроз.

Известно, что повреждение печени при ХГВ имеет иммуноопосредованный характер, так как вирус гепатита В не обладает прямым цитопатическим действием. Персистенция HBV связана с неспособностью вирусспецифических цитотоксических лимфоцитов удалять вирусы из организма, что приводит к хронической некроинфламаторной реакции в печени, а в дальнейшем – к развитию цирроза и гепатокарциномы [4, 7, 1].

При хроническом гепатите В механизмы иммунологического реагирования во многом определяют течение и исход заболевания [12]. Получены данные о возможном вовлечении НК-клеток при активации их цитокинами в процесс клеточного повреждения и обострения хронического гепатита В [13]. В настоящее время доказано, что развитие гепатокарциномы у пациентов с ХГВ возможно даже на стадии хронического гепатита, до формирования цирроза печени [2, 9].

Исследованиями последних лет показано, что дисбаланс секреции иммунорегуляторных цитокинов и регуляции цитокиноопосредованной кооперации, пролиферации и дифференцировки клеток может быть обусловлен комплексом генов, от которых зависит уровень продукции цитокинов Th1 или Th2 типа [5, 10].

Установлено, что уровень продукции цитокинов и их антагонистов, экспрессия рецепторов к различным цитокинам определяется унаследованным индивидуумом набором аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторами.

Однако исследования по изучению взаимос-

вязи между полиморфизмом генов цитокинов и вариантами течения хронического гепатита В многочисленны, нередко оцениваются в одной группе с хроническим гепатитом С [10, 11, 3, 14, 16].

В связи с этим представляется актуальным оценить значение аллельного полиморфизма генов IL-10 (G1082A), IL-4 (C589T) и TNF α (G308A) в этнически однородной группе пациентов с ХГВ, проживающих в Одесском регионе.

Цель исследования – установление частоты встречаемости полиморфизмов генов IL-4(C589T), IL-10(G1082A), TNFα (G308A) у пациентов с хроническим гепатитом В по сравнению со здоровыми лицами, проживающих в Одесском регионе, для повышения качества диагностики гепатита В по полученным генетическим критериям.

Материалы и методы

Обследован 41 пациент с ХГВ в возрасте от 18 до 54 лет, при этом средний возраст составил 39±2,16 года. Все обследованные находились на диспансерном наблюдении в гепатологическом центре Одесской городской клинической инфекционной больницы. Пациенты являются жителями Одесского региона, в группе исследования преобладали мужчины (70%). Давность заболевания составила не более 10 лет.

Контрольная группа составлена из 30 практически здоровых лиц, средний возраст которых 32±1,05 года. Количество женщин и мужчин было одинаковым (по 15 чел.).

Для подтверждения диагноза ХГВ были исследованы: биохимические показатели (повышение активности АсАТ и АлАТ, концентрация билирубина и преобладание его прямой фракции), серологические маркеры (определение HBsAg, HBeAg, aHBe, а также HBV DNA).

Молекулярно-генетические исследования включали определение полиморфных вариантов генов IL-4(C589T), IL-10(G1082A), TNFα (G308A). Выделение ДНК проводилось при помощи набора «ДНК-ЭКСПРЕСС-кровь» (НПФ «Литех», РФ). Полиморфизм изучался при помощи амплификации соответствующих участков генома методом ПЦР. Структура использованных праймеров и параметры температурных циклов, описанные в литературе и геномной базе данных. Исследования проводились на базе Немецкого диагностического центра им. Св. Павла (г. Одесса).

Таблица 1. – Характеристики исследованных полиморфизмов

Ген	Поли-морфизм	Название праймера	Нуклеотидная последовательность
IL-4	C589T	rs2243250	5'-TAAACTGGGAGAACATGGT-3'
IL-10	G1082A	rs1800896	5'-CCT ATC CCT ACT TCC CCT-3'
TNF α	G308A	rs1800620	5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GC-3'

Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли с помощью критерия χ^2 Пирсона. Частоты аллелей и генотипов в группах сравнивали с применением критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность при числе степеней свободы, равном 1. Частота аллелей рассчитана в соответствии с законом Харди-Вайнберга.

Результаты и обсуждение

Учитывая, что иммунные механизмы играют значительную роль в патогенезе хронического вирусного гепатита, регуляция которых определяется балансом цитокинов, представляется важным оценить частоту встречаемости аллельных вариантов генов цитокинов среди здоровых лиц и пациентов с ХГВ в этнически однородной группе Одесского региона.

При изучении встречаемости аллельных полиморфизмов IL-10 (G1082A), IL-4 (C589T) и TNF α (G308A) выявлены существенные различия в контрольной и исследуемой группах (табл. 2, 3, 4).

Таблица 2. – Частота аллелей IL-4 (C589T) в контрольной и исследуемой группах

Генотип /аллель	Контрольная группа (n=30)	Частота (%)	Пациенты с ХГВ (n=41)	Частота (%)	χ^2	Уровень значимости
CC	26	88	25	61	4,32	p<0,05
CT	2	6	16	39	8,78	p<0,01
TT	2	6	-	-	-	-

При изучении полиморфного участка IL-4 (C589T) выявлено преобладание гомозиготного варианта CC (норма) как в группе пациентов с гепатитом В, так и в контрольной группе, что составило 61% и 88%, соответственно. Кроме того, в группе пациентов с хроническим гепатитом В отмечалось значительное преобладание гетерозиготной аллели СТ в сравнении с контрольной группой. В исследуемой группе пациентов с хроническим гепатитом В гомозиготного варианта ТТ (мутация) выявлено не было, в то время как в контрольной группе такой вариант генотипа обнаружен у 6% людей. Частота аллели С составила в контрольной группе 0,9, а в группе пациентов с хроническим гепатитом В – 0,8. Частота аллели Т составила 0,1 и 0,2, соответственно.

Таким образом, можно предположить вероятную взаимосвязь гомозиготной аллели и определенной устойчивости к вирусу гепатита В, а также гетерозиготного варианта (СТ) и повышенной восприимчивости к вирусу гепатита В. Разница частоты встречаемости генотипа CC и СТ в исследуемой и контрольной группах достоверна (p<0,05).

При исследовании полиморфизма IL-10 (1082G/A) у пациентов с хроническим гепатитом В отмечалась значительно большая изменчивость генотипа, чем в контрольной группе. В частности, гомозиготный генотип GG (норма) у пациентов с хроническим гепатитом В встречался значительно реже (32%), чем у здоровых лиц (48%). В исследуемой группе преобладал гетерозиготный вариант GA (61%), а в контрольной группе его встречаемость была низ-

Таблица 3. – Частота аллелей IL-10(1082G/A) в контрольной и исследуемой группах

Генотип /аллель	Контрольная группа (n=30)	Частота (%)	Пациенты с ХГВ (n=41)	Частота (%)	χ^2	Уровень значимости
GG	14	48	13	32	1,645	p>0,05
GA	8	26	25	60	8,197	p<0,05
AA	8	26	3	8	4,954	p<0,05

кой (26%). Частота встречаемости мутантного варианта генотипа AA в контрольной и исследуемой группах существенной разницы не имела (26% и 8%, соответственно). Разница частоты встречаемости генотипов GA и AA в исследуемой и контрольной группах достоверна (p>0,05). Частота аллели G составила в контрольной группе 0,53, а в группе пациентов с хроническим гепатитом В – 0,62. Частота аллели А составила 0,47 и 0,38, соответственно.

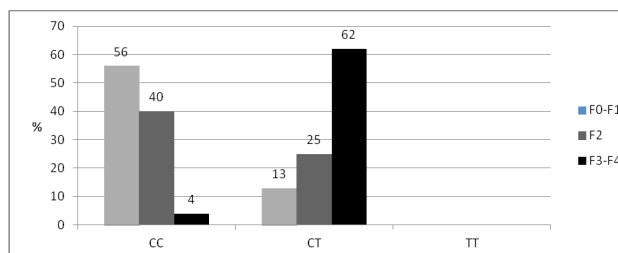
Таблица 4. – Частота аллелей TNF- α (G308A) в контрольной и исследуемой группах

Генотип /аллель	Контрольная группа (n=30)	Частота (%)	Пациенты с ХГВ (n=41)	Частота (%)	χ^2	Уровень значимости
GG	27	91	35	85	0,336	p<0,05
GA	2	6	6	15	1,1	p<0,05
AA	1	3	-	-	-	-

При изучении полиморфного участка TNF- α (G308A) выявлено преобладание гомозиготного варианта GG (норма) как в группе пациентов с гепатитом В, так и в контрольной группе, что составило 91% и 85%, соответственно. Однако в группе пациентов с хроническим гепатитом В отмечалось некоторое преобладание гетерозиготной аллели GA в сравнении с контрольной группой. В исследуемой группе пациентов с хроническим гепатитом В гомозиготного варианта ТТ (мутация) не выявлено, в контрольной группе такой вариант генотипа обнаружен только у одного человека (3%). Статистически достоверной разницы между показателями не выявлено.

Частота аллели G составила в контрольной группе 0,93, а в группе пациентов с хроническим гепатитом В – 0,89. Частота аллели А составила 0,07 и 0,11, соответственно.

Степень выраженности фибротического процесса в печени определяли по шкале METAVIR с использованием неинвазивного метода Fibrotest. Оценка степени фиброза определялась по уровню таких показателей, как альфа 2 макроглобулин, гаптоглобин, аполипопротеина А1, общий билирубин, ГГТ, АлАт и АсАт. В ходе исследования все пациенты были разделены на три группы: с отсутствующим или минимальным фиброзом (F0-F1), умеренным фиброзом (F2) и с выраженным фиброзом и/или циррозом печени (F3 - F4).

**Рисунок 1.** – Степень фиброза печени у пациентов с разными генотипами IL-4(C589T)

У пациентов с гомозиготным генотипом СС IL-4(C589T) отмечается преобладание минимальной степени фиброза или его отсутствие по сравнению с пациентами, у которых выявлен гетерозиготный генотип СТ IL-4(C589T).

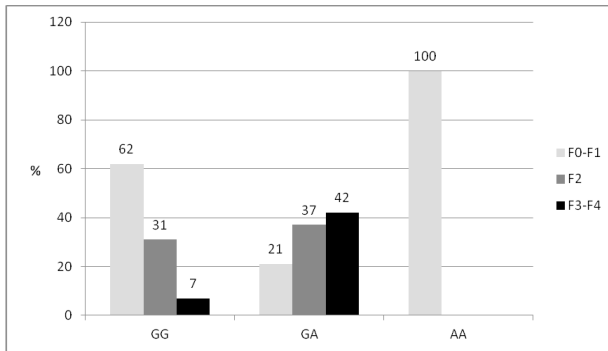


Рисунок 2. – Степень фиброза печени у пациентов с разными генотипами IL-10 (1082G/A)

У пациентов с гомозиготными вариантами GG и AA IL-10 (1082G/A) отмечается преобладание мини-

мальной степени фиброза в сравнении с теми, у которых выявлен гетерозиготный вариант GA IL-10 (1082G/A).

Выводы

1. В этнически однородной группе жителей Одесского региона выявлены различия между пациентами с хроническим гепатитом В и здоровыми лицами по частотам аллелей гена IL-4(C589T) и IL-10(G1082A).

2. Гомозиготы по аллели СС более устойчивы к гепатиту В, чем гетерозиготы СТ гена IL-4(C589T) ($p < 0,05$).

3. Гетерозиготы по аллели GA более чувствительны к гепатиту В по сравнению с мутантной аллелью AA IL-10(G1082A).

Заключение

Таким образом, полученные результаты указывают на существенные различия в полиморфизме генов IL-4(C589T) и IL-10(G1082A) у пациентов с хроническим гепатитом В и здоровых лиц. Определение генетического профиля у таких пациентов может быть важным дополнительным фактором в комплексной диагностике хронического гепатита В.

Литература

1. Бакулин, И. Г. Лечение больных с циррозом печени HBV-этиологии: успехи, нерешенные вопросы / И. Г. Бакулин, Т. Ю. Хайменова, И. О. Сидорова // Тер. архив. – 2013. - №12. – С. 114-118.
2. Возможность обратимости цирроза печени (клинические и патогенетические предпосылки) / Ч. С. Павлов, В. Б. Золотаревский, В. Т. Ивашкин [и др.] // РЖГГК. – 2006. – Т. 16, № 1. – С. 20-29.
3. Генетические факторы подверженности к хронизации вирусного гепатита и фиброзу печени / Гончарова И. А., Белобородова Е. В., Фрейдин М. Б. [и др.] // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42, № 2. – С. 238-241.
4. Ивашкин, В. Т. Иммунная система и повреждения печени при хроническом гепатитах В и С / В. Т. Ивашкин // РЖГГК. – 2009. - № 6. – С. 4-10.
5. Ивашкин, В. Т. Механизмы иммунной толерантности и патологии печени / В. Т. Ивашкин // РЖГГК. – 2009. - № 2. – С. 8-13.
6. Косаговская, И. И. Медико-социальные аспекты вирусных гепатитов с парентеральным механизмом передачи / И. И. Косаговская, Е. В. Волчкова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2013. – № 1. – С. 28-39.
7. Кучерявый, Ю. А. Хронический гепатит, цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома – звенья одной цепи / Ю. А. Кучерявый, Н. Ю. Стукова, М. Л. Ахтаева // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2012. – № 5.
8. Маев, И. В. Современные алгоритмы диагностики и лечения хронического гепатита В / И. В. Маев, Т. Е. Полунина, Е. В. Полунина // Клин. мед. – 2009. - № 8. – С. 7-12.
9. Павлов, Ч. С. Как оценить и уменьшить риск фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы у пациентов с хронической инфекцией вирусами гепатитов В и С / Ч. С. Павлов, В. Т. Ивашкин // РЖГГК. – 2007. - № 5. – С. 16-23.
10. Полиморфизм генов – модификаторов иммунного ответа при заболеваниях печени различной этиологии / И. А. Гончарова, Гамаль Абд Ель Азиз Наср, Е. В. Белобородова [и др.] // Медицинская генетика. – 2010.

Literatura

1. Bakulin, I. G. Lechenie bol'ny'x s cirrozom pecheni HBV-e'tiologii: uspexi, nereshenny'e voprosy' / I. G. Bakulin, T. Yu. Xajmenova, I. O. Sidorova // Ter. arxiv. – 2013. - № 12. – S. 114-118.
2. Vozmozhnost' obratimosti cirroza pecheni (klinicheskie i patogeneticheskie predposylki) / Ch. S. Pavlov, V. B. Zolotarevskij, V. T. Ivashkin [i dr.] // RZhGGK. – 2006. – T. 16, № 1. – S. 20-29.
3. Geneticheskie faktory' podverzhennosti k khronizacii virusnogo gepatita i fibrozu pecheni / Goncharova I. A., Beloborodova E. V., Frejdin M. B. [i dr.] // Molekulyarnaya biologiya. – 2008. – T. 42, № 2. – S. 238-241.
4. Ivashkin, V. T. Immunnaya sistema i povrezhdeniya pecheni pri khronicheskim gepatitax V i S / V. T. Ivashkin // RZhGGK. – 2009. - № 6. – S. 4-10.
5. Ivashkin, V. T. Mexanizmy' immunnoj tolerantnosti i patologii pecheni / V. T. Ivashkin // RZhGGK. – 2009. - № 2. – S. 8-13.
6. Kosagovskaya, I. I. Mediko-social'ny'e aspekty' virusny'x gepatitov s parenteral'ny'm mexanizmom peredachi / I. I. Kosagovskaya, E. V. Volchkova // E'pidemiologiya i infekcionny'e bolezni. – 2013. – № 1. – S. 28-39.
7. Kucheryavy'j, Yu. A. Xronicheskij gepatit, cirroz pecheni i gepatocellyulyarnaya karcinoma – zven'ya odnoj cepi / Yu. A. Kucheryavy'j, N. Yu. Stukova, M. L. Axtaeva // Klinicheskie perspektivy' gastroe'nterologii, gepatologii. – 2012. – № 5.
8. Maev, I. V. Sovremenny'e algoritmy' diagnostiki i lecheniya khronicheskogo gepatita V / I. V. Maev, T. E. Polunina, E. V. Polunina // Klin. med. – 2009. - № 8. – S. 7-12.
9. Pavlov, Ch. S. Kak ocenit' i umen'shit' risk fibroza, cirroza i gepatocellyulyarnoj karcinomy' u pacientov s khronicheskoj infekciej virusami gepatitov V i S / Ch. S. Pavlov, V. T. Ivashkin // RZhGGK. – 2007. - № 5. – S. 16-23.
10. Polimorfizm genov – modifikatorov immunного otveta pri zabolevaniyax pecheni razlichnoj e'tiologii / I. A. Goncharova, Gamal' Abd El' Aziz Nasr, E. V. Beloborodova [i dr.] // Medicinskaya genetika. – 2010. - № 12. – S. 20-24
11. Polimorfizm odinochny'x nukleotidov v genax citokinov i ix receptorov: biologicheskij e'ffekt i metody' identifikacii /

- № 12. – С. 20-24

11. 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.

12. Разработка методов для проведения широкомасштабных исследований полиморфизма генов, регулирующих различные компоненты иммунного ответа / И. В. Сергеев, М. Р. Хаитов, Д. Ю. Трофимов [и др.] // Физиология и патология иммунной системы. – 2009. - № 4. – С. 21.

13. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK all-mediated liver damage. / C. Dunn, M. Brunetto, G. Reynolds [et al.] // J. Exp. Med. – 2007. – Vol. 24. – P. 667-680.

14. Endothelial cell cross-presentation initiates TNFA-dependent CD8+ T-cell immunity against virus-infected hepatocytes / D. Stabenow, K. Gartner, M. Odenthal [et al.] // Journal of Hepatology. – 2010. – P. 41.

15. Hepatitis B and C virus infection among 1.2 million persons with access to care: Factors associated with testing and infection prevalence / Ph. R. Spradling, L. Rupp, A. C. Moorman [et al.] // Clin.Infect.Dis. – 2012. – #55 (8). – P. 1047-1055.

16. Tumor necrosis factor-alpha promoter gene polymorphism affects the occurrence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B / Danbi Lee, Y.-H. Chung, J. A. Kim [et al.] // Journal of Hepatology. – 2010. – P. 223.

D. D. Abramov, I. A. Kofnadi, K. V. Utkin [i dr.] // Immunologiya. – 2011. - № 5. – S. 275-278.

12. Razrabotka metodov dlya provedeniya shirokomashtabny'x issledovanij polimorfizma genov, reguliruyushhix razlichny'e komponenty' immunnogo otveta / I. V. Sergeev, M. R. Xaitov, D. Yu. Trofimov [i dr.] // Fiziologiya i patologiya immunoj sistemy'. – 2009. - № 4. – S. 21.

13. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK all-mediated liver damage. / C. Dunn, M. Brunetto, G. Reynolds [et al.] // J. Exp. Med. – 2007. – Vol. 24. – P. 667-680.

14. Endothelial cell cross-presentation initiates TNFA-dependent CD8+ T-cell immunity against virus-infected hepatocytes / D. Stabenow, K. Gartner, M. Odenthal [et al.] // Journal of Hepatology. – 2010. – P. 41.

15. Hepatitis B and C virus infection among 1.2 million persons with access to care: Factors associated with testing and infection prevalence / Ph. R. Spradling, L. Rupp, A. C. Moorman [et al.] // Clin.Infect.Dis. – 2012. – #55 (8). – P. 1047-1055.

16. Tumor necrosis factor-alpha promoter gene polymorphism affects the occurrence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B / Danbi Lee, Y.-H. Chung, J. A. Kim [et al.] // Journal of Hepatology. – 2010. – P. 223.

ANALYSIS OF THE FREQUENCY OF SOME POLYMORPHISMS OF THE CYTOKINE GENES IL-10, IL-4, TNF IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B

Usychenko E. N., Bazhora Yu. I., Usychenko E. M.

Educational Establishment "Odessa National Medical University", Odessa, Ukraine

The aim of the present study was to compare the frequency of IL-10 (G1082A), IL-4 (C589T) and TNFα (G308A) gene polymorphisms in healthy individuals and patients with chronic hepatitis B (CHB), belonging to ethnically homogenous group of residents of the Odessa region. Cytokine gene polymorphism was studied by means of amplification of the respective portions of the genome using PCR method. The structure of the primers used and the parameters of the temperature cycles were taken from the international genomic database. We found significant differences in the frequency of polymorphism of the above genes in the groups of healthy individuals and those with CHB, which may further serve as one of the genetic criteria of hepatitis B progression.

Keywords: chronic hepatitis B, cytokine gene polymorphism, disease progression.

Поступила: 10.02.2016

Отрецензирована: 16.02.2016