

УДК 616-037:616-006.37:576.859.8:616.3-002

ВПЛИВ I/D ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА АПФ НА ТЕМПИ ПРОГРЕСУВАННЯ ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ С

Л.В. Мороз, І. В. Яцик

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова

Ключові слова: хронічний гепатит С, поліморфізм гена АПФ, прогресування захворювання, ренін-ангіотензинова система.

ВЛИЯНИЕ I/D ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА АПФ НА ТЕМПЫ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С

Л.В. Мороз, І. В. Яцик

В работе представлены результаты анализа I/D полиморфизма гена АПФ 97 больных хроническим гепатитом С и 92 здоровых человек контрольной группы. Установлено, что генотип DD и аллель D доминировали при ХГС. В то же время характерно, что аллель D чаще определялась у пациентов с низким темпом прогрессирования ХГС, что свидетельствует о ее протекторной роли, а аллель I была более характерна для больных с высоким темпом прогрессирования заболевания (играла профиброгенную роль). Обнаруженная закономерность имела большее значение у женщин, чем у мужчин.

Ключевые слова: хронический гепатит С, полиморфизм гена АПФ, прогрессирование заболевания, ренин-ангиотензиновая система.

INFLUENCE OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME I/D GENE POLYMORPHISM ON THE RATE OF PROGRESSION OF CHRONIC HEPATITIS C

L. V. Moroz, I. V. Yatsyk

The article presents the results of analysis of I/D polymorphism of the ACE gene in 97 patients with chronic hepatitis C (CHC) and 92 healthy controls. It was found that DD genotype and D allele were dominant in patients with CHC. However, D allele was often determined in patients with a low rate of CHC progression, which indicate its role as a protector, and I allele was more common in patients with high

rate of disease progression (it had profibrogenic role). The observed pattern was more common in women than in men.

Key words: chronic hepatitis C, polymorphism of ACE gene, progression of the disease, rennin-angiotensin system.

Хронічний гепатит С (ХГС) – широко розповсюджене захворювання: вірусом гепатиту С (ВГС) інфіковано 3% населення світу [1], а за деякими підрахунками понад 900 млн. людей [2]. Більшість медико-соціальних проблем пов'язаних з ХГС, виникають при прогресуванні цього захворювання. Ключовим процесом у перебігу ХГС є фіброгенез у печінці. Декілька недавніх досліджень продемонстрували, що у розвитку фіброзу печінки важливу роль відіграє ренін-ангіотензинова система (РАС) [3]. Доведено існування в печінці локальної РАС, яка діє на паракринний манер і регулює запалення, фіброз, ангіогенез, проліферацію, апоптоз та виживання клітин [4]. Компоненти внутрішньопечінкової РАС виявляються і синтезуються наступними клітинами: ренін – в активованих зірчатих клітинах печінки (аЗКП), ангіотензиноген – у гепатоцитах, клітинах Купфера, епітелії жовчних проток [3]; ангіотензин І не виявлено в печінці [5], ангіотензин перетворюючого ферменту (АПФ) – в ЗКП, міофіброблестах, клітинах Купфера, рецептор до ангіотензину ІІ 1 типу (АТ1) – аЗКП [6], клітинах Купфера, судинному ендотелії, епітелії жовчних

проток, гепатоцитах. АТ2 не виявлено в печінці [3].

Серед вищеперерахованих складових внутрішньопечінкової РАС центральне місце в фіброгенезі займає ангіотензин ІІ. Він сприяє фіброзу печінки, стимулюючи проліферацію, контрактильність фіброblastів, інфільтрацію запальних клітин, вивільнення запальних цитокінів, ростових факторів, таких як TGF- β , IL-1 β , MCP-1, PDGF, фактор росту сполучної тканини [5], які опосередковують відкладення колагену з акумуляцією екстрацелюлярного матриксу, контролюючи транскрипційну регуляцію фібрилярних колагенів і матриксних металопротеїназ [6].

Як відомо, ангіотензин ІІ утворюється з ангіотензину І за допомогою ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ), який вважається ключовим ензимом РАС [7]. У попередніх дослідженнях доведено, що рівень АПФ підвищується у пацієнтів з хронічним захворюванням печінки [6]. На активність АПФ впливає І/Д поліморфізм його гена, який характеризується наявністю (insertion (I)) чи відсутністю (deletion (D)) 287-основної пари ДНК послідовності в межах гена АПФ [8].

Враховуючи вищенаведені дані, можливо передбачити, що I/D поліморфізм гена АПФ впливає на характер прогресування фіброзу печінки при ХГС.

Мета дослідження: визначити залежність між I/D поліморфізмом гена АПФ та темпами прогресування хронічного гепатиту С.

Матеріали і методи. Обстежено 97 хворих на хронічний гепатит С з 1 генотипом HCV. Серед пацієнтів було 60 (61,86 %) чоловіків і 37 (38,14 %) жінок. Середній вік становив $37,78 \pm 11,83$ років. До контрольної групи увійшли 92 практично здорові особи віком від 21 до 62 років (середній вік $31,4 \pm 2,05$), серед них 44 (47,82%) чоловіка та 48 (52,18%) жінок. Клінічно та анамнестично у всіх обстежених були виключені інфекційні захворювання іншої етіології, загострення хронічних запальних процесів, психічні захворювання, а також зловживання алкоголем та прийом гепатотоксичних ліків.

Всім хворим проводилось клініко-лабораторне обстеження за загально визнаною методикою, черезшкірна пункційна біопсія печінки з оцінкою за шкалою METAVIR та визначення I/D поліморфізму гена АПФ (рис. 1).

ДНК з цільної крові виділяли за допомогою реагенту «ДНК-Експрес Кров» (ЛитТех, Росія). Поліморфну ділянку гена АПФ ампліфікували методом полімеразної ланцюгової

реакції на ампліфікаторі «Терцик» („ДНК-Технологія”, Москва). Аналіз I/D поліморфізму гена АПФ виконувався у НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія».

Хворі були поділені на дві групи залежно від темпів прогресування ХГС. До I групи увійшли пацієнти з повільним прогресуванням захворювання і наявністю стадії фіброзу F0-F2; до II – особи зі стадією фіброзу F3-F4 (термін інфікування в обох групах до 10 років).

Ступінь активності некрозо-запальних змін оцінювали за шкалою METAVIR: A0 – відсутність некрозо-запальної активності, A1 – мінімальна активність, A2 – помірна активність, A3 – виражена активність (рівень активності оцінюється за інтегральним показником важкості та інтенсивності перипортальних та лобулярних некрозів).

Статистична обробка даних проводилась із використанням пакета програм «STATISTICA 6,0».

Результати та їх обговорення. Згідно отриманих даних серед хворих на ХГС найпоширенішим був генотип DD гена АПФ – зустрічався в 1,7 разів частіше, ніж серед здорових осіб (65,98% проти 39,13%; рис. 1). На другому місці був генотип DI (20,62% – 20 хворих), що виявлявся майже в

два рази рідше, ніж у групі здорових (40,22% – 37 осіб). А найменша кількість хворих мала II генотип – 13,40% (13 осіб). Цей генотип в 1,5 разів частіше виявлявся у здорових людей (20,65% – 19 осіб).

Отже, серед наших пацієнтів спостерігається значне збільшення частоти генотипу DD (65,98% проти 40,22%) і зменшення кількості осіб з генотипами DI (20,62% проти 40,22%) та II (13,40% проти 20,65%), у порівнянні з особами контрольної групи. Відповідно, і алель D в 1,3 рази частіше, ніж у здорових, виявлявся у хворих на ХГС (76,29% проти 59,24%). Натомість алель I, навпаки, в 1,7 рази частіше виявлявся в здорових людей (40,76% проти 23,71%) (рис. 2).

Під час вивчення різниці в частоті генотипів та алелей гена АПФ між пацієнтами I і II груп було встановлено, що генотип DD у 1,7 рази частіше зустрічався серед хворих I групи (77,97% – 46 хворих) проти 47,37% (18 хворих); генотипи ж DI та II, навпаки, у 1,9 та у 3 рази частіше зустрічалися серед пацієнтів II групи (рис. 3). Встановлено, що алель D в 1,4 рази частіше зустрічалась у хворих з меншим темпом прогресування ХГС (85,59% проти 61,84%), а алель I у 2,7 рази більше в пацієнтів з швидким прогресуванням хвороби (38,16% проти 14,41% (профіброгенна роль) (рис. 4).

Аналіз гендерних відмінностей встановив, що в обох групах

переважали чоловіки. Статевий склад двох груп подібний: 23 жінки (38,98%) та 36 (61,02%) чоловіків у групі повільного прогресування ХГС і 14 жінок (36,84%) та 24 (63,16%) чоловіка в групі швидкого прогресування захворювання.

Аналіз розподілу I/D поліморфізму гена АПФ у хворих в групах повільного та швидкого прогресування ХГС згідно статі встановив, що генотип DD в 2,5 рази частіше зустрічався серед жінок I групи (21 жінка – 91,3%) проти 14 жінок (35,71%), а генотип DI в 4,8 рази – серед жінок II групи. Генотипу II не було ні в однієї жінки з повільним прогресуванням захворювання, проте він виявився у 3 (21,43%) жінок з групи швидкого прогресування ХГС. Частота виявлення алелю D була вищою в 1,7 разів у жінок I групи (95,65% проти 57,14%), а алелю I – майже в 10 разів у жінок другої групи (42,86% проти 4,35%). Серед чоловіків також спостерігалось збільшення в 1,3 раз частки хворих з генотипом DD (69,44% проти 54,17%) і в 1,2 рази алелю D (79,17% проти 64,58%) в першій групі, порівняно з другою, та зменшення в 2,2 рази частки генотипу II (11,2% проти 25%) і в 1,7 рази алелю I (20,83% проти 35,42%), проте серед чоловіків різниця не досягла рівня достовірності (таблиця 1).

Більшість хворих I групи мали мінімальну активність некрозопального процесу A1 – 39 (66,1%), що в 1,6 раз більше, ніж в другій групі (16

Таблиця 1

Розподіл частоти I/D поліморфізму гена АПФ згідно статі у хворих з повільним та швидким темпом прогресування ХГС

I/D поліморфізм гена АПФ	І група, n=59				ІІ група, n=38			
	Жінки, n=23		Чоловіки, n=36		Жінки, n=14		Чоловіки, n=24	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
DD	21	91,3*	25	69,44	5	35,71	13	54,17
DI	2	8,7**	7	19,44	6	42,86	5	20,83
II	0	0**	4	11,2	3	21,43	6	25
Алель D		95,65**		79,17		57,14		64,58
Алель I		4,35**		20,83		42,86		35,42

Примітки:

* $p < 0,001$ між жінками I і II груп,** $p < 0,01$ між жінками I і II груп.

осіб – 42,11%). Морфологічні зміни у тканині печінки, які відповідали помірній активності (A2), виявлені у половини хворих (19 осіб) II групи, що також в 1,6 разів перевищувало кількість пацієнтів з цими змінами в I групі (18 пацієнтів – 30,51%). Найменша кількість хворих обох груп мала виражені ознаки запального процесу в тканині печінки (A3). Таких було 2 (3,39%) у першій групі та 3 (7,89%) у другій.

Визначення зв'язку I/D поліморфізму гена АПФ зі ступенем активності некрозозапальних змін у тканині печінки у хворих з повільним та швидким прогресуванням ХГС встановило, що в групі з повільним прогресуванням ХГС генотипи DD в 1,5 рази частіше зустрічався у хворих з A1, ніж A2 (89,74% – 35 осіб) проти 61,11% (11 осіб); генотип DI, навпаки, визначався у хворих з A1 в 2,2 рідше, ніж з A2 та в 5 разів рідше, ніж у пацієнтів з A3. (10,26%; 4 особи), 22,22%

(4 особи) та 50% (1 особа), відповідно). Генотип II взагалі не виявили ні в одного хворого з A1, проте його мали 3 хворих (16,67%) з A2 та 1 хворий (50%) з A3. Відповідно, і частота алелю D була найвищою серед хворих першої групи з A1 – 94,87%, що в 1,3 рази більше, ніж у пацієнтів з A2, та в 3,8 рази більше ніж у хворих з A3 (72,22% та 25%, відповідно); частота ж алелю I у хворих з A3 в 15 та 2,7 рази була вищою, ніж у осіб з A1 та A2, відповідно (75%, 5,13%, 27,78%, відповідно). У групі зі швидким прогресуванням ХГС ми також спостерігали частішу наявність генотипу DD серед осіб з A1, ніж з A2 – різниця в 1,2 рази (56,25% проти 47,37%), а частота генотипу II виявилася в 5,3 та 2,5 рази вищою у пацієнтів з A3, ніж з A1 та A2, відповідно (66,7% проти 12,5% та 26,31%). У другій групі D алель у 4,3 рази частіше зустрічалась у хворих з A1, ніж A3 (71,88% проти 16,67%), і мали його в 1,2 рази більше хворих з

A1, ніж з A2 (71,88% проти 60,53%), а алель I домінувала серед пацієнтів з A3 і зустрічалась у 3 та 2,1 рази частіше, ніж у хворих з A1 та A2 (83,33% проти 28,12% та 39,47%) (таблиця 2).

тканині печінки. З'ясовано, що при A2 генотип DD та алель D у 1,3 рази та в 1,2 рази частіше зустрічаються у хворих I групи (61,11% проти 47,37%, 72,22% проти 60,53%, відпо-

Таблиця 2

Частота I/D поліморфізму гена АПФ у хворих на ХГС з повільним та швидким темпом прогресування фіброзу печінки при певному ступеню активності некрозозапальних змін у тканині

I/D АПФ	I група, N=59			II група, N=38		
	A1, N=39	A2, N=18	A3, N=2	A1, N=16	A2, N=19	A3, N=3
DD	35 (89,74%)*	11 (61,11%)	0	9 (56,25%)	9 (47,36%)	0
DI	4 (10,26%)**	4 (22,22%)	1 (50%)	5 (31,25%)	5 (26,32%)	1 (33,33%)
II	0**	3 (16,67%)	1 (50%)	2 (12,5%)	5 (26,32)	2 (66,67%)
D	94,87%*	72,22%	25%	71,88%	60,53%	16,67%
I	5,13%*	27,78%	75%	28,12%	39,47%	83,33%

Примітки:

* $p < 0,01$ між хворими на ХГС I і II груп з A1,

** $p < 0,05$ між хворими на ХГС I і II груп з A1.

Знайдена відмінність в розподілі генотипів гена АПФ між хворими I і II групи зі ступенем активності некрозозапального процесу A1. Так, генотип DD у 1,6 рази частіше виявлявся у хворих I групи (89,74% проти 56,25%), а генотип DI майже в 3 рази частіше – у хворих II групи (31,25% проти 10,26%). Генотип II не зустрічався серед наших хворих I групи з A1, в той час як його мали 2 (12,5%) хворих II групи з A1. Алель D у 1,3 рази частіше був у хворих I групи (94,87% проти 71,88%), а алель I у 5,5 рази частіше – у хворих II групи (28,12% проти 5,13%). Ці дані співвідносяться з розподілом генотипів та алелей у двох групах при відсутності врахування ступеню некрозозапальних змін в

відно), а генотип II та алель I у 1,6 рази і в 1,4 рази частіше – у хворих II групи. При A3 генотип DD не було виявлено, а генотипи DI – у 1 (50%) хворого I групи та 1 (33,33%) пацієнта II групи, II – у 1 (50%) хворого першої групи та у двох (66,67%) – другої. Проте достовірної різниці в розподілі генотипів при A2, A3 між хворими I і II груп не встановлено.

Висновки:

1. Встановлені відмінності в поліморфізмі гена АПФ у хворих на ХГС та здорових осіб. Так, генотип DD та алель D даного гена домінують у хворих на ХГС, у той же час, генотипи DI, II та алель I частіше зустрічаються серед здорових людей.

2. Алель D частіше визначався

у пацієнтів з меншим темпом прогресування ХГС, що свідчить про його протекторну роль, а алель I – у пацієнтів з швидким прогресуванням захворювання (профіброгенна роль).

3. Наявність алелю D та генотипу DD була характерна для жінок з повільним темпом прогресування захворювання, а алелю I, генотипів DI та II – для жінок зі швидким темпом прогресування ХГС. Хоча серед чоловіків спостерігалася подібна тенденція, вона виявилася недостовірною. Тому, за нашими даними, I/D поліморфізм має більше значення в прогнозуванні темпів прогресування ХГС саме у жінок.

4. Встановлена достовірна різниця в ступеню активності некрозопального процесу у хворих двох груп: при повільному прогресуванні ХГС у більшості пацієнтів вона становила A1, а при швидкому прогресуванні – A2. Як при повільному так і при швидкому темпі прогресування ХГС, алель D та генотип DD були характерні для осіб з A1 (протекторні), а алель I та генотип II – для пацієнтів з A3 (прозапальні).

5. Отримані дані допоможуть лікарю-клініцисту вирішувати питання індивідуального плану ведення ВГС-пацієнтів.

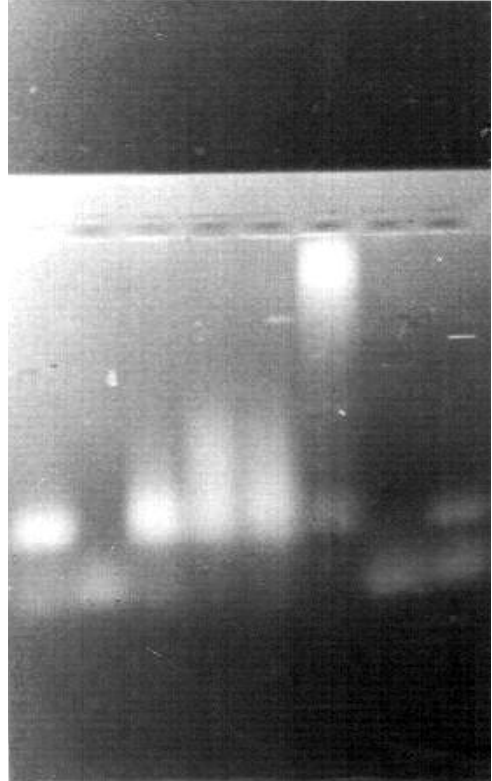


Рисунок 1. Визначення I/D поліморфізму гена АПФ.

Примітка. Електрофорез в 2,5% агарозному гелі в TBE-буфері при напрузі 2V на 1 см гелю. Доріжки в гелі зліва–направо: 1,3,8 – генотип DI; 2, 7 – генотип DD; 4,5,6 – генотип II.

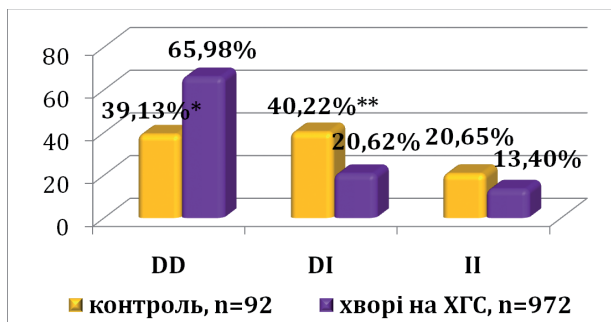


Рисунок 2. Частота I/D поліморфізму гена АПФ у хворих на ХГС та здорових осіб контрольної групи.

Примітки:

- * $p < 0,0001$ між хворими на ХГС та здоровими особами контрольної групи,

-** $p < 0,01$ між хворими на ХГС та здоровими особами контрольної групи.

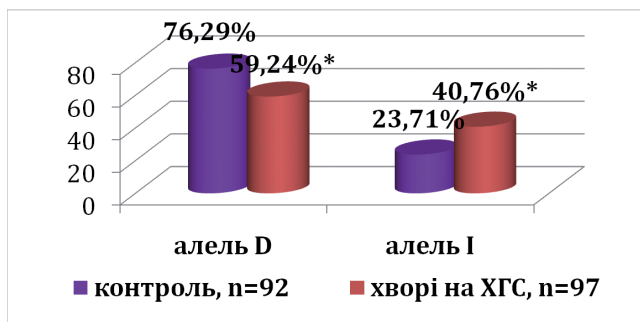


Рисунок 3. Частота алелей гена АПФ у хворих на ХГС та здорових осіб контрольної групи.

Примітка: -* $p < 0,01$ між хворими на ХГС та здоровими особами контрольної групи.

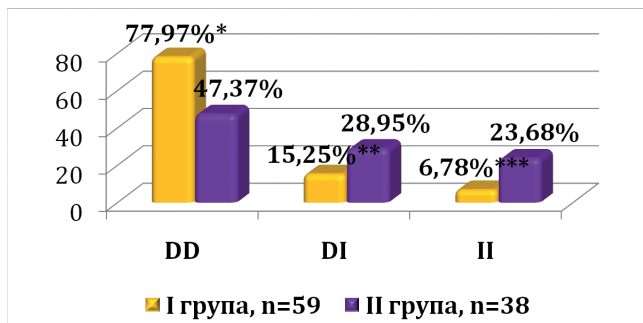


Рисунок 4. Частота I/D поліморфізму гена АПФ у хворих на ХГС з повільним (I група) та швидким (II група) прогресуванням захворювання.

Примітки:

-* $p < 0,001$ між I і II групами,

-** $p < 0,05$ між I і II групами,

-*** $p < 0,01$ між I і II групами.

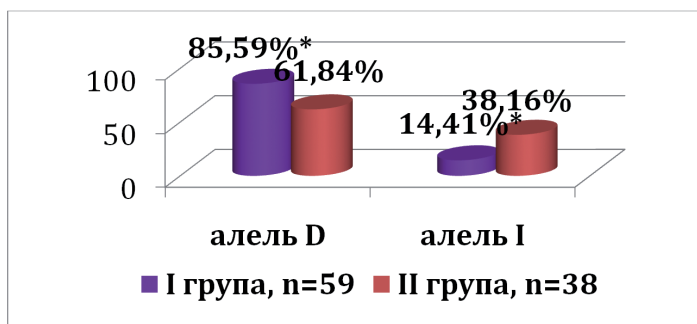


Рисунок 5. Частота алелей гена АПФ у хворих на ХГС з повільним (I група) та швидким (II група) прогресуванням захворювання.

Примітка: -* $p < 0,01$ між I і II групами.

Література

1. Burra P. HCV infection in haemodialysed patients: A role for serum IL-10 and TGF- β 1 in liver damage? / P. Burra, A. Masier, F. Morisco, DiLeoVetal. // Digestive and Liver Diseases – 2008.– V 40. – P 827-833.
2. Особенности специфического и неспецифического иммунного ответа при HCV-инфекции / В.Н. Козько, А.О. Соломенник, А.Е. Бондарь, Е.И. Могиленец, Н.Ф. Меркулова, Е.В. Юрко // Международный медицинский журнал. — 2011. — Т. 17, № 2. — С. 76-81.
3. Munshi M. K. The role of the rennin-angitensin system in liver fibrosis / M. K. Munshi, M. N. Uddin, S. S. Glaser // Experimental Biology and Medicine – 2011. – V. 236.- P. 557-566.
4. Koh S. L. Liver regeneration and tumor stimulation: implications of the rennin-angiotensin system / S. L. Koh, E. I. Ager, C. Christophi // Liver international -2010.- V. 30, N10.- P. 1414-1426.
5. Warner F. J. Liver fibrosis: a balance of ACEs? / F. J. Warner, J.S. Lubel, G. W. McCaughan, P. W. Angus // Clinical Science – 2007. –V. 113. –P. 109-118.
6. Forrest E. H. Polymorphisms of renin-angiotensin system and the severity of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection / E. H. Forrest, D. Thorburn, E. Spence, K. A. Oien et al. // Jornal of Viral Hepatitis – 2005. – V 12. – P. 519-524.
7. Mackawy M.H., Angiotensin converting enzyme (ACED/I) polymorphism and its relation to liver fibrosis progression in Egyptian patients with chronic hepatitis C virus infection / M.H. Mackawy, M.E.H. Badawy, O. Megahed // Egyptian Journal of Medical Human Genetics–2012. – V 13, N3. – P. 291-299.
8. Tompson W. R. Association of Genetic Factors with Selected Measures of Physical Performance / W. R. Thompson, S. A. Binder-Macleod // Physical Therapy -2006. –V. 86. – P. 585-591.