

## АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ IL-4, IL-10 И TNF $\alpha$ С БИОХИМИЧЕСКИМИ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У БОЛЬНЫХ ХГС

Е.Н. Усыченко, Е.М. Усыченко, Ю.И. Бажора

**Резюме.** В статье представлены исследования генетического профиля (IL-4 (C589T), IL-10 (G1082A) и TNF $\alpha$  (G308A), клинических и биохимических показателей у 100 больных хроническим гепатитом С, проживающих в Одесском регионе. Проведен их корреляционный анализ между собой с целью выявления возможных маркеров тяжести течения заболевания и его прогноза.

**Ключевые слова:** хронический гепатит С, прогрессирование заболевания, полиморфизм генов цитокинов

**Актуальность.** В настоящее время изучаются связи комбинации различных генов цитокинов с патогенетически значимыми количественными и качественными признаками заболевания. Однако, данные о влиянии генотипа по полиморфным вариантам генов цитокинов на изменчивость показателей, значимых для прогрессирования хронического вирусного гепатита, немногочисленны. При этом в исследуемую группу нередко включаются больные как ХГС, так и ХГВ.

Вирусный гепатит С характеризуется увеличением удельного веса хронических форм, приростом показателей смертности населения от цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [1, 2].

Вирусный гепатит С является основной причиной формирования хронических заболеваний печени. Это связано с тем, что вирус гепатита С является уникальным адаптогеном, он способен ускользать от иммунного контроля, создавая новые антигенные варианты, что способствует переходу острого гепатита С в хроническую форму в 70-80% случаев [3, 4, 5].

В формировании различных вариантов течения и исходов гепатита С и В важнейшую роль играет состояние иммунной системы больного [6, 7, 8].

Среди многочисленных факторов, которые определяют характер взаимодействия возбудителя и макроорганизма, влияют на хронизацию HCV – инфекции, а также модифицируют скорость фиброгенеза в печени. Особая роль принадлежит генетическим факторам, считается, что полиморфизм генов цитокинов оказывает значительное влияние на характер течения хронического гепатита [9, 10, 11].

В исследованиях ряда авторов показано, что генетический статус человека по полиморфным вариантам ряда генов цитокинов является важнейшим

фактором, определяющим такие патогенетические признаки для течения хронических вирусных гепатитов, как количественное содержание цитокинов, а также уровень биохимических показателей крови [12, 13, 14].

Биохимические показатели крови, такие как уровень АлАт, АсАт, билирубина и его фракций, щелочная фосфатаза служат для определения функционального состояния печени как в норме, так и при различной патологии. Синдром цитолиза оценивается путем определения активности в сыворотке крови «печеночных» ферментов АлАт и АсАт. Состояние пигментного обмена – по уровню билирубина и его фракций. Синтетическая функция характеризуется уровнем белка, альбумино-глобулиновым и протромбиновым индексом.

Функциональное состояние печени, как общеизвестно, определяется на основании оценки показателей синдрома цитолиза, пигментного обмена, синдрома холестаза, мезенхимально-воспалительного синдрома, синтетической функции печени, которую характеризует протромбиновый индекс.

В связи с выше изложенным представляется актуальным изучение «индивидуального» ответа организма больного на воздействие вируса гепатита С и В путем выявления возможной ассоциации полиморфных вариантов генов IL-4, IL-10 И TNF $\alpha$  с уровнем биохимических показателей.

Учитывая, что анализ данных об ассоциации полиморфизма генов цитокинов с биохимическими показателями у больных ХГС нередко противоречив и зависит от этнической группы. Поэтому, представляется целесообразным провести анализ ассоциации комбинации генов цитокинов IL-4 (C589T), IL-10 (G1082A) И TNF $\alpha$  (G308A) среди лиц, проживающих в Одесском регионе с клинической симптоматикой заболевания и основными биохимическими показателями.

**Целью исследования** является корреляционный анализ полиморфизма генов IL-4 (C589T), IL-10 (G1082A) И TNF $\alpha$  (G308A) у больных ХГС с биохимическими и иммунологическими показателями, а также степенью фиброза у больных ХГС.

### **Материалы и методы**

Обследовано 100 пациентов с ХГС, возраст которых варьировал от 18 до 62 лет. Средний возраст всех пациентов составил  $42 \pm 3,08$  лет. Пациенты, включенные в данное исследование, находятся на диспансерном учете в гепатоцентре КП «Одесская городская клиническая инфекционная больница». Все пациенты, включенные в исследование, проживают в Одесском регионе, в группах исследования лиц мужского пола было 44%, а лиц женского пола – 56%. Длительность болезни не превышает 10 лет.

Группа контроля представлена 30 практически здоровыми лицами, их средний возраст составляет  $32 \pm 1,05$  года. Количество лиц женского и мужского пола было одинаковым (15 человек).

При постановке диагноза хронического гепатита С учитывали данные анамнеза и клинические показатели (слабость, повышенная утомляемость, снижение работоспособности, недомогание, потливость, кожный зуд, снижение или отсутствие аппетита, тошнота, чувство тяжести в правом подреберье, неустойчивый стул, желтуха, проявления геморрагического синдрома, гепатомегалия, спленомегалия). У всех больных исследовали общий анализ крови, общий анализ мочи, концентрацию общего билирубина в сыворотке крови и его фракций, активность АЛТ, концентрацию общего белка и его фракций, протромбиновый индекс, ЩФ.

Для подтверждения диагноза хронического гепатита С были использованы основные серологические маркеры (анти-НСV-IgM, качественное и количественное определение РНК НCV с помощью ПЦР, а также генотипа вируса).

Оценка морфологических изменений в печени (степень активности и выраженность фибротических изменений) определяли по шкале METAVIR с использованием неинвазивного метода Fibrotest.

Молекулярно-генетические исследования включали определение полиморфных вариантов генов IL-4(C589T), IL-10(G1082A), TNF $\alpha$  (G308A). Полиморфизм изучался при помощи амплификации соответствующих участков генома методом ПЦР. Исследования проводились на базе Немецкого диагностического центра им. Св. Павла (г. Одесса).

*Таблица 1*

**Характеристики исследованных полиморфизмов**

Ген	Полиморфизм	Название праймера	Нуклеотидная последовательность
IL-4	C589T	rs2243250	5'-TAAACTTGGGAGAACATGGT-3'
IL-10	G1082A	rs1800896	5'-CCT ATC CCT ACT TCC CCT-3'
TNF $\alpha$	G308A	rs1800620	5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GC-3'

Определение субпопуляций Т и В лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+) проводилось иммунофлюоресцентным методом с помощью набора моноклональных и поликлональных антител для установления дифференциальных антигенов лимфоцитов человека с использованием иммунофлюоресцентного микроскопа «Евростар».

Результаты иммунологических исследований приведены в виде средней арифметической (M) и ошибки средней арифметической ( $\pm m$ ). С целью выявления корреляционных зависимостей между отдельными показателями были применены коэффициент корреляции Спирмена.

Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли с помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона. Частоты аллелей и генотипов в группах сравнивали с применением критерия  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность при числе степеней свободы равно 1.

## Результаты исследования и их обсуждение

Клиническое течение ХГС в группе обследованных больных характеризовалось отсутствием цикличности заболевания. Астеновегетативный синдром наблюдался у всех больных (100%), диспепсический - в 86 пациентов (86%), артралгический - у 41 (41%). Желтуха наблюдалась редко (11%), была слабо выраженной и непродолжительной. У большинства больных была обнаружена гепатомегалия (92%), реже - спленомегалия (45%).

Анализ биохимических показателей у больных ХГС с разной степенью активности процесса свидетельствует о том, что у большинства обследованных лиц (92%) уровень общего билирубина оставался в пределах нормы. У больных с умеренной активностью средний уровень общего билирубина составил  $21,2 \pm 1,4$  мкмоль/л.

В большинстве случаев отмечалось повышение активности трансаминаз, среднее значение составило: АлАт –  $1,39 \pm 0,7$  ммоль/л час, АсАт –  $1,25 \pm 0,8$  ммоль/л час. Тимоловая проба повышалась в среднем до  $5,8 \pm 0,9$  единиц. Индекс де Ритиса (соотношение АсАт и АлАт) в среднем составил  $0,87 \pm 0,64$ . Содержание общего белка у больных ХГС составило  $74,12 \pm 0,72$  г/л, альбуминов - в среднем  $43,74 \pm 0,66$  г/л, а глобулинов -  $30,38 \pm 0,18$  г/л, альбумино-глобулиновый индекс составил -  $1,44 \pm 0,02$ . Содержание щелочной фосфатазы оставалось в пределах нормы ( $91,20 \pm 6,72$  ед/л). Протромбиновый индекс составил в среднем  $97,05 \pm 0,48\%$ .

При анализе динамики основных клинических синдромов установлено, что у больных ХГС со степенью фиброза F0-F1 наблюдалось менее выраженное изменение общего состояния, чем у больных со степенью фиброза F2-F3. Изучение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных ХГС до начала лечения установило достоверно низкую экспрессию CD3+, CD4+, CD16+ и увеличение количества клеток, экспрессирующих антигены CD8+ и CD19+ по сравнению с показателями здоровых лиц ( $p < 0,05$ ). При этом значительное снижение количества CD4+ наблюдалось у 65% больных; снижение CD16+ - у 46,97% обследованных больных ХГС (табл. 2).

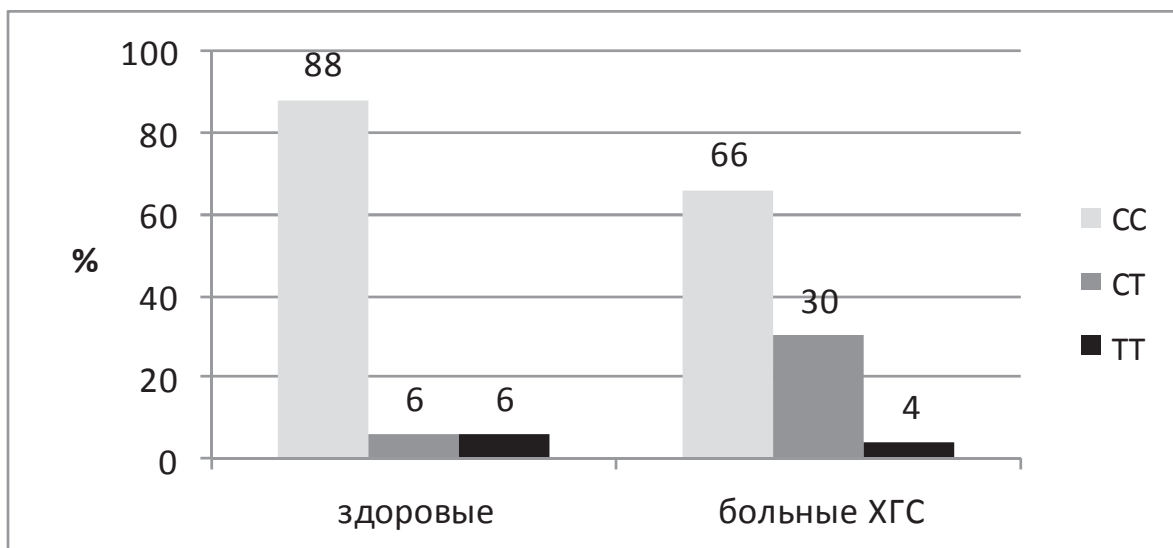
Таблица 2

### Иммунологические показатели у больных ХГС и здоровых лиц (M±m)

Показатели	Больные ХГС, n=100	Здоровые лица, n = 30
CD3+, %	$32,29 \pm 4,66^+$	$71,81 \pm 4,50$
CD4+, %	$27,97 \pm 4,49^+$	$41,22 \pm 4,92$
CD8+, %	$24,07 \pm 4,28^+$	$20,51 \pm 4,04$
CD16+, %	$7,89 \pm 2,70^+$	$14,14 \pm 3,48$
CD19+, %	$15,29 \pm 3,60^+$	$10,83 \pm 3,12$

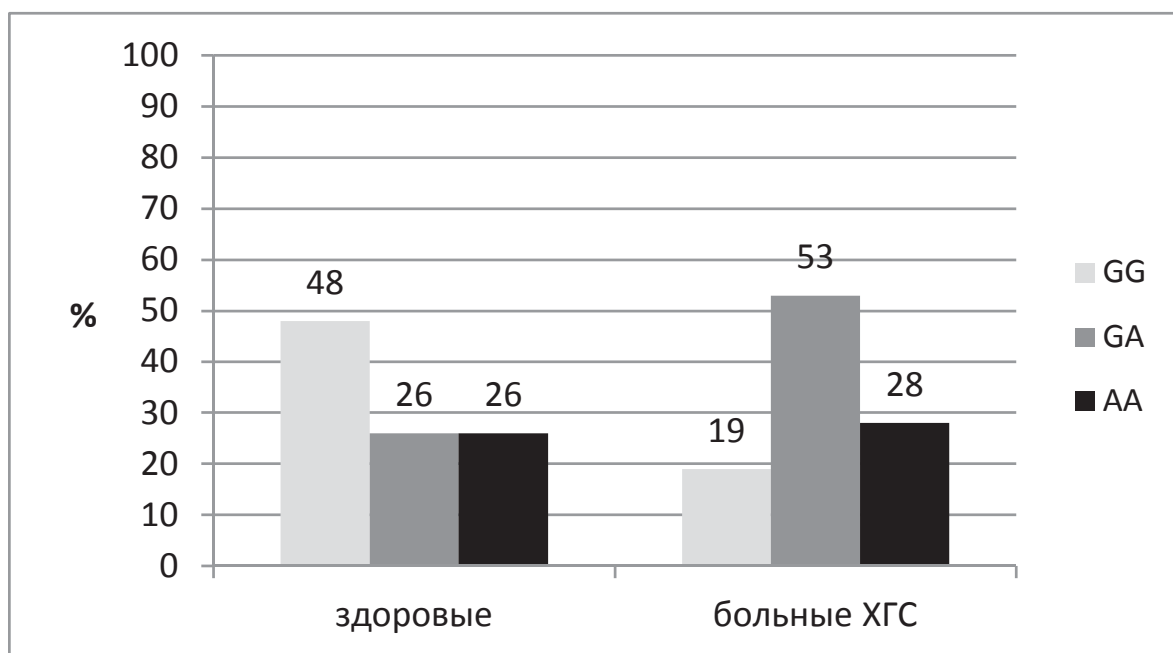
<sup>+</sup> –разница показателей достоверна в сравнении с показателями здоровых людей ( $P < 0,05$ ).

При исследовании аллельного полиморфизма IL-10 (G1082A), IL-4 (C589T) и TNF  $\alpha$  (G308A) выявлены существенные различия в контрольной и исследуемой группе больных.



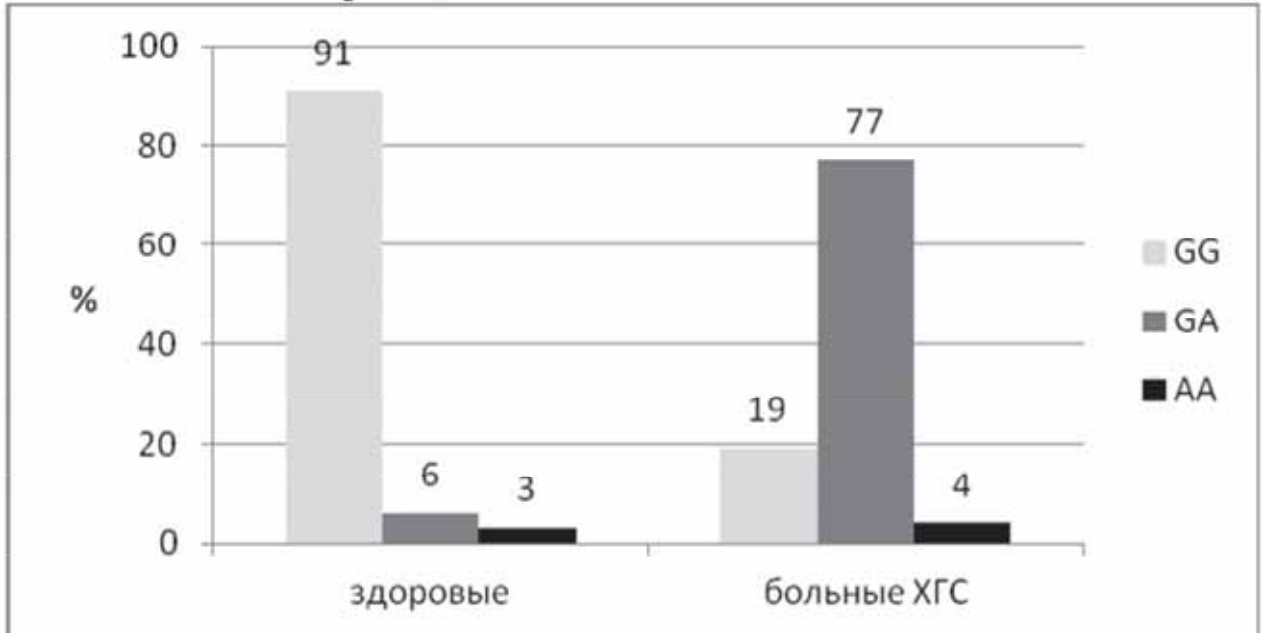
**Рис. 1.** Распределение частот встречаемости генотипов IL-4 (C589T) у больных ХГС и здоровых лиц

У здоровых лиц значительно преобладал гомозиготный генотип CC IL-4 (C589T) (рис. 1). У больных ХГС также отмечалось его преобладание, но в значительно меньшей степени ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2 = 4,77$ ). Кроме того, у больных ХГС значительно чаще встречался гетерозиготный генотип CT IL-4 (C589T) ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2 = 6,78$ ). У здоровых лиц частота аллели C составила 0,9; аллели T – 0,1. У больных – соответственно 0,81 и 0,19.



**Рис. 2.** Распределение частот встречаемости генотипов IL-10 (1082G/A) у больных ХГС и здоровых лиц

У здоровых лиц преобладал гомозиготный генотип СС IL-10 (1082G/A) ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2 = 9,33$ ). При исследовании полиморфизма IL-10 (1082G/A) у больных ХГС установлено преобладание гетерозиготной аллели (комбинация GA у 53% больных) ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2 = 6,44$ ). У здоровых лиц частота аллели G составила 0,6; аллели A – 0,4. У больных – соответственно 0,46 и 0,54. (рис. 2)



**Рис. 3.** Распределение частот встречаемости генотипов TNF  $\alpha$  (G308A) у больных ХГС и здоровых лиц

При изучении аллельного полиморфизма TNF  $\alpha$  (G308A) в контрольной группе выявлено преобладание гомозиготного типа генотипа GG TNF  $\alpha$  (G308A) у 91% ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2 = 50,88$ ). У больных ХГС отмечалось преобладание гетерозиготной аллели GA (77%) ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2 = 47,88$ ). У здоровых лиц частота аллели G составила 0,93; аллели A – 0,07. У больных – соответственно 0,58 и 0,42. (рис. 3).

Для оценки ассоциации активности воспалительного процесса, степени изменений печеночной ткани, показателей клеточного иммунитета и аллельного полиморфизма генов все больные были разделены на три группы: с отсутствующим или минимальным фиброзом (F0- F1) – 46%, умеренным фиброзом (F2) – 31% и с выраженным фиброзом (F3) – 23%.

Взаимосвязь фиброза печеночной ткани, показателей клеточного иммунитета и аллельного полиморфизма исследуемых генотипов оценивали при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Установлено наличие следующих корреляционных связей:

➤ прямая корреляционная связь между генотипами IL-4 и содержанием CD3+,  $p < 0,05$  (большее содержание CD3+ отмечается у носителей генотипа СС, меньшее содержание CD3+ – у носителей генотипа ТТ);



➤ прямая корреляционная связь между генотипами IL-4 и активностью АлАт и АсАт,  $p < 0,01$  (меньшая активность АлАт и АсАт отмечается у носителей генотипа СС, большая активность АлАт и АсАт – у носителей генотипа ТТ);

➤ обратная корреляционная связь между генотипами TNF $\alpha$  и активностью АлАт и АсАт,  $p < 0,01$  (меньшая активность АлАт и АсАт отмечается у носителей генотипа GG, большая активность АлАт и АсАт – у носителей генотипа AA);

➤ обратная корреляционная связь между содержанием CD3+ и активностью АлАт и АсАт (низкое содержание CD3+ клеток соответствует более высокой активности трансаминаз),  $p < 0,05$ .

Выраженность некровоспалительного процесса в печеночной ткани была более значительной при быстром прогрессировании фиброза. Можно предположить, что комбинации генотипов СС IL-4 и GG TNF $\alpha$  обладают противовоспалительной активностью, так как они доминируют у больных со степенью фиброза F0-F1 и менее выраженным дисбалансом иммунного статуса. Возможно, комбинации генотипов ТТ IL-4 и AA TNF $\alpha$  ассоциируются профиброгенным эффектом, так как они обнаружены у пациентов с фиброзом F2-F3.

Таким образом, при ХГС носители генотипов ТТ IL-4 и AA TNF $\alpha$  характеризуются более высоким уровнем повреждения гепатоцитов и степенью выраженности мезинхимального воспаления.

Наличие взаимосвязи активности трансаминаз, иммунологических показателей и определенных генотипов IL-4 и TNF $\alpha$  позволяет использовать полученную информацию как один из критериев активности воспалительного процесса в печени. Выраженность изменений показателей клеточного иммунитета является дополнительным критерием степени морфологических нарушений в печеночной ткани.

### **Выводы**

Полученные данные могут помочь практическому врачу-клиницисту в прогнозировании течения ХГС, что непосредственно взаимосвязано с индивидуальным планом ведения пациента с хроническим гепатитом С.

### **Литература**

1. Ивашкин В.Т. Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С / В.Т. Ивашкин, Н.Д. Ющук, М.В. Маевская [и др.] // РЖГГК. – 2013. – №23 (2). – С.41-70.

2. Козько В.М. Клініко-епідеміологічні характеристики хронічної форми HCV-інфекції / В.М. Козько, Н.В. Анциферова, Г.О. Соломенник [та ін.] // Гепатологія. – 2012. – №4. – С. 77-83.

3. Ивашкин В.Т. Иммунный гомеостаз и иммунные заболевания пече-

ни / В.Т. Ивашкин // РЖГГК. – 2009. – № 3. – С. 4-12.

4. Kanda T. Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma / T. Kanda, O.Yokosuka, M. Omata // Biology. – 2013. – Vol. 2. – P. 304–316.

5. 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. – С. 3-11.

6. Иммунопатогенез вирусного гепатита С. Иммунологические маркеры прогрессирования заболевания / Ю.В. Лобзин, В.Ю. Никитин, И.А. Сухина [и др.] // Медицинская генетика. – 2011. – № 10. – С. 37-43.

7. Гончарова И.А. 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. – № 12. – С. 20-24.

8. Мороз Л.В. Іміногенетичний профіль у хворих на хронічний гепатит С / Л. В. Мороз, І.В. Яцик // Гепатологія. – 2011. – №2. – С. 28-33.

9. Николаева Л.И. Анализ влияния генетических факторов вируса гепатита С и полиморфизма генов инфицированных людей на развитие фиброза печени / Л.И. Николаева, А.В. Колотвин, Л.М. Самоходская [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. – № 5. – С. 7-13.

10. Самоходская Л.М. Прогностическое значение комбинации аллельных вариантов генов цитокинов и гемохроматоза у больных хроническим гепатитом С / Л.М. Самоходская, Т.М. Игнатова, С.М. Абдуллаев [и др.] // РЖГГК. – 2007. – № 2. – С. 50-56.

11. Авдошина В.В. Распределение аллелей полиморфных участков промоторов генов интерлейкина-4 C-590TIL-4 и генов рецепторов к нему IL-4RA Q-576R и 4RA ILE-50VAL среди больных вирусным гепатитом С / В.В. Авдошина, В.И. Коненков, В.В. Дортман [и др.] // Журнал микробиологии. – 2007. – №1. – С. 43-46.

12. Гончарова И.А. Генетические факторы подверженности к хронизации вирусного гепатита и фиброзу печени / И.А. Гончарова, Е.В. Белобородова, М.Б. Фрейдин [и др.] // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42, № 2. – С. 238-241.

13. Afzal M.S. Analysis of interleukin-10 gene polymorphisms and hepatitis C susceptibility in Pakistan / M.S.Afzal, S.Tahir, A.Salman [et al.] // J.Infect.Dev.Ctries – 2011. – Vol.5(6). – P. 473–479.

14. Семенова Н.А. Роль полиморфизма гена IL6-174C/G в развитии хронической HCV – инфекции / Н.А. Семенова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. № 5. – С. 93-97.



## АНАЛІЗ АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ ЦИТОКІНІВ ІL-4, ІL-10 І TNF З БІОХІМІЧНИМИ І ІМУНОЛОГІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ У ХВОРИХ НА ХГС

К.Н. Усиченко, К.М. Усиченко, Ю.І. Бажора

**Резюме.** У статті представлені дослідження генетичного профілю (IL-4 (C589T), IL-10 (G1082A) і TNF $\alpha$  (G308A), клінічних і біохімічних показників у 100 хворих на хронічний гепатит С, які проживають в Одеському регіоні. Проведений їх кореляційний аналіз між собою з метою виявлення можливих маркерів тяжкості перебігу захворювання та його прогнозу.

**Ключові слова:** хронічний гепатит С, прогресування захворювання, поліморфізм генів цитокінів

## THE ANALYSIS OF POLYMORPHISM'S ASSOCIATION OF CYTOKINE GENES IL-4, IL-10 AND TNF WITH BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL INDICATORS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

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

**Resume.** The article presents studies of the genetic profile IL-4 (C589T), IL-10 (G1082A) and TNF $\alpha$  (G308A), clinical and biochemical indices in 100 patients with chronic hepatitis C living in the Odessa region. There is detection of possible markers of severity of the course of the disease and its prognosis.

**Key words:** chronic hepatitis C, disease progression, polymorphism of cytokine genes

УДК 616.833-092:616.36-002-036.7:[ -056.83

## ДИНАМІКА БІОХІМІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ВЕГЕТАТИВНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ У ХВОРИХ НА ГОСТРИЙ ГЕПАТИТ В ІЗ ХРОНІЧНИМ ВЖИВАННЯМ АЛКОГОЛЮ В ГЕПАТОТОКСИЧНИХ ДОЗАХ

О.О. Фурик, О.В. Рябоконт, Т.Є. Оніщенко,  
В.Г. Савельєв, Д.А. Задирака

**Резюме.** В роботі показано, що у хворих на гострий гепатит В із хронічним вживанням алкоголю в гепатотоксичних дозах відбуваються більш виражені функціональні порушення стану вегетативної нервової