

Л.И. Николаева<sup>1</sup>, А.В. Колотвин<sup>1,2</sup>, Л.М. Самоходская<sup>2</sup>, Г.В. Сапронов<sup>3</sup>, В.В. Макашова<sup>4</sup>, Е.И. Самохвалов<sup>1</sup>, С.В. Альховский<sup>1</sup>, А.Е. Гришечкин<sup>1</sup>, Н.М. Беляева<sup>3</sup>, Р.А. Гибадулин<sup>1</sup>

## АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛЮДЕЙ НА РАЗВИТИЕ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

<sup>1</sup>ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы; <sup>3</sup>ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования, 123995, Москва, Баррикадная ул., 2/1; <sup>4</sup>ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии, 111123, Москва, Новогиреевская ул., 3а

Цель исследования – выявить зависимость скорости развития фиброза печени (ФП) от генетических факторов вируса гепатита С (ВГС) и однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) генов инфицированных людей. В трех группах пациентов с разной скоростью развития ФП анализировали подтип ВГС, вирусную нагрузку, количество квазивариантных форм и наличие межгенотипной рекомбинации, а также ОНП человеческих генов цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-28B, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), наследственного гемохроматоза (HFE) и генов, вовлеченных в развитие эндотелиальной дисфункции (eNOS) и оксидативного стресса (CYBA).

Во всех группах больных преобладал ВГС субтипа 1b. В группах с умеренной и быстрой скоростью развития ФП выявлена более высокая вирусная нагрузка, чем в группе с медленным развитием фиброза. Для последней группы больных характерно большее, чем для остальных групп, количество генетических вариантов по зоне белка E2. Рекомбинантная РНК ВГС (2k/1b) была обнаружена в группах с умеренным и быстрым развитием ФП. Анализ ОНП генов пациентов выявил статистически значимую зависимость между быстрым формированием ФП и аллельными вариантами генов IL-1 $\beta$  (-511 TT), IL-10 (-1082 AA), TNF- $\alpha$  (-238 GA или AA) и HFE (C282Y или Y282Y). В остальных ОНП проанализированных генов ассоциации со скоростью развития ФП не обнаружено.

Ключевые слова: гепатит С, геном вируса, полиморфизм генов, фиброз печени

L. I. Nikolaeva<sup>1</sup>, A. V. Kolotvin<sup>1,2</sup>, L. M. Samokhodskaya<sup>2</sup>, G. V. Sapronov<sup>3</sup>, V. V. Makashova<sup>4</sup>, E. I. Samokhvalov<sup>1</sup>, S. V. Al'khovskiy<sup>1</sup>, A. E. Grishchkin<sup>1</sup>, N. M. Belyaeva<sup>3</sup>, R. A. Gibadulin<sup>1</sup>

ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF GENETIC FACTORS OF HEPATITIS C VIRUS AND GENE POLYMORPHISM IN INFECTED PATIENTS ON THE DEVELOPMENT OF LIVER FIBROSIS

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution D.I. Ivanovsky Institute of Virology of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation, 16, Ulitsa Gamalei, 123098; <sup>2</sup>Federal State Educational Institution of Higher Professional Education M.V. Lomonosov, Moscow State University, 1, Vorobyovy gory, Moscow, Russian Federation, 119991; <sup>3</sup>State Budgetary Educational Institution of Additional Professional Education Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 2/1, Ul. Barrikadnaya, Moscow, Russian Federation, 123995; <sup>4</sup>Federal Budget Institution of Science Central Research Institute of Epidemiology of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, 3a, Ul. Novogireevskaya, Moscow, Russian Federation, 111123

The purpose of the study - to reveal the dependence of the rate of development of liver fibrosis (LF) on genetic factors of hepatitis C virus (HCV) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the genes of infected people. In the three groups of patients with different rates of development of LF, HCV subtype, viral load, the number of quasi-variant forms and the presence of intergenotype recombination, SNPs of human cytokine genes (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-28B, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1), hereditary hemochromatosis (HFE), genes involved in the development of endothelial dysfunction (eNOS) and oxidative stress (CYBA) were analyzed. In all groups of patients with HCV subtype 1b prevailed. In the groups with moderate and fast speed of development of LF viral load was revealed to be higher than in the group with the slow development of fibrosis. The number of genetic variants within E2 protein zone in the latter group of patients is characterized to be more than in other groups. Recombinant HCV RNA (2k/1b) was found in the groups with moderate and rapid development of LF. SNP analysis of genes of patients showed a statistically significant relationship between the rapid formation of LF and allelic variants of IL-1 $\beta$  (-511 TT), IL-10 (-1082 AA), TNF- $\alpha$  (-238 GA or AA) and HFE (S282Y or Y282Y) genes. In other SNPs of analyzed gene there no association with speed of LF was found.

Key words: hepatitis C, virus genome, gene polymorphism, liver fibrosis

Вирусный гепатит С - инфекционное заболевание с парентеральным способом передачи, представляющее серьезную проблему для здравоохранения нашей страны из-за отсутствия вакцинопрофилактики, сложности с ранней диагностикой и дорогостоящей и не всегда эффективной терапией. В большинстве случаев после острой инфекции развивается храни-

ческий гепатит С (ХГС), который может протекать в легкой, умеренной или тяжелой форме, приводящей к развитию цирроза печени (ЦП) и/или гепатоклеточной карциномы. До сих пор нет четкого представления о причинах, приводящих к разной скорости формирования фиброза печени (ФП) у больных ХГС. Очевидно, что совокупность генетических факторов как вируса гепатита С (ВГС), так и самого больного определяет степень тяжести течения гепатита и влияет на формирование ФП [13, 36, 37].

ВГС принадлежит к семейству *Flaviviridae*, к роду *Hepacivirus*. Геном вируса представлен одно-

Для корреспонденции: Николаева Людмила Ивановна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. генно-инженерных препаратов, e-mail: L.I.Nikolaeva@mail.ru

цепочечной РНК с положительной полярностью и содержит около 9,6 тыс. нуклеиновых оснований. В геноме выявлен один ген, ограниченный с 5'- и 3'-концов нетранслируемыми областями. Ген кодирует большой белок-предшественник (полипротеин), из которого с участием клеточных и вирусных ферментов образуются все полипептиды ВГС. Структурные протеины вируса, формирующие вирион, представлены сердцевинным (core) белком и двумя оболочечными гликопротеинами (E1 и E2). Неструктурные полипептиды ВГС, участвующие в процессинге, репликации, инициации сборки вириона и влияющие на вирулентность, представлены виропорином (p7), NS2-протеазой, сериновой протеазой-хеликазой (NS3), кофактором сериновой протеазы (NS4a), компонентами репликативного комплекса (NS4b и NS5a) и РНК-зависимой РНК-полимеразой (NS5b).

Для ВГС характерен выраженный генетический полиморфизм. Участки с варибельной нуклеотидной последовательностью обнаружены в разных зонах генома. Структура одной из таких зон, а именно NS5b, положена в основу классификации вируса на отдельные генотипы и подтипы (субтипы) [38]. Наиболее изменчивым является участок генома, кодирующий белок E2, особенно зона 1-го гиперварибельного региона (1ГВР). При ВГС-инфекции в каждом инфицированном человеке вирус представлен набором близкородственных генетических вариантов (часто называемых квазивариантами), количество которых обычно определяют по числу последовательностей РНК зоны 1ГВР.

На такой генетический полиморфизм ВГС накладывается однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) генов инфицированных людей, что, очевидно, приводит к разнообразию степени тяжести клинических проявлений гепатита и к разной скорости формирования ФП. В последние годы отмечается повышенный интерес к исследованию генетических детерминант прогрессирования гепатита С [1–3, 9, 30]. Однако полученные результаты часто противоречивы и относятся только к больным определенного этнического происхождения [2, 9, 30]. Для пациентов восточнославянского происхождения таких исследований выполнено мало [1].

Основной мишенью при гепатите С является печень, в которой на фоне воспалительных процессов развивается фиброз – чрезмерное накопление внеклеточных матричных протеинов, особенно коллагена. Результатом выраженного ФП являются цирроз, печеночная недостаточность и портальная гипертензия. Наиболее интенсивно продуцируют коллаген при гепатите активированные звездчатые клетки, портальные фибробласты и миофибробласты из красного костного мозга. Эти клетки активируются некоторыми цитокинами. Ускорять фиброз могут оксидативный стресс, сосудистая дисфункция и чрезмерное накопление железа в печени. Однако эти процессы находятся под влиянием многих белков, кодируемых генами, в которых обнаружены ОНП.

Учитывая все вышесказанное, нами был изучен полиморфизм генов цитокинов: IL-1β (-511 C >

T), IL-6 (-174 G > C), IL-10 (-1082 G > A), IL-28B (rs8099917 C > T, rs12979860 T > G), TNF-α (-238 G > A), TGF-β1 (G915C); гена наследственного гемохроматоза HFE (H63D, C282Y); генов сосудистой дисфункции eNOS (C894T) и оксидативного стресса (CYBA C242T). Одновременно учитывались генетические факторы ВГС: субтипы, количество квазивариантов, вирусная нагрузка и наличие межгенотипной рекомбинации.

## Материалы и методы

Проанализированы образцы крови от 130 пациентов (60 мужчин и 70 женщин в возрасте 18–77 лет, средний возраст  $44,5 \pm 1,9$  года) с ХГС, без маркеров других острых или хронических вирусных гепатитов и ВИЧ-инфекции.

В зависимости от скорости развития ФП участники исследования были поделены на группы: с низкой скоростью – до 0,10 ед/год, с умеренной – 0,11–0,19 ед/год и с быстрой скоростью – свыше 0,19 ед/г. Последнюю группу составили пациенты в цирротической стадии ХГС. Сведения о группах пациентов представлены в табл. 1. Величину ед/год получали после деления стадии фиброза, выраженной по шкале METAVIR, на время, за которое она получена.

Стадию ФП оценивали методом кратковременной эластографии печени, выполненной с помощью аппарата «Фиброскан» («Echosense», Франция). Этот метод основан на регистрации отраженного ультразвукового колебания средней амплитуды и низкой частоты. Ультразвуковой сигнал, проходя через ткань печени, приобретает сдвиг и изменяет скорость в зависимости от эластичности ткани. В процессе анализа исследуется эластичность фрагмента печени объемом  $1 \times 4$  см на глубине 2,5–6,5 см от поверхности кожи. Показатели эластичности печени, выраженные в килопаскалях, соответствуют единицам шкалы METAVIR.

РНК ВГС выявляли методом ОТ-ПЦР (обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция), как описано ранее [5]. Генотипирование и определение межгенотипной рекомбинации выполняли секвенированием областей генома 5'-NTR-core и NS5b, используя референсные последовательности из базы данных GenBank NCBI (США). Вирусную нагрузку определяли с помощью коммерческих тест-систем «ОТ-гепатоген-С-количественный» («ДНК-технология», Россия) и «РеалБест РНК ВГС» («Вектор-Бест», РФ). Определение количества квазивариантов по участку генома, соответствующему 1ГВР белка E2, проводили методом одноцепочечного конформационного полиморфизма по методике, описанной ранее [6].

Иммуноглобулины М и G, специфичные к вирусным антигенам, выявляли и титровали с помощью коммерческих иммуноферментных тест-систем «Бест анти-ВГС-IgM» и «Бест анти-ВГС-спектр» («Вектор-Бест», РФ) [6].

Геномную ДНК пациентов выделяли из лимфоцитов периферической крови, стабилизированной ЭДТА, с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-В, ва-

Характеристика групп больных

Показатель	Группа		
	с медленным развитием ФП ( <i>n</i> = 40)	с умеренным развитием ФП ( <i>n</i> = 40)	с быстрым развитием ФП ( <i>n</i> = 50)
Возраст, годы	40,8 ± 2,2	42,3 ± 1,9	50,5 ± 1,7
Мужчины, %	37,5	50,0	50,0
Женщины, %	62,5	50,0	50,0
Скорость формирования ФП, ед/год	0,06 ± 0,05	0,17 ± 0,02	0,21 ± 0,01
Длительность ХГС <sup>1</sup> , годы	11,0 ± 0,6	12,2 ± 0,9	20,9 ± 0,9
АЛТ, превышение нормы	1,23 ± 0,04	3,36 ± 0,40	3,38 ± 0,46
АСТ, превышение нормы	1,07 ± 0,02	2,30 ± 0,31	2,34 ± 0,19
Анти-ВГС-IgM <sup>2</sup> , титр	3,78 ± 0,31 (67,5%)	3,10 ± 0,58 (75%)	4,57 ± 0,19 (84%)
Анти-core-IgG, титр	11,16 ± 0,70	10,69 ± 0,27	10,20 ± 0,36
Анти-NS3-IgG, титр	7,74 ± 0,53	7,96 ± 0,58	7,00 ± 0,56
Анти-NS4ab-IgG, титр	7,76 ± 0,60	7,69 ± 0,68	6,18 ± 0,47
Анти-NS5a-IgG, титр	7,75 ± 0,44	7,74 ± 0,54	6,11 ± 0,50

Примечание. <sup>1</sup> – длительность ХГС вычисляли от первого обнаружения антител к ВГС или факта острого гепатита С; <sup>2</sup> – титр антител выражен как логарифм по основанию 2-го конечного разведения сыворотки крови. В скобках отмечена частота обнаружения анти-ВГС-IgM в группах.

Результаты анализа генетических параметров ВГС у больных сравниваемых групп представлены в табл. 2. Во всех группах достоверно чаще регистрировался вирус подтипа 1b, что отражает длительное доминирование этого субтипа на территории РФ [31, 41]. Рекомбинантная РНК ВГС (2k/1b) была обнаружена у больных из групп с умеренной и быстрой скоростью развития ФП, но частота обнаружения такого рекомбинанта вируса была невысокой. Отсутствие субтипа 2k/1b у пациентов группы с медленным развитием ФП позволяет предположить, что, возможно, этот вариант вируса приводит к более тяжелому течению болезни. В группе с медленным формированием ФП наблюдалась более низкая вирусная нагрузка, но статистически достоверной значимости она не достигла.

Роль еще одного вирусного фактора, количества генетических вариантов по 1ГВР, в развитии ФП практически не исследована. Известно, что количество этих вариантов и их изменение во времени являются важным показателем взаимоотношений ВГС и макроорганизма. Установлено, что, если в острой фазе гепатита С количество этих генетических вариантов резко уменьшается к концу 3-го месяца, то происходит элиминация вируса [23]. В группе больных с медленным формированием фиброза количество вариантов по 1ГВР было выше, чем в остальных группах (*p* = 0,049). Известно, что одним из факторов развития фиброза при ХГС является интенсивный Т-киллерный ответ больного. Тогда, чем больше генетических вариантов вируса и ниже вирусная

риант 100» («ИнтерЛабСервис», РФ). Определение генотипов полиморфных локусов генов цитокинов: IL-1b (-511 C > T), IL-6 (-174 G>C), IL-10 (-1082 G > A), TNF-α (-238 G > A), TGF-β<sub>1</sub> (G915C) - и генов эндотелиальной дисфункции: CYBA (C242T) и eNOS (C894T) – осуществляли методом рестрикционного анализа продуктов амплификации специфических участков генома. Условия ПЦР, праймеры и анализ продуктов были выполнены, как описано ранее [6]. Генотипирование локусов (H63D, C282Y) гена гемохроматоза (HFE) осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием зондов TaqMan и режима «горячего старта» в амплификаторе «Rotorgene» («Corbett Ltd.», Англия). Условия и анализ продуктов реакции описаны ранее [6].

Анализ полиморфных локусов гена IL-28B (rs8099915, rs12979860) осуществляли методом ПЦР в реальном времени, используя «Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов IL-28B» (НПО «ДНК-технология», РФ).

Для обнаружения достоверных различий в группах больных использовали статистические методики Стьюдента (*t*-тест) и Пирсона (критерий  $\chi^2$ ) с поправкой Йетса на непрерывность для таблиц 2×2. Различия считались достоверными при *p* < 0,05.

## Результаты и обсуждение

Как отмечено ранее во многих публикациях, у женщин чаще, чем у мужчин, ХГС протекает в легкой форме. В нашем исследовании в группе с медленной скоростью развития ФП женщин было достоверно больше (*p* = 0,01), чем мужчин (см. табл. 1). Длительность инфицирования (11–12 лет) и возраст инфицирования (около 30 лет) были почти одинаковыми в группе пациентов с медленной и умеренной скоростью формирования фиброза, но не в группе с быстрым развитием (см. табл. 1). Средняя скорость фиброобразования в группе с медленным развитием ФП была достоверно ниже, чем в остальных группах (различия с умеренной *p* = 0,045 и быстрой, *p* = 0,009). Между группами с умеренным и быстрым развитием ФП статистически достоверных различий не выявлено. Очевидно, большинство пациентов из группы с умеренной скоростью формирования ФП через 8–9 лет (разница в длительности инфицирования между этими группами) достигнут цирротической стадии ХГС. Это позволяет предположить, что группы с умеренным и быстрым развитием ФП представлены сходными больными, что впоследствии подтвердилось при анализе ОНП генов.

Группа с медленным формированием фиброза достоверно отличалась от двух других групп по активности АЛТ и АСТ (*p* = 0,001). Для этой группы также была характерна тенденция к более редкому выявлению анти-ВГС-IgM, чем у пациентов группы с быстрым развитием фиброза. Как известно, эти антитела являются косвенным маркером мутационной активности вируса, которая, вероятно, вносит свой вклад в развитие ФП. В содержании специфических иммуноглобулинов G значимых различий не выявлено во всех группах.

нагрузка (это наблюдалось в группе с медленным развитием фиброза), тем на меньшее количество генетических вариантов будет сформирован ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Остальные варианты вируса будут в низком содержании и не достигнут порога раздражения ЦТЛ.

Как установлено ранее многими исследователями, у пациентов с ХГС в 30–40% случаев выявляется нарушение гомеостаза железа, причиной которого могут быть неблагоприятный аллельный вариант гена наследственного гемахроматоза (HFE), дисфункция обменных процессов из-за хронической ВГС-инфекции и сочетание обоих факторов [18]. Ген HFE, кодирующий белок-регулятор метаболизма железа, имеет значимые ОНП по двум локусам, приводящим к заменам в аминокислотных позициях 63 (гистидина на аспарагиновую кислоту) и 282 (цистеина на тирозин) протеина. В ряде публикаций показано, что для больных ХГС с аллельными вариантами HD, DD и CY, YY по этим ОНП гена HFE характерно более тяжелое течение гепатита [11, 15]. Однако есть и противоположное мнение [25]. В РФ среди доноров восточно-славянского происхождения частота встречаемости гетерозиготных носителей гена HFE по локусу 63 составляет около 20–27%, а по локусу 282 – около 6,4% [4, 7]. В нашем исследовании установлено, что полиморфизм, затрагивающий 63-ю аминокислотную позицию, не влияет на скорость развития ФП. Но у больных другого этнического происхождения (египтяне) выявлена зависимость между генотипом DD и тяжелым течением ХГС [27]. Относительно ОНП в локусе 282 нами обнаружено, что аллельный вариант CC достоверно чаще выявляется в группе больных с медленным развитием ФП, а варианты CY и YY – в группе пациентов с быстрым развитием фиброза ( $p = 0,0002$ ). Эти данные согласуются с результатами, полученными другими авторами для коренных жителей Европы славянского и неславянского происхождения [1, 26, 33].

Влияние сосудистых нарушений, вызванных действием NO на эндотелиальную стенку сосудов и на скорость формирования ФП, у больных ХГС не изучена. Известно, что повышенный уровень NO может стимулировать ангиогенез, образование микротромбов, ишемические нарушения и ФП [32]. В нашем исследовании был проанализирован полиморфизм эндотелиальной NO-синтетазы (G894T), разные аллельные варианты которого приводят к различной активности фермента. Установлено, что при варианте TT активность синтетазы снижена. В нашем исследовании не обнаружено влияния этого полиморфизма на скорость развития ФП.

Генетический полиморфизм никотинамидадениндинуклеотида фосфата (НАДФ) связан с сосудистой дисфункцией. НАДФ-оксидаза играет также значительную роль в развитии воспалительной активности купферовских клеток [10]. У экспериментальных животных инактивация НАДФ-оксидазы предотвращала развитие тяжелого поражения печени. Мы предположили, что разные генетические варианты фермента, а именно гена CYBA субъединицы

p22phox (локус C242T), могут оказывать влияние на скорость формирования ФП. Однако нам удалось выявить только тенденцию к более частому обнаружению гетерозиготного варианта СТ у пациентов из группы с медленным развитием ФП. Влияние полиморфизма гена CYBA на развитие ФП ранее никем не исследовалось.

Цитокины как медиаторы антивирусного иммунного ответа, влияющие на течение ХГС, привлекают внимание исследователей. Провоспалительный IL-1 $\beta$  инициирует и регулирует воспалительные и иммунные процессы (активирует В- и Т-лимфоциты), стимулирует синтез белков острой фазы, некоторых цитокинов, молекул адгезии и простагландинов. Кроме того, он повышает хемотаксис, фагоцитоз, проницаемость сосудистой стенки, стимулирует синтез коллагена и является медиатором взаимодействий между иммунной и нервной системами. Учитывая вовлеченность этого цитокина в столь широкий круг процессов, можно ожидать, что его разные аллельные варианты будут влиять на развитие ФП. В нашем исследовании обнаружено, что гетерозиготная форма СТ преобладает у больных группы с медленным ( $p = 0,007$ ) развитием ФП, а вариант TT – у пациентов с быстрым развитием ФП ( $p = 0,012$ ). Ранее было обнаружено, что в Японии у больных ХГС, ассоциированным с ЦП или ГЦК, преобладает вариант TT [39].

Мультифункциональный провоспалительный цитокин IL-6 принимает участие в регенерации и защите печени, в индукции белков острой фазы в гепатоцитах, а также в регуляции созревания В-клеток и продукции иммуноглобулинов, в гемопоэзе и онкогенезе. Установлено, что полиморфизм промоторной части гена IL-6 (-174 G > C) влияет на уровень этого цитокина в крови [24]. При аллельных вариантах GG и GC содержание IL-6 в сыворотке более высокое, чем в случае генотипа CC. В нашем исследовании выявлена тенденция к более частому обнаружению аллельного варианта CC у больных ЦП. Ранее было показано, что этот аллель преобладает у пациентов с быстрым фиброзом, имеющих восточно-славянское происхождение [8]. Однако у коренных жителей Италии тяжелое течение отмечается у пациентов с генотипом GG [22]. Частота встречаемости аллельного варианта CC в различных популяциях варьирует от 2 до 54,7%, составляя около 40% у европейцев и 16% у россиян [33].

Роль полиморфизма гена IL-10 в развитии ФП при ХГС изучена недостаточно полно. Известно, что этот цитокин обладает противовоспалительным эффектом, снижает экспрессию молекул МНС I и II класса и продукцию цитокинов Т-хелперов-1. Кроме того, он понижает экспрессию коллагена I типа и коллагеназы. Полиморфизм в промоторе в положении – 1082 G > A ассоциирован с разным уровнем продукции IL-10 [35]. Более низкий уровень IL-10 характерен для генотипа AA. В нашем исследовании обнаружено, что вариант AA достоверно чаще обнаруживается у пациентов с быстрым развитием ФП, чем у больных с медленным формированием фибро-

**Генетические параметры ВГС в группах больных**

Показатель	Группа		
	с медленным развитием ФП (n = 40)	с умеренным развитием ФП (n = 40)	с быстрым развитием ФП (n = 50)
Субтипы вируса, %:			
1a	0	10,0	10,0
1b	57,5	55,0	66,0
2k/1b	0	2,5	2,0
2a	12,5	5,0	10,0
3a	32,5	30,0	12,0
Содержание РНК, МЕ/мл	$(1,21 \pm 1,49) \cdot 10^6$	$(7,01 \pm 2,29) \cdot 10^6$	$(6,71 \pm 2,54) \cdot 10^6$
Количество вариантов ГВР:			
диапазон	2–7	2–5	2–5
среднее значение	$3,89 \pm 0,40$	$2,80 \pm 0,39$	$2,71 \pm 0,42$

за ( $p = 0,01$ ). В противоположность нашим данным у пациентов из Италии с генотипом AA ассоциировалось медленное развитие фиброза [21].

С ОНП недавно открытого интерферона- $\lambda$  (ген IL-28B) связывают самопроизвольную элиминацию вируса при остром гепатите С и высокую вероятность достижения устойчивого вирусологического ответа [28, 40]. Влияние ОНП гена IL-28B на тяжесть заболевания интенсивно изучается. Для пациентов из Италии установлено, что более быстрое формирование ФП ассоциировано с генотипами СТ и ТТ в локусе rs12979860 и вариантами GT и GG в локусе rs8099917, а в случае развития ХГС-ЦП достоверно чаще выявлялся вариант ТТ в локусе rs12979860 [17, 20]. Однако нам не удалось обнаружить влияния этих ОНП на скорость формирования ФП. Хотя в нашем исследовании были 2 пациента с редким сочетанием обоих неблагоприятных замен по этим двум ОНП и у них отмечалось быстрое формирование фиброза.

TNF- $\alpha$  – полифункциональный цитокин, уровень которого в сыворотке крови часто бывает повышен при ХГС [14]. Этот цитокин регулирует процессы воспаления, стимулирует фагоцитарную и цитотоксическую активность Т-лимфоцитов, активность Т-хелперов-1 и участвует в регуляции апоптоза. ОНП в промоторной части в положении -238 влияет на экспрессию гена TNF- $\alpha$  и соответственно на содержание этого цитокина в крови. При варианте AA наблюдается низкий уровень TNF- $\alpha$ . В нашем исследовании обнаружено, что аллели GA и AA достоверно чаще ( $p = 0,001$ ) обнаруживаются у пациентов с быстрым фиброзом, что совпадает с данными других авторов, полученными для европейской популяции [29].

Цитокин TGF- $\beta_1$  является центральным компонентом системы роста гепатоцитов, формирования фиброза и контроля апоптоза. Кроме того TGF- $\beta_1$  снижает иммунный ответ, ингибируя активность

Таблица 2

НК-клеток и продукцию интерферона- $\gamma$  и IL-12. Полиморфизм гена TGF- $\beta_1$ , приводящий к замене G915C в кодирующей части, влияет на продукцию цитокина. При варианте GG отмечается высокое содержание TGF- $\beta_1$ , при GC – промежуточное и при CC – низкое [34]. В нашем исследовании обнаружена только тенденция к более частому обнаружению варианта GC в группе с быстрым развитием ФП, чем в группах с медленным и умеренным формированием фиброза. Лишь эта тенденция и более низкое выявление редких генотипов HFE C282Y были характерны для группы с умеренным фиброзом, чем для пациентов с быстрым ФП. Лиц с генотипом CC гена TGF- $\beta_1$  в нашем исследовании не выявлено, что может свидетельствовать о его низкой распространенности среди больных Московского региона. Ранее было показано для коренных жителей Германии, что больные с быстрым развитием ФП достоверно чаще имеют генотип CC гена TGF- $\beta_1$  [19].

Таким образом, полиморфизм генома ВГС стал причиной классификации вируса на генотипы и субтипы, каждый из которых характеризуется определенными генетическими особенностями, влияющими на течение ХГС. В нашем исследовании не обнаружено четкой связи между каким-либо субтипом вируса и быстрым развитием ФП. Очевидно, это вызвано преобладанием вируса субтипа 1b во всех группах больных. Ранее показано, что у европейских пациентов, инфицированных вирусами субтипа 1b или 3a, чаще отмечается быстрое развитие фиброза [12, 16]. Межгенотипный рекомбинант 2k/1b, частота встречаемости которого еще невелика, вероятно, приводит к более быстрому развитию ФП при ХГС. В нашем исследовании обнаружено, что в группе пациентов с медленной скоростью развития фиброза имелась тенденция к более низкому содержанию ВГС в крови, но у этих больных выявлялось достоверно большее количество генетических вариантов по зоне ГВР белка E2, чем в группах с умеренным и быстрым формированием ФП.

Существенная роль в развитии фиброза у больных ХГС принадлежит индивидуальным генетически предопределенным факторам самого пациента. Среди проанализированных нами ОНП генов цитокинов выявлены значимые различия для генов: IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ . Установлено, что быстрый фиброз достоверно ассоциирован с генотипом CC гена IL-1 $\beta$ , вариантом AA гена IL-10, генотипом AA гена TNF- $\alpha$ . Для полиморфизма гена IL-10 характерны популяционные различия среди европейцев. В нашем исследовании подтверждена ассоциация полиморфного локуса C282Y гена гемохроматоза с быстрым формированием фиброза. Полиморфизм по этому локусу чаще обнаруживается у коренных жителей Европы, чем у остального населения Земли. Впервые нами проведен анализ вовлеченности ОНП генов, ответственных за сосудистую дисфункцию и оксидативный

стресс, в формирование ФП. Показана тенденция к более частому выявлению аллельного варианта СТ гена СУВА (-242 С > Т) НАДФ-оксидазы у пациентов с медленным развитием фиброза. По остальным проанализированным ОНП генов человека не выявлено их влияние на скорость формирования ФП.

## Выводы

1. У больных восточно-славянского происхождения с разной скоростью развития фиброза печени на фоне ХГС показаны различия в количестве генетических вариантов ВГС по IГВР и тенденция к разной вирусной нагрузке.

2. При анализе этих же групп больных обнаружено влияние ОНП генов цитокинов на быстрое формирование фиброза: а именно генотипа СС в локусе -511 гена IL-1 $\beta$ , генотипа АА в положении -1082 гена IL-10 и аллельного варианта АА в локусе (-238 G > A) гена TNF- $\alpha$ .

3. Подтверждена роль полиморфного локуса гена HFE в формировании ФП. Аллельный вариант С282С ассоциирован с медленным развитием фиброза, а варианты СУ и УУ по этому же локусу – с быстрым формированием ФП.

*Авторы выражают благодарность М.А. Арутюновой за помощь при анализе генетических вариантов зоны IГВР белка E2 ВГС.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаев С.М., Балацкий А.В., Ефименко А.Ю. Полиморфизм гена HFE как фактор прогрессирования фиброза у больных русской этнической принадлежности // Вестн. РГМУ. – 2006. – № 2. – С. 49–54.
2. Белобородова Е.В. Поражение печени при хронических вирусных гепатитах и их сочетание с алкогольной болезнью и опийной наркоманией. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Томск, 2007.
3. Гончарова И.А., Белобородова Е.В., Фрейдлин М.Б. и др. Ассоциации полиморфизмов генов иммунной системы с количественными признаками, генетически значимыми для хронических гепатитов // Молекул. биол. – 2008. – Т. 42., № 2. – С. 242–246.
4. Лавров А.В. Молекулярно-генетическая характеристика наследственного гемахроматоза у российских больных. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2004.
5. Николаева Л.И., Зверев С.Я., Петрова Е.В. и др. Гуморальный ответ на антигены вируса гепатита С при коинфицировании вирусом иммунодефицита человека 1-го типа // Лаб. диагн. – 2008. – № 7. – С. 42–44.
6. Николаева Л.И., Самоходская Л.М., Макашова В.В. и др. Поиск генетических факторов вируса гепатита С у пациентов с хроническим гепатитом С, ассоциированных с формированием устойчивого вирусологического ответа на противовирусную терапию // В мире вирус. гепатит. – 2011. – № 1. – С. 26–35.
7. Самоходская Л.М., Лавров А.В., Ефименко А.Ю. и др. Особенности генетики наследственного гемахроматоза в русской популяции // Мед. генет. – 2007. – № 1. – С. 32–35.
8. Самоходская Л.М., Изнатова Т.М., Абдуллаев С.М. и др. Прогностическое значение комбинации аллельных вариантов генов цитокинов и гемахроматоза у больных хроническим гепатитом С // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2007. – № 2. – С. 50–56.
9. Семенова Н.А. Роль полиморфизмов генов apoE, HFE, SOD2 и IL-6 в патогенезе хронического гепатита С // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск, 2010.
10. Bataller R., Schwabe R.F., Choi Y.H. et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis // J. Clin. Invest. – 2003. – Vol. 112. – P. 1383–1394.
11. Bonkovsky H.L., Naishadham D., Lambrecht R.W. et al. HALT-C Trial Group. Roles of iron and HFE mutations on severity and response to therapy during retreatment of advanced chronic hepatitis C // Gastroenterology. – 2006. – Vol. 131. – P. 1440–1451.
12. Bruno S., Crosignani A., Maisonneuve P. et al. Hepatitis C virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a seventeen-year prospective cohort study // Hepatology. – 2007. – Vol. 46. – P. 1350–1356.
13. Chisari F.V. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions // Nature. – 2005. – Vol. 436. – P. 930–932.
14. Constantini P.K., Wawrzynowicz-Syczewska M., Clare M. et al. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy // Liver. – 2002. – Vol. 22. – P. 404–412.
15. Corengia C., Galimberti S., Bovo G. et al. Iron accumulation in chronic hepatitis C: relation of hepatic iron distribution, HFE genotype, and disease course // Am. J. Clin. Pathol. – 2005. – Vol. 124. – P. 846–853.
16. De Nicola S., Aghemo A., Rumi M.G., Colombo M. HCV genotype 3a: an independent predictor of fibrosis progression in chronic hepatitis C // J. Hepatol. – 2009. – Vol. 51. – P. 964–966.
17. Di Marco V., Bronte F., Calvaruso V. et al. IL-28B polymorphisms influence stage of fibrosis and spontaneous or interferon-induced viral clearance in thalassemia patients with hepatitis C virus infection // Haematologica. – 2012. – Vol. 97. – P. 679–686.
18. Dostalikova-Cimurova M., Kratka K., Stransky J. et al. Iron overload and HFE gene mutation in Czech patients with chronic liver diseases // Dis. Markers. – 2012. – Vol. 32. – P. 65–72.
19. Eurich D., Bahra M., Boas-Knoop S. et al. Transforming growth factor beta 1 polymorphisms and progression of graft fibrosis after liver transplantation for hepatitis C virus-induced liver disease // Liver Transplant. – 2011. – Vol. 17. – P. 279–288.
20. Fabris C., Falletti E., Cussigh A. et al. IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC // J. Hepatol. – 2011. – Vol. 54. – P. 712–722.
21. Falletti E., Fabris C., Toniotto P. et al. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and liver fibrosis progression due to recurrent hepatitis C // J. Interferon Cytokine Res. – 2007. – Vol. 27. – P. 239–246.
22. Falletti E., Fabris C., Vandelli C. et al. Genetic polymorphisms of interleukin-6 modulate fibrosis progression in mild chronic hepatitis C // Hum. Immunol. – 2010. – Vol. 71. – P. 999–1004.
23. Farci P., Strazzera R., Alter H. J. et al. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99. – P. 3081–3086.
24. Fishman D., Faulds G., Jeffery R. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis // J. Clin. Invest. – 1998. – Vol. 102. – P. 1369–1376.
25. Gattoni A., Parlato A., Vangieri B. et al. Role of hemochromatosis genes in chronic hepatitis C // Clin. Ter. – 2006. – Vol. 157. – P. 61–68.
26. Gehrke S.G., Stremmel W., Mathes I. et al. Hemochromatosis and transferrin gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype // J. Mol. Med. – 2003. – Vol. 81. – P. 780–787.
27. Gharib A.F., Karam R.A., Pasha H.F. et al. Polymorphisms of hemochromatosis, and alpha-1 antitrypsin genes in Egyptian HCV patients with and without hepatocellular carcinoma // Gene. – 2011. – Vol. 489. – P. 98–102.
28. Halfon P., Bourliere M., Ouzan D. et al. A single IL-28B genotype SNP rs12979860 determination predicts treatment response in patients with chronic hepatitis C Genotype 1 // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. – 2010. – Vol. 23. – P. 931–935.
29. Hohler T., Kruger A., Gerken G. et al. Tumour necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection // J. Med. Virol. – 1998. – Vol. 54. – P. 173–177.
30. Lebray P., Zylberberg H., Hue S. et al. Influence of HFE gene polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C //

- J. Viral. Hepat. –2004. – Vol. 1. – P. 175–182.
31. Lvoy D.K., Samokhvalov E.I., Tsuda F. et al. Prevalence of hepatitis C virus and distribution of its genotypes in Northern Eurasia // Arch. Virology. – 1996. – Vol. 141. – P. 1613–1622.
  32. McNaughton L., Puttagunta L., Martinez-Cuesta M.A. et al. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99. – P. 17161–17166.
  33. Pacal L., Husa P., Znojil V., Kankona K. HFE C282Y gene variant is a risk factor for the progression to decompensated liver disease in chronic viral hepatitis C subjects in the Czech population // Hepat. Res. – 2007. – Vol. 37. – P. 740–747.
  34. Pereira F.A., Pinheiro da Silva N.N., Rodart I.F. et al. Association of TGF-beta1 codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection // J. Med. Virol. – 2008. – Vol. 80. – P. 58–64.
  35. Pestka S., Krause C.D., Sarkar D. et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors // Annu. Rev. Immunol. – 2004. – Vol. 22. – P. 929–979.
  36. Powell E.E., Edwards-Smith C.J., Hay J.L., et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C // Hepatology. – 2000. – Vol. 31. – P. 828–833.
  37. Richardson M.M., Powell E.E., Barrie H.D. et al. A combination of genetic polymorphisms increases the risk of progressive disease in chronic hepatitis C virus // J. Med. Genet. – 2005. – Vol. 42 (e. 45). – P. 1–6.
  38. Simmonds P., Bukh J., Combet C. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes // Hepatology. – 2005. – Vol. 42. – P. 962–973.
  39. Tanaka Y., Furuta T., Suzuki S. et al. Impact of interleukin-1beta genetic polymorphisms on the development of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in Japan // J. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 187. – P. 1822–1825.
  40. Thomas D.L., Thio C.L., Martin M.P. et al. Genetic variation in IL-

28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus // Nature. – 2009. – Vol. 461. – P. 798–801.

41. Viazov S., Ross S.S., Kyuregyan K.K. et al. Hepatitis C virus are rare even among intravenous drug users // J. Med. Virol. – 2010. – Vol. 82. – P. 232–238.

Поступила 19.09.12

#### Сведения об авторах:

**Колотвин Андрей Викторович**, науч. сотр. МГУ им. М.В. Ломоносова, ГУНУ фак-т фундаментальной медицины, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, лаб. генно-инженерных препаратов; **Самоходская Лариса Михайловна**, канд. мед. наук; доц., ст. науч. сотр. МГУ им. М. В. Ломоносова, ГУНУ фак. фундаментальной медицины, лаб. генных и клеточных технологий; **Сапронов Георгий Витальевич**, канд. мед. наук, доцент каф. инфекционных болезней ГБОУ ДПО РМАПО; **Макашова Вера Васильевна**, д-р мед. наук, проф., вед. науч. сотр. ЦНИИ эпидемиологии, клинич. отд-ния инфек. патологии; **Самохвалов Евгений Иванович**, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, лаб. экологии вирусов; **Альховский Сергей Владимирович**, канд. биол. наук, зав. лаб. НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, лаб. биотехнологии; **Гришечкин Александр Евгеньевич**, науч. сотр. НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, лаб. генно-инженерных препаратов; **Беллева Наталья Михайловна**, д-р мед. наук, проф., зав. каф. инфекционных болезней ГБОУ ДПО РМАПО; **Гибадуллин Рашиат Абдрахманович**, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, лаб. генно-инженерных препаратов.

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.921.5-06:616.24]-078.33

*Е.Н. Романова, А.В. Говорин, В.В. Горбунов, С.А. Лукьянов*

## СОСТОЯНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ПНЕВМОНИЯХ У БОЛЬНЫХ ГРИППОМ А/Н1N1

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ, 672090, Чита, ул. М.Горького, 39а

*При исследовании сывороточных иммуноглобулинов в дебюте стационарного лечения отмечается наибольшее повышение концентрации IgM в группе пациентов с тяжелым течением пневмоний на фоне гриппа А/Н1N1. Увеличение концентрации IgA отмечено в равной степени при различной тяжести гриппозных пневмоний в отличие от бактериальных. Показатели IgG регистрировались на уровне контрольных цифр во всех исследуемых группах.*

**Ключевые слова:** *грипп А/Н1N1, внебольничная пневмония, иммуноглобулины, острое повреждение легких, острый респираторный дистресс-синдром*

*E. N. Romanova, A. V. Govorin, V. V. Gorbunov, S. A. Lukyanov*

THE CONDITION OF HUMORAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH PNEUMONIA ASSOCIATED WITH INFLUENZA A/H1N1

*State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education Chita State Medical Academy of the Ministry of Healthcare and Social Development, 39a, Ul. Gor'kogo, Chita, Russian Federation, 672090*

*The study of serum immunoglobulins in patients with severe pneumonia associated with influenza A/H1N1 showed that the greatest increase in IgM has been noted at the onset of hospital treatment. Increasing the concentration of IgA noted equally with varying severity of influenza pneumonia, in contrast to bacterial. IgG indices recorded at the control level of numbers in all studied groups.*

**Key words:** *influenza A/H1N1, extrahospital pneumonia, immunoglobulins, acute lung injury, acute respiratory distress syndrome.*

Грипп остается одним из самых распространенных инфекционных заболеваний, которым, по данным ВОЗ, ежегодно в мире болеет до 100 млн человек

**Для корреспонденции:** Романова Елена Николаевна, канд. мед. наук, доцент каф. поликлинической терапии ЧГМА, e-mail:elena-r-chita@yandex.ru

[7, 8]. Особое внимание международной общественности к проблеме гриппа объясняется способностью вирусов к изменчивости поверхностных гликопротеидов (Н и N) и их низкой иммуногенностью, что явилось причиной развития пандемии гриппа А/Н1N1 2009–2010 гг. В России в числе первых пострадавших был Забайкальский край, где количество пере-