

Б. С. ИЛЬЯСОВА

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ – ВАЖНЕЙШИХ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ ФИБРОГЕНЕЗА В ПРОГРЕССИРОВАНИИ И ИСХОДЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С В КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Научно-исследовательский институт кардиологии и внутренних болезней МЗ РК

У пациентов с хроническим вирусным гепатитом С казахской популяции наблюдается достоверно низкая частота гомозигот G/G кодона – 1082 гена ИЛ-10. Наследование среди лиц казахской национальности профибротических генотипов генов (TGF β 1 25 кодон Arg/Arg генотип и AT-6 T/T генотип) ассоциируется с клиникой декомпенсированного цирроза печени.

Ключевые слова: полиморфизмы генов интраплейкина-10, генов TGF β 1 и ангиотензиногена, цирроз печени, хронический вирусный гепатит С.

Актуальной проблемой современной гепатологии является выявление генетических маркеров, которые могут идентифицировать пациентов с хроническими вирусными гепатитами с предрасположенностью к прогрессированию фиброза. В настоящее время исследована роль полиморфизма генов цитокинов TGF- β 1, IFN-g, IL-6, IL-10, и TNF- α в патогенезе HCV инфекции, однако разные исследования имеют прямо противоположные результаты [1]. Данное противоречие может быть связано с различием исследования генов в разных популяциях.

Интерлейкин-10 играет ключевую роль в регуляции клеточного иммунитета при HCV-инфекции [2, 3]. Vidigal et al. [4] доказали, что ассоциация между колебаниями ИЛ-10 связана с 1082 G/G генотипом и подверженности к хронической HCV-инфекции. Промоутерные регионы гена ИЛ-10 содержат 3 биаллельных полиморфизмов в локусах -1082, -819 и -592 из транскрипционного промоторного региона, которые продукцируют 3 разных гаплотипа GCC, ACC и ATA [5]. Мы предположили, что низкопродуцирующие ИЛ-10 аллеи могут быть предрасполагающими к более тяжелому течению печеночного фиброза.

Трансформирующий фактор роста- β 1 (TGF β 1) является мультифункциональным цитокином с профиброгенным свойствами, модулирующий клеточный рост и дифференциацию [6]. В процессе фиброгенеза продукция ключевой сигнальной молекулы трансформирующего фактора роста- β 1 может быть усиlena ангиотензином II (А II) – основной эффекторной молекулой РАС [7]. Первичное действие РАС заключается в регуляции сосудистого тонуса и экскреции солей почками. Однако недавние исследования показали, что независимо от этих эффектов АII увеличивает аккумуляцию экстрацеллюлярного матрикса [8].

Функциональный полиморфизм генов РАС описан, включая нуклеотидную последовательность 6 bp из транскрипционного локуса в промоторе ангиотензиногена (АТ), предшественника пептида ангиотензина I и отсутствия делеции с инtronом 16, ангиотензин1-превращающего фермента, которые конвертирует АI в АII [9]. В настоящее время идентифицировано 8 полиморфизмов генов TGF β 1. Из них 2 локализуются на последовательности сигнальных пептидов TGF β 1 в локусе+869 и в локусе +915, которые относятся к транскрипционному стартовому локусу, приводящие к вариации 10 кодона (лейцин(Leu) или пролин(Pro) или 25 кодона (аргинин(Arg) или Pro) [10]. Из всех различных вариационных последовательностей, идентифицированных в гене TGF β 1, вариационная последовательность 25 кодона по данным различных исследований ассоциируется с тяжестью различных заболеваний [11].

Учитывая влияние РАС на формирование фиброза и участие в патогенезе тяжелых осложнений цирроза печени, изучение полиморфизмов генов ИЛ-10, TGF β 1 и АT6 при вирусном гепатите С позволит определить генетические предикторы прогрессирования вирусного гепатита С.

Цель исследования: оценить влияния полиморфизма кодонов -592, -819 и -1082 гена ИЛ-10, кодона Arg25Pro TGF β 1 и полиморфизма гена АT6 ангиотензиногена на течение хронического гепатита С в казахской популяции.

Материалы

В исследование вошли 120 пациентов с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС, из них 53 женщина и 67 мужчин. Группа здоровых доноров 70 человек. Пациенты были поделены на группы: 1 группа – пациенты с диагнозом ХВГС – 40 человек, 2 группа – пациенты с диагнозом цирроз печени (ЦП) в исходе вирусного гепатита С Класс А (по Чайлд-Пью) – 35 человек и 3 группа с диагнозом ЦП Класс В и С – 45 человек. Диагнозы ХВГС и ЦП были выставлены в соответствии с Руководствами EASL (2009), APASL (2010), Стандартами диагностики и лечения РК (2009).

Методы

Для выделения ДНК был использован Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, USA) согласно протоколам производителя. Генотипирование полиморфизмов проводилось методом прямого секвенирования в обоих направлениях. Для сиквенс реакций использовали BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) на приборе ДНК анализаторе 3730XL (Applied Biosystems, USA). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводился с использованием пакета программ Applied Biosystems (Sequence Analysis 5.3.1, SeqScape v.2.6, и др.), Finch TV v1.3.1. и с использованием международных баз нуклеотидных последовательностей (Blast, ENSEMBL, GeneBank и др.).

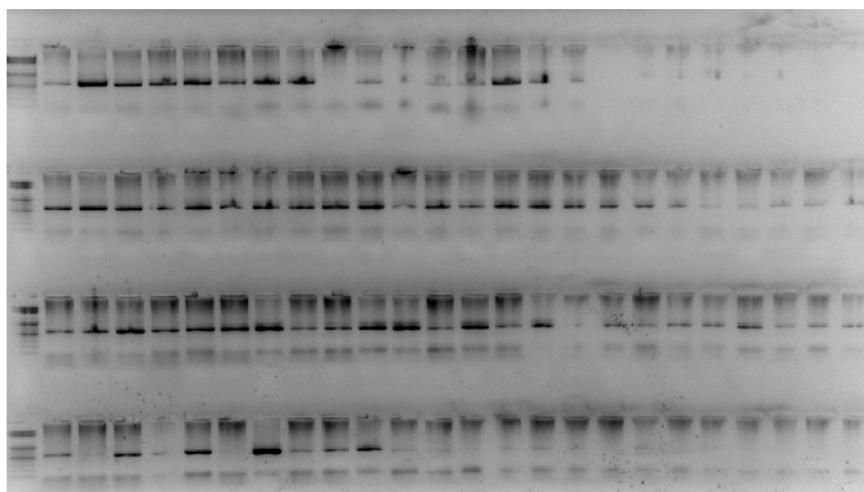


Рис. 1. ПЦР-продукты с праймерами IL-10, образцы 1-106

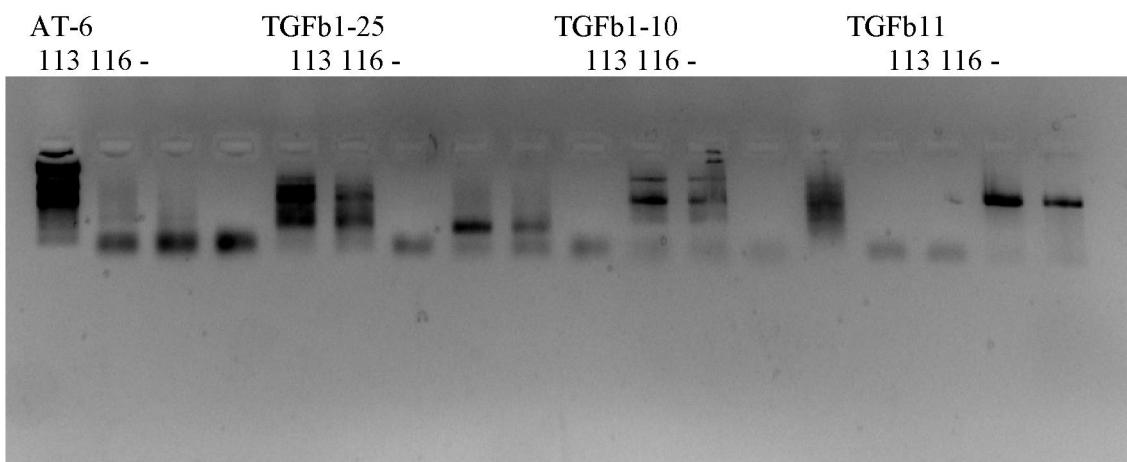


Рис. 2. ПЦР-продукты с праймерами TGF β 1 и AT-6, образцы 113-116

Результаты исследования

Сравнение частотного распределения генотипов кодона -1082 гена ИЛ-10 у больных с ХВГ С и здоровых лиц казахской национальности, показало, что гомозиготное наследование генотипа A/A и гетерозиготное наследование генотипа G/A достоверно не отличается от основной и контрольной групп ($P>0,05$). В группе больных с хронической HCV-инфекцией наблюдается достоверно более низкая частота гомозиготного наследования генотипа G/G ($P<0,05$). Распределение аллелей G и A кодона -1082 гена ИЛ-10 не отличалось достоверно в обеих группах ($P>0,05$) и показало, что в обеих группах наибольший процент встречаемости приходится на аллель A (85,8 и 88,6% у пациентов и здоровых доноров соответственно), чем на аллель G (24,2% и 27,1% у пациентов и здоровых доноров соответственно).

Таблица 1. Распределение частот генотипов и аллелей кодона -1082 гена ИЛ-10 в зависимости от прогрессирования хронического вирусного гепатита С (по группам)

Генотипы и аллели	Частота аллелей и генотипов		
	1 группа	2 группа	3 группа
Генотип A/A (n=91)	26 (28,6%)	29 (31,9 %)	36 (39,6%)**#
Генотип G/A (n=22)	12 (54,5%)	3 (13,6%)**#	7 (31,8%)**#
Генотип G/G (n=7)	2 (28,6%)	3 (42,9%)**#	2 (28,6%)#
Аллель A (n=113)	39(34,5 %)	32 (28,3%)	43 (38,1%)
Аллель G (n=29)	14 (48,3 %)	6 (20,7%)**	9 (31,0%)*

Примечание. * – достоверное отличие от 1 группы $P < 0,05$, ** – $P < 0,005$.
– достоверное отличие между 2 и 3 группами $P < 0,05$, ## – $P < 0,005$.

Результаты исследования полиморфизма генов в группах больных с ХВГ С, компенсированным и декомпенсированным ЦП, показали, что декомпенсированный HCV ЦП у лиц казахской ассоциируется с достоверно большей частотой с наследованием гомозиготного генотипа A/A кодона -1082 гена ИЛ-10 ($P<0,005$). Частота гетерозиготного наследования данного полиморфизма оказалась достоверно выше в группе больных с неосложненным ХВГ С ($P<0,005$), чем в группах 2 и 3. Частота гомозиготного наследования генотипа G/G достоверно выше у пациентов с компенсированным ЦП в исходе вирусного гепатита С, чем у больных с ЦП Класса В и С (по Чайлд-Пью) ($P < 0,05$). Сравнение распределения аллелей гена ИЛ-10 в локусе -1082, показало, что наследование аллели A у больных в исследуемых группах встречается с одинаковой частотой, в то время как наследование аллели G с наибольшей частотой встречается у пациентов с неосложненным ХВГ С ($P<0,005$). Сравнение частотного распределения генотипов кодона -819 гена ИЛ-10 у больных с ХВГС и ЦП и здоровых лиц казахской национальности, показала, что гомозиготное наследование генотипа C/C и T/T и гетерозиготное наследование генотипа C/T достоверно не отличается основной и контрольной группах ($P>0,05$). Распределение аллелей C и T кодона -819 гена ИЛ-10 не отличалось достоверно в обеих группах ($P>0,05$) и показало, что в обеих группах наибольший процент встречаемости приходится на аллель T (90,0% и 88,5% у пациентов и здоровых доноров соответственно), чем на аллель C (50,8% и 48,6% у пациентов и здоровых доноров соответственно).

Таблица 2. Распределение частот генотипов и аллелей кодона -819 гена ИЛ-10 в зависимости от прогрессирования хронического вирусного гепатита С (по группам)

Генотипы и аллели	Частота аллелей и генотипов		
	1 группа	2 группа	3 группа
Генотип C/C (n=12)	4(33,3%)	5(41,6 %)	3 (25,0%)
Генотип C/T (n=49)	4 (8,2%)	20 (40,8%)**#	25 (51,0%)**#
Генотип T/T (n=59)	32 (54,2%)	10 (16,9%)**#	17 (33,3%)**#
Аллель C (n=61)	8 (13,1 %)	25 (41,0%)**	28(45,9 %)**
Аллель T (n=108)	36 (33,3 %)	30 (27,8%)#	42 (38,9%)*

Примечание. * – достоверное отличие от 1 группы $P < 0,05$, ** – $P < 0,005$.
– достоверное отличие между 2 и 3 группами $P < 0,05$, ## – $P < 0,005$.

Результаты исследования полиморфизма гена ИЛ-10 в промоторе -819 в опытных группах показали, что гетерозиготное наследование аллели Т - С/Т достоверно чаще встречается у пациентов с ЦП в исходе вирусного гепатита С. Гомозиготное наследование Т/Т достоверно ассоциируется с ХВГ С без признаков ЦП.

Сравнение частотного распределения генотипов кодона -592 гена ИЛ-10 у больных с ХВГС и здоровых лиц показала, что ХВГС достоверно ассоциируется с гомозиготным наследованием аллели С у лиц казахской национальности ($P<0,005$). Гетерозиготное наследование генотипа С/A достоверно не отличается основной и контрольной группах ($P>0,05$). Частота гомозиготного наследования генотипа А/А достоверно ниже у больных с клинически значимой персистенцией HCV-инфекцией. Распределение аллели С кодона -592 гена ИЛ-10 достоверно преобладало в обеих группах ($P>0,05$) и частота встречаемости в группе пациентов с ХВГ С оказалась достоверно выше ($P<0,05$). Результаты исследования полиморфизма генов в группах больных с ХВГС, компенсированным и декомпенсированным ЦП, показали, что декомпенсированный HCV ЦП у лиц казахской ассоциируется с достоверно большей частотой с наследованием гомозиготного генотипа С/С кодона -592 гена ИЛ-10 ($P<0,05$). Частота гетерозиготного наследования данного полиморфизма оказалась достоверной и не отличалась в группе больных. Сравнение частотного распределения аллелей гена ИЛ-10 в локусе -592, показало, что наследование аллели А у больных в исследуемых группах встречается с одинаковой частотой, в то время как наследование аллели С с наибольшей частотой встречается у пациентов с декомпенсированным циррозом печени в исходе вирусного гепатита С ($P<0,05$).

Частота встречаемости генотипа Arg25Arg у лиц с ХВГС составила 84,9% (102 человека) и достоверно не отличалась от частоты встречаемости данного полиморфизма у здоровых лиц 78,6% (55 человек, $P>0,5$). Частота генотипа Arg25Pro (4,2%) среди больных также достоверно не отличалась от таковой в группе здоровых доноров (5,71%, $P>0,5$). Гомозиготы с генотипом Pro25Pro (15,7%) в группе здоровых доноров встречались достоверно чаще, чем в группе больных ХВГ С (83%, $P<0,005$). Результаты оценки распределения аллелей 25 кодона гена TGF β 1 свидетельствуют о достоверно более высокой частоте аллели Arg 25 гена, трансформирующего фактора роста- β 1 у лиц с развитием ХВГ С в казахской популяции (99,1% и 84,3%, соответственно $P<0,05$). Аллель Pro в казахской популяции встречается достоверно чаще у лиц с отсутствием хронической HCV-инфекции (15,0% и 21,4%, соответственно $P<0,05$).

Результаты анализа распределения частот генотипов 25 кодона гена TGF β 1 в зависимости от прогрессирования HCV инфекции (по группам) (Таблица 3) показали, что для индивидуумов с Arg25Arg гомозиготным генотипом более характерно прогрессирование клинической картины заболевания в сравнении с лицами, наследующими гетерозиготный генотип Arg25Pro ($P<0,005$). Более того, наследование гомозиготного генотипа Arg/Arg 25 кодона гена TGF β 1 ассоциируется с более тяжелым течением цирроза печени в исходе вирусного гепатита С ($P<0,005$) в казахской популяции. Статистически значимым является также наследование аллели Arg в группе с декомпенсированным ЦП в сравнении с группой с компенсированным ЦП ($P<0,005$) и ХВГС ($P<0,05$).

Сравнение частотного распределения генотипов Т/С и аллелей гена ангиотензиногена AT-6 у больных с ХВГС и здоровых лиц казахской национальности, показало, что гомозиготное наследование генотипа Т/Т, С/С и гетерозиготное наследование генотипа Т/С достоверно не отличается в основной и контрольной группах ($P>0,05$). В группе больных с хронической HCV-инфекцией наблюдается достоверно более низкая частота гомозиготного наследования генотипа С/С ($P<0,05$). Распределение аллелей С и Т гена ангиотензиногена AT-6 не отличалось достоверно в обеих группах ($P>0,05$) и показало, что в обеих группах наибольший процент встречаемости приходится на аллель Т (75, 8% и 72,9% у пациентов и здоровых доноров соответственно), чем на аллель С (31,7 и 34,3% у пациентов и здоровых доноров соответственно).

Анализ распределения частот генотипов гена ангиотензиногена AT-6 в зависимости от прогрессирования HCV-инфекции (по группам) показал, что у больных с ЦП достоверно чаще встречается тимозин-тимозин гомозиготный генотип наследования гена AT-6 ($P<0,05$), чем у больных 1 группы. Наследование гомозиготного генотипа С/С гена AT-6 ассоциируется с более легким течением хронической HCV-инфекции ($P<0,005$) в казахской популяции. Статистически значимым является также наследование аллели Т в группе с компенсированным и декомпенсированным ЦП в сравнении с группой пациентов с ХВГС ($P<0,05$; $P<0,005$, соответственно).

Таблица 3. Распределение частот генотипов 25 кодона гена TGF β 1 в зависимости от прогрессирования хронического вирусного гепатита С

Генотипы и аллели	Частота аллелей и генотипов		
	1 группа	2 группа	3 группа
Arg/ Arg (n=102)	26 (21,6%)	32 (31,4 %)	44 (43,1%)
Arg/Pro (n=17)	13 (76,5 %)	3 (17,6%)	1(5,9%)
Pro /Pro (n=1)	1 (100%)	0	0
Аллель Arg (n=119)	39(32,7 %)	35 (29,4%)	45 (37,8%)
Аллель Pro (n=18)	1 (5,6 %)	3 (16,7%)	1 (5,6%)

При наследовании профибротических генотипов TGF β 1 и AT-6 (TGF β 1 25 кодон Arg / Arg генотип и AT-6 T/T генотип) ассоциация с циррозом печени у больных с хроническим вирусным гепатитом ещё более выраженная (рис. 3). Пациенты, которые не наследуют ни один из этих генотипов относятся к группе без клинических признаков ЦП. Среди пациентов, наследующих один из профибротических генотипов в сравнении с пациентами, не имеющими профибротических гена, достоверно больше лиц, относящихся к группе 2 и 3 с клиникой компенсированного и декомпенсированного цирроза печени ($P=0,0021$). Пациенты, имеющие два профибротических генотипов генов TGF β 1 и AT-6, достоверно чаще относятся к 3 группе больных, т.е. с циррозом печени класса В и С в сравнении с пациентами, не имеющими профибротические генотипы ($P=0,0421$).

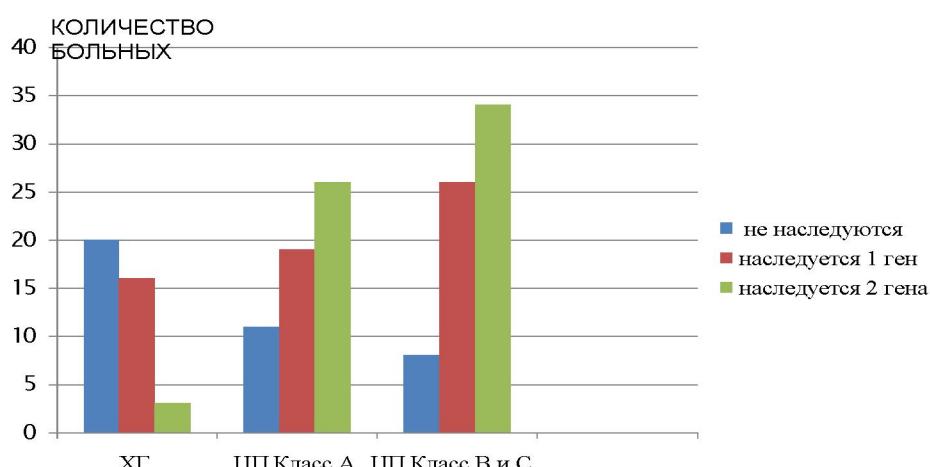


Рис. 3. Наследование профибротических генотипов генов TGF β 1 25 кодон Arg / Arg генотип и AT-6 T/T генотип

Заключение. Клинически значимая хроническая HCV-инфекция в казахской популяции ассоциируется с гомозиготным наследованием аллели С кодона -592 гена ИЛ-10, с гомозиготным наследованием аллели Arg 25 кодона гена TGF β 1. У пациентов с ХВГС наблюдается достоверно низкая частота гомозигот G/G кодона -1082 гена ИЛ-10 и встречаемости аллели Pro 25 кодона гена TGF β 1. Развитие ЦП ассоциируется с более частым наследованием гомозиготного генотипа A/A кодона -1082, гетерозиготным наследованием аллели Т - С/Т -819 гена ИЛ-10 ($P<0,005$), гомозиготным генотипом С/С кодона -592 гена ИЛ-10 ($P<0,05$), а также с более частым наследованием гомозиготного генотипа Arg/Arg 25 кодона гена TGF β 1 и T/T гомозиготным генотипом наследования гена ангиотензиногена AT-6 ($P<0,05$). Наследование профибротических генотипов обоих генов (TGF β 1 25 кодон Arg / Arg генотип и AT-6 T/T генотип) ассоциируется с клиникой декомпенсированного ЦП.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Abbas Z. Interspousal transmission of hepatitis C: concerns and facts // J Coll Physicians Surg Pak. – 2005, Oct. – 15(10). – 585-6.
- 2 Moor K.W, O'Garra A., de Waal Malefy R, Vieira P, Mosmann T. Interleukin 10. // Annu Rev Immunol. – 1994. – 11. – 165-90.

- 3 Oral HB, Kotenko SV, Yilmaz M, Mani O, Zumkehr J, Blaser K, Akdis CA, Akdis M. Regulation of Tcells and cytokines by the interleukin-10 (IL-10)-family cytokines IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26 // Eur. J. Immunol. – 2006. – 36. – 380–388. [PubMed: 16365913].
- 4 Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin // J Hepatol. – 2002, Feb. – 36(2). – 271–7.
- 5 Oleksyk TK, Thio CL, Truelove AL, Goedert JJ, Donfield SM, Kirk GD, Thomas DL, O'Brien SJ, Smith MW. Single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the IL10 region associated with HCV clearance // Genes Immun. – 2005. – 6. – 347–357. [PubMed: 15815689].
- 6 Bedossa P., Paradis V. Transforming growth factor -beta (TGF β) : a key-role in liver fibrogenesis // J. Hepatology. – 1995. – 22. – 37–42.
- 7 Kim SK, Ohta K, Hamaguichi A, Omura T et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor -beta and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats // J Pharm Exp Ther. – 1995. – 273. – 509–515.
- 8 J. Massard, V. Ratiu, D. Thabut, J. Moussalli, P. Lebray and Y. Benhamou et al., Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C // J Hepatol. – 2006. – 44. – P. S19–S24.
- 9 Lugo-Baruqui A, Muñoz-Valle JF, Arévalo-Gallegos S, Armendáriz-Borunda J. Role of angiotensin II in liver fibrosis-induced portal hypertension and therapeutic implications. – Hepatol Res. 2009 Sep 7.
- 10 Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, et al. Genotype variation of Transforming growth factor -beta1 gene: association with the transforming growth factor - beta1 production, fibrotic lung diseases, and graft fibrosis after lung transplantation // Transplantation. – 1998. – 66. – 1014–1020.
- 11 J. Massard, V. Ratiu, D. Thabut, J. Moussalli, P. Lebray and Y. Benhamou et al., Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C // J Hepatol. – 2006. – 44. – P. S19–S24.

Б. С. Ильясова

ҚАЗАҚ ПОПУЛЯЦИЯСЫНДАҒЫ СОЗЫЛМАЛЫ С ГЕПАТИТИНІҢ ҮДЕУІНЕ
ЖӘНЕ АҚЫРЫНА ФИБРОГЕНЕЗДІҢ МАҢЫЗДЫ ДАБЫЛДЫ
МОЛЕКУЛАРАНЫҢ ГЕНДЕР КӨПТҮРЛІЛІГІНІҢ ӘСЕРІ

Берілген мақалада қазақ популяциясындағы созымалы С гепатиті және бауыр циррозы бар науқастардағы аурудың үдеуінә ангиотензин-6 және TGF β 1 гендері, интерлейкин-10 генінің гендер көптүрлілігін зерттеу інтижелері көрсетілген. Созымалы С гепатиті бар науқастарда ИЛ-10 генінің 1082 кодонының G/G гомозиготтарының дәлелді тәмен жиілігі байкалады. Бауыр циррозының дамуы 1082 кодонының A/A генотипінің гомозиготты жиілеу тұқымқуалауымен, ИЛ-10 генінің Т-С/т-819 аллелінің гетерозиготты тұқымқуалауымен ($P<0.005$), ИЛ-10 генінің 592 кодонының С/С гомозиготты генотипті тұқымқуалауымен ($P<0.05$), Arg аллелінің гомозиготты тұқымқуалауымен және TGF β 1 генінің 25 кодонының Pro аллелінің дәлелді жиі кездесуімен байланыстырылады. Бауыр циррозының дамуы TGF β 1 генінің 25 кодонының Arg/Arg генотипінің гомозиготты жиілеутұқымқуалауымен және AT-6 генінің Т/Т гомозиготты генотипінің тұқымқуалауымен ($P<0.05$) байланыстырылады. Екі гендері (TGF β 1 25 кодон Arg/Arg генотип және AT-6 T/T генотипі) профибротикалық генотиптердің тұқымқуалауы орнына келмейтін бауыр циррозы клиникасымен байланыстырылады.

B. S. Ilyassova

EFFECT OF GENE POLIMORPHISM ON IMPORTANT
SIGNALLING MOLECULE FIBROGENESIS ON THE ADVANCE
AND THE OUTCOME OF CHRONIC HEPATITIS AMONG KAZAKH POPULATION

In this paper there are described the results of study of gene polymorphisms of IL10, of transforming growth factor - beta1 (TGF β 1) and angiotensinogen-6 in patients with chronic hepatitis C (CHC) and with the liver cirrhosis (LC) caused by CHC in Kazakh population. In patients with the CHC there are shown significantly low frequency of homozygote G/G of codon -1082 of IL10 gene. The development of LC are associated with the higher frequency on inheritance of allele T – C/T -819 IL10 gene ($P<0.005$), with the homozygote genotype C/C of codon -592 od the IL10 gene ($P<0.05$), with inheritance of the allele Arg and significance low frequency of inheritance of allele Pro of 25 codon of TGF β 1 gene.

Development of LC is associated with higher frequency of inheritance of homozygote genotype Arg/Arg 25 codon TGF β 1 gene and T/T genotype of AT-6 gene ($P<0.05$). Inheritance of profibrotic genotypes both genes (TGF β 1 Arg25Arg and AT-6 T/T genotype) is associated with the clinic of progressive LC.