

Анализ ассоциации полиморфизма генов цитокинов IL-4, IL-10 и TNF с биохимическими и иммунологическими показателями у больных хроническим гепатитом С

For cite: Aktual'naâ Infektologiâ. 2017;5(6):277-281. doi: 10.22141/2312-413x.5.6.2017.122141

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

Ключевые слова: хронический гепатит С; прогрессирование заболевания; полиморфизм генов цитокинов

Введение

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 хроническим гепатитом С (ХГС), так и хроническим гепатитом В (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 [3–5].

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

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 [9–11].

В исследованиях ряда авторов показано, что генетический статус человека по полиморфным вариантам ряда генов цитокинов является важнейшим фактором, определяющим такие патогенетические признаки течения хронических вирусных гепатитов, как количественное содержание цитокинов, а также уровень биохимических показателей крови [12–14].

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 вышеизложенным 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 α 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, представляется целесообразным провести анализ ассоциации комбинации генов цитокинов IL-4 (C589T), IL-10 (G1082A) и TNF α (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 α (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 пациентов составил $42,00 \pm 3,08$ года. 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 людьми, их средний возраст составляет $32,00 \pm 1,05$ года. Количество женщин и мужчин 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, щелочную фосфатазу (ЩФ).

Для подтверждения диагноза хронического гепатита С были использованы основные серологические

маркеры (анти-HCV-IgM, качественное и количественное определение РНК HCV с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также генотипа вируса).

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

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

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 среднего арифметического (M) и ошибки среднего арифметического ($\pm m$). С целью выявления корреляционных зависимостей между отдельными показателями был применен коэффициент корреляции Спирмена.

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

Результаты и обсуждение

Клиническое течение ХГС в группе обследованных больных характеризовалось отсутствием цикличности заболевания. Астеновегетативный синдром наблюдался у всех больных (100 %), диспептический — у 86 пациентов (86 %), артралгический — у 41 (41 %). Желтуха наблюдалась редко (11 %), была слабовыраженной 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 (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.

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 α	G308A	rs1800620	5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GC-3'

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 $5,8 \pm 0,9$ единицы. 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 равнялся в среднем $97,05 \pm 0,48$ %.

При анализе динамики основных клинических синдромов установлено, что у больных ХГС со степенью

Таблица 2. Иммунологические показатели у больных ХГС и здоровых лиц ($M \pm m$)

Показатель	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+, %	$15,29 \pm 3,60^*$	$10,83 \pm 3,12$

Примечание: * — разница показателей достоверна в сравнении с показателями здоровых людей ($P < 0,05$).

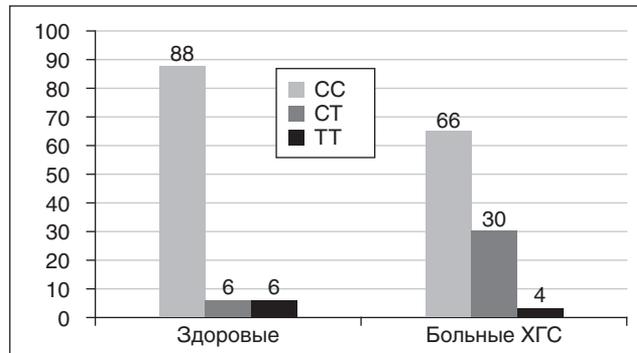


Рисунок 1. Распределение частоты встречаемости генотипов IL-4 (C589T) у больных ХГС и здоровых лиц

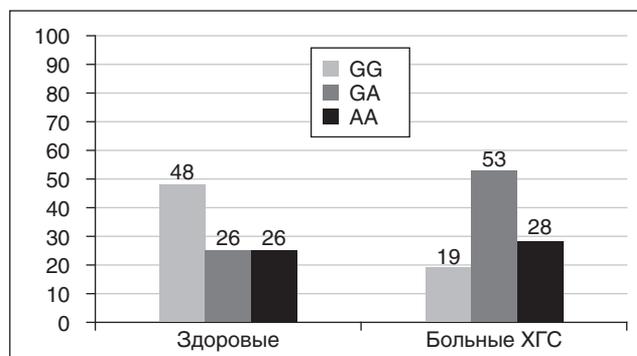


Рисунок 2. Распределение частоты встречаемости генотипов IL-10 (1082G/A) у больных ХГС и здоровых лиц

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).

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

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.

У здоровых лиц преобладал гомозиготный генотип CC 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)

При изучении аллельного полиморфизма TNF α (G308A) в контрольной группе выявлено преобладание гомозиготного типа генотипа GG TNF α (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

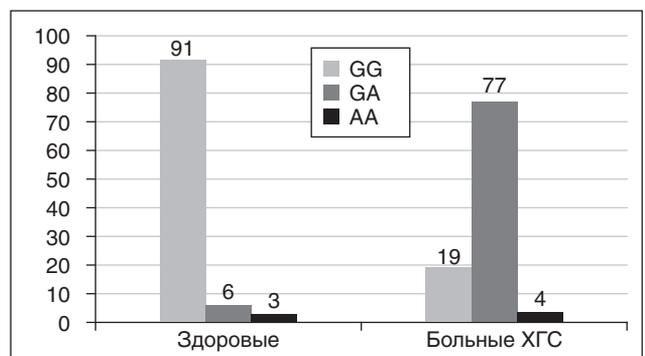


Рисунок 3. Распределение частоты встречаемости генотипов TNF α (G308A) у больных ХГС и здоровых лиц

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 CC, меньшее — у носителей генотипа TT);

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

— обратная корреляционная связь между генотипами TNF α и активностью АлАт и АсАт, $p < 0,01$ (меньшая активность АлАт и АсАт отмечается у носителей генотипа GG, большая — 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 CC IL-4 и GG TNF α обладают противовоспалительной активностью, так как они доминируют у больных со степенью фиброза F0-F1 и менее выраженным дисбалансом иммунного статуса. Возможно, комбинации генотипов TT IL-4 и AA TNF α ассоциируются с профиброгенным эффектом, так как они обнаружены у пациентов с фиброзом F2-F3.

Таким образом, при ХГС носители генотипов TT IL-4 и AA TNF α характеризуются более высоким уровнем повреждения гепатоцитов и степенью выраженности мезенхимального воспаления.

Наличие взаимосвязи активности трансаминаз, иммунологических показателей и определенных генотипов IL-4 и TNF α 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.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии какого-либо конфликта интересов при подготовке данной статьи.

References

1. Ivashkin VT, Iushchuk ND, Kozhevnikova GM, Maevskaia MV, Maev IV. Recommendations for diagnostics and treatment of adults patients with hepatitis C. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2013;23(2):41-70. (in Russian).
2. Kozko VN, Antsyferova NV, Solomennyk AO, Kopychenko YaI. Clinical and epidemiological characteristics of chronic form of HCV-infection. *Hepatology*. 2012;4(18):77-83. (in Ukrainian).
3. Ivashkin VT. Immune homeostasis and immune liver diseases. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2009;19(3):4-12. (in Russian).
4. Kanda T, Yokosuka O, Omata M. Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma. *Biology (Basel)*. 2013 Mar; 2(1):304-316. doi: 10.3390/biology2010304.
5. Kucheryavy YuA, Stukova NYu, Ahtayeva ML. Chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma - links in one and the same chain. *Klinicheskie perspektivy gastroenterologii, gepatologii*. 2012;5:3-11. (in Russian).
6. LobzIn YuV, Nikitin VYu, Sukhina LA, Tsigan VN, Mitin YuA. Immunopathogenesis of viral hepatitis C Immunological markers of the disease progression. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2007;6:75-84. (in Russian).
7. Goncharova IA, Gamal Abd El-Aziz Nasr H, Beloborodova EV, Ozhegova DS, Puzyrev VP. Polymorphism of gene modifiers of immune response in liver diseases of different etiologies. *Medical genetics*. 2010;9(12):20-24. (in Russian).
8. Moroz LV, Jacyk IV. Immunogenetic profile in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2011;12(2):28-33. (in Ukrainian).
9. Nikolaeva LI, Kolotvin AV, Samokhodskaya LM, et al. Analysis of the influence of genetic factors of hepatitis c virus and gene polymorphism in infected patients on the development of liver fibrosis. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni*. 2012;5:7-13. (in Russian).
10. Samokhodskaya LM, Ignatova TM, Abdullayev SM, et al. Prognostic value of combination of allelic variants of cytokine and he-mochromatosis genes in patients with chronic hepatitis C. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2007;17(2):50-56. (in Russian).
11. Avdoshina VV, Konenkov VI, Beloborodova EI, Novitsky VV, Ryazantseva NV, Zima AP. Alleles distribution of polymorphic promoter region c-590t in inter-leukin-4 genes and q-576r and ile-50val regions in il-4 receptor gene il-4ra in patients with HCV-infection. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2007;1:43-46. (in Russian).
12. Goncharova IA, Beloborodova EV, Friedin MB, Beloborodova EI, Chernogoruk GE, Puzyrev VP. Genetic factors determining predisposition to chronic course of virus hepatitis and fibrosis in liver. *Molecular Biology*. 2008;42(2):238-241. (in Russian).
13. Afzal MS, Tahir S, Salman A, et al. Analysis of inter-leukin-10 gene polymorphisms and hepatitis C susceptibility in Pakistan. *J Infect Dev Ctries*. 2011 Jul 4;5(6):473-9. PMID: 21727647.
14. Semyonova NA, Ryazantseva NV, Novitsky VV, Bychkov VA, Chechina OYe. Role of IL6 -174C/G gene polymorphism in development of chronic HCV infection. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2010;9(5):93-97. (in Russian).

Получено 11.09.2017 ■

Усиченко К.Н., Усиченко К.М., Бажора Ю.І.
Одеський національний медичний університет, м. Одеса,
Україна

**Аналіз асоціації поліморфізму генів
цитокінів IL-4, IL-10 і TNF з біохімічними
й імунологічними показниками у хворих
на хронічний гепатит С**

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

Ключові слова: хронічний гепатит С; прогресування захворювання; поліморфізм генів цитокінів

E.N. Usychenko, E.M. Usychenko, Yu.I. Bazhora
Odessa National Medical University,
Odessa, Ukraine

**The analysis of association of polymorphism
of IL-4, IL-10 and TNF cytokine genes
with biochemical and immunological indicators
in patients with chronic hepatitis C**

Abstract. The article presents studies of the genetic profile (IL-4 (C589T), IL-10 (G1082A) and TNF- α (G308A)), clinical and biochemical indices in 100 patients with chronic hepatitis C living in the Odesa region. Possible markers of the severity of disease course and its prognosis were detected.

Keywords: chronic hepatitis C; disease progression; polymorphism of cytokine genes