© **А.Н. Емельянова, Ю.А. Витковский**, 2013
УДК 616.36-002.2-022.7:578.891]-092:[612.6.05:577.21

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ ИЛ2 (*T330G*), ИЛ10 (*C819T*) И ИЛ10 (*G1082A*) ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ С

А.Н. Емельянова, кандидат медицинских наук,
Ю.А. Витковский, доктор медицинских наук, профессор
Читинская государственная медицинская академия
E-mail: yuvitkovsky@rambler.ru

Исследован полиморфизма генов цитокинов ИЛ2 (T330G), ИЛ10 (C819T) и ИЛ10 (G1082A) при хроническом вирусном гепатите С. Проведен анализ частоты встречаемости полиморфизма T330G промоторной области гена ИЛ2, C819T и G1082A промоторной области ИЛ10 у здоровых доноров и больных хроническим вирусным гепатитом С в разные стадии фибротических изменений в европеоидной популяции Забайкальского края. Среди пациентов с хроническим вирусным гепатитом С в разных стадиях фибротических изменений чаще встречается аллель G полиморфизма генов ИЛ2 (T330G), аллель T гена ИЛ10 (C819T), аллель A гена ИЛ10 (G1082A). При ХВГС без признаков цирроза гомозиготный вариант TT полиморфизма ИЛ2 (T330G) выявлялся у 3%, GG – у 3% больных, превалировал гетерозиготный тип TG – у 94%. При ХВГС частота аллеля G гена ИЛ2 (T330G) составила 0,52, аллеля T среди больных – 0,48, в контроле – 0,96. У больных циррозом печени частота аллеля T гена ИЛ2 (T330G) составила 0,71, а аллеля G – 0,29.
Ключевые слова: *генетический полиморфизм, ИЛ2, ИЛ10, хронический вирусный гепатит С*

POLYMORPHISM OF GENES OF CYTOKINES OF IL-2 (T330G), IL-10 (S819T) AND IL10 (G1082A) IN CHRONIC VIRUS HEPATITIS C

A.N. Emelyanova, Yu.A. Vitkovsky
Chita State Medical Academy

Summary. Polymorphism of cytokine genes IL-2 (T330G), IL-10 (S819T) and IL10 (G1082A) in chronic viral hepatitis C. The analysis of the frequency of occurrence T330G polymorphism in the promoter region of the gene IL-2, S819T and G1082A promoter region of IL-10 in healthy donors and patients with chronic hepatitis C at different stages of fibrotic changes Caucasian population of Trans-Baikal region. Among patients with chronic hepatitis C at different stages of fibrotic changes more common G allele polymorphism of IL-2 (T330G), T allele of the gene IL-10 (S819T) allele of the gene IL10 (G1082A). With no signs of chronic hepatitis C cirrhosis - homozygous TT polymorphism IL-2 (T330G) was detected in 3%, GG – 3% of persons, the heterozygotic TG type – 94% prevailed. Among patients with HCV G allele frequency of IL-2 gene (T330G) was 0,52, T allele among patients – 0,48 in the control group – 0,96). In patients with liver cirrhosis frequency of the T allele of IL-2 gene (T330G) was 0,71, and allele G – 0,29.
Key words: *IL-2, IL-10, gene polymorphism, HCV- infection*

ВВЕДЕНИЕ

Хронический вирусный гепатит С (ХВГС) представляет собой одну из важнейших проблем здравоохранения во всем мире в связи с высокой частотой формирования цирроза печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциномы [2–4, 8]. Известно, что у одних больных наблюдается медленный темп развития фиброза печени, у других формирование ЦП происходит быстро [1,17]. Показана роль генетических факторов, которые определяют характер взаимодействия возбудителя и макроорганизма, модифицируют скорость фиброгенеза в печени при ХВГС [2, 12]. К настоящему времени изучена ассоциация полиморфизма примерно 20 генов-кандидатов с ХВГС, особенностями течения этого заболевания и его осложнениями [2, 13–16]. При этом большое значение придается роли полиморфизма генов цитокинов – участников иммунопатогенеза вирусных гепатитов [10, 13, 14].

Важное значение в реализации иммунного ответа играет ИЛ2, который вызывает антигенную неспецифическую пролиферацию всех популяций Т-лимфоцитов, является фактором роста киллерных клеток, принимает непосредственное участие в реализации механизмов противоопухолевого и трансплантационного иммунитета [9].

Показано, что вырабатываемый Thl ИЛ2 принимает участие в клеточном иммунном ответе и ассоциируется с антивирусным эффектом [9,18]. Наличие аллельных вариантов в промоторной области гена ИЛ2 приводит к различным уровням транскрипции данного гена. Доказана роль полиморфизма гена

ИЛ2 в патогенезе ряда заболеваний. В частности, с использованием современных иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования выявлено, что течение инфильтративного туберкулеза легких сопровождается снижением продукции ИЛ2 мононуклеарами периферической крови. Установлено, что подверженность туберкулезной инфекции ассоциирована с аллелем *G*, генотипами *TG* и *GG* полиморфизма *T-330G* гена ИЛ2. Максимальный риск развития инфильтративного туберкулеза легких связан с комбинацией генотипов *GG* полиморфного участка *T-330G* гена ИЛ2. Иммуногенетическим фактором, обладающим протективным эффектом в отношении туберкулеза, являются аллель *T* и гомозиготный генотип *TT* полиморфизма *T-330G* гена [11].

Важную роль в регуляции иммунных и воспалительных реакций играет противовоспалительный цитокин ИЛ10. Обнаружен ряд полиморфизмов, связанных с единичными нуклеотидными заменами в гене ИЛ10. В ряде работ изучали влияние полиморфизмов гена ИЛ10 на печеночную патологию. Данные авторов противоречивы, в том числе о влиянии полиморфизмов гена ИЛ10 на течение вирусных гепатитов [2]. Отмечается ассоциация полиморфизма гена ИЛ10, связанного с более низким уровнем его продукции, с развитием С-вирусного гепатита у больных, перенесших трансплантацию печени [2].

Целью настоящего исследования было изучение частоты аномальных аллельных вариантов ИЛ2 (*T330G*), ИЛ10 (*C819T*) и ИЛ10 (*G1082A*) при ЦП в исходе ХВГС у жителей Забайкальского края.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Нами были обследовано 72 русских пациента с ХВГС, проживающих на территории Забайкальского края (40 мужчин и 32 женщины) в возрасте от 25 до 56 лет (средний возраст 33±4 года). При постановке диагноза использовали Международную классификацию хронических гепатитов, принятую Всемирным конгрессом гастроэнтерологов в Лос-Анджелесе (1994), основанную на этиологическом принципе, и классификацию ЦП по морфологическим признакам Чайлда–Пью.

Диагноз устанавливали на основании данных инструментального исследования (сцинтиграфическое, УЗИ, эластометрия печени), серологического и генетического методов (полимеразная цепная реакция – ПЦР). Стадию фиброза оценивали согласно системе METAVIR [15]. Степень активности заболевания определяли по выраженности отклонений показателей цитолиза от нормы. Для оценки функционального состояния печени у всех пациентов изучали биохимические показатели стандартными унифицированными методами. Критерии исключения – наличие тяжелой соматической патологии, токсического и аутоиммунного гепатита. Пациенты были распределены на 2 группы: основную (40 пациентов с ЦП в исходе ХВГС, класс А по Чайлду–Пью, стадия компенсации) и группу сравнения (32 пациента с II–III стадии ХВГС невысокой степени активности). В качестве контрольной группы обследованы 100 (мужчин – 62, женщин – 38) условно здоровых жителей Забайкалья. Группы были сопоставимы по полу и возрасту. Все обследованные были русские; родились и проживали на территории Забайкальского края. В работе соблюдались этические принципы, подписываемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki (1964, 2000 – поправки) и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Таблица 1

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ *T330G* В ГЕНЕ ИЛ2, *C819T* В ГЕНЕ ИЛ10, *G1082A* В ГЕНЕ ИЛ10 У БОЛЬНЫХ ЦП В ЗАБАЙКАЛЬСКОМ КРАЕ

Генотип	ЦП (n=40)		ХВГС (n=32)		Контроль (n=100)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
T330G в гене ИЛ2						
Генотип *TT*	20	7	11	34	3	3
Генотип *TG*	17	43	9	28	94	94
Генотип *GG*	3	50	12	38	3	3
C819T в гене ИЛ10						
Генотип *CC*	16	40	19	60	70	70
Генотип *CT*	21	53	7	22	27	27
Генотип *TT*	3	7	6	18	3	3
G1082A в гене ИЛ10						
Генотип *GG*	30	75	12	38	91	91
Генотип *GA*	-	-	-	-	2	2
Генотип *AA*	10	25	20	62	7	7

Определение полиморфизма генов ИЛ2 (*T330G*), ИЛ10 (*C819T*) и ИЛ10 (*G1082A*) осуществлялось методом ПЦР с использованием праймеров ООО «Литех» (Москва). Проводили анализ геномной ДНК, выделенной из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь», затем – реакцию амплификации с 2 парами аллельспецифических праймеров. Электрофорез осуществляли в агарозном геле.

Исследованный контингент проверяли на соответствие закону Харди–Вайнберга.

Статистическую обработку данных проводили с помощью электронных программ Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6,0

(StatSoft Inc., США), с определением достоверности различий при p<0,05. Для сравнения частот применялся критерий χ^2 (Пирсона).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в контрольной группе гомозиготный вариант *TT*-полиморфизма ИЛ2 (*T330G*) выявлялся лишь у 3%, *GG* – 3% обследованных, но превалировал (94%) гетерозиготный тип *TG* (табл. 1). У жителей Забайкалья, заболевших ХВГС, превалировал гомозиготный вариант *TT* – 34%. Среди больных ХВГС частота аллели G гена ИЛ2 (*T330G*) составила 0,52, тогда как среди здоровых – 0,04 (p<0,001), аллель *T* – соответственно 0,48 и 0,96 (p<0,001; табл. 2). Обнаружено, что у пациентов с ЦП частота аллели *T* гена ИЛ2 (*T330G*) была несколько выше, чем в группе с ХВГ С без признаков ЦП, и составила 0,71, а аллели *G* – ниже (0,29).

При этом в группе больных с ЦП в исходе ХВГС частота *TT*-полиморфизма гена ИЛ2 (*T330G*) оказалась выше почти в 1,5 раза, чем в группе больных с ХВГС во II–III стадии фибротических изменений, и почти в 15 раз по сравнению с группой контроля (p<0,05; см. табл. 1).

У больных ХВГС преобладали гомозиготные варианты *CC* гена ИЛ10 (*C819T*) – 60% и *AA* ИЛ10 (*G1082A*) – 62% (см. табл.1). У больных ХВГС с переходом процесса в ЦП частота аллели *T* полиморфизма гена ИЛ10 (*C819T*) составила 0,30 и 0,34, что существенно выше, чем в контрольной группе – 0,02 (p<0,001). При этом встречаемость аллели *C* у пациентов оказалась ниже (0,70 и 0,66), чем у здоровых (0,98) (p<0,001; см. табл. 2).

Среди пациентов с ХВГС аллель *A* полиморфизма гена ИЛ10 (*G1082A*) встречалась с частотой 0,63, а при исходе болезни в ЦП – 0,25, тогда как у здоровых – 0,08 (p<0,001). Напротив, частота аллели *G* у больных ХВГС находилась на уровне 0,37 и повышалась в группе с ЦП до 0,75, в контроле – 0,92 (p<0,001; см. табл. 2).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что у пациентов с ХВГС и переходом патологического процесса в ЦП частота встречаемости аллельных вариантов полиморфизма генов медиаторов иммунного ответа – ИЛ2 (*T330G*), ИЛ10 (*C819T*) и ИЛ10 (*G1082A*) существенно отличается от таковой у здоровых.

Известно, что различные полиморфные варианты генов цитокинов могут сказываться на их продукции. Это в свою очередь влияет на направленность иммунного ответа, своевременность и эффективность межклеточной сигнализации [5]. Полиморфизм генов цитокинов является существенным фактором предрасположенности/резистентности к инфицированию [7], развитию заболевания и длительному его течению с осложнениями. Большую роль в этом играют не только отдельные аллели генов, но и их сочетание [7]. Например, аллель *A* в *G308A* гена фактора некроза опухоли α (ФНОα) и аллель *T* и *C589T* ИЛ4 ответственны за повышенную транскрипцию, в результате чего повышается продукция ФНОα и ИЛ4. Значительное повышение концентрации данных цитокинов способствует быстрому прогрессированию гепатита С и более тяжелому его течению. При этом аллель *A* полиморфизма гена ИЛ10 *C592A* и аллель *A* полиморфизма гена ИЛ10 *G1082A* способствуют пониженной продукции ИЛ10. Известно, что ИЛ10 – это провоспалительный цитокин, оказывающий тормозящее действие на Т-хелперы 1-го клона, снижая, таким образом, синтез провоспалительных цитокинов [12]. В случае низкого уровня ИЛ10 поддерживает-

Таблица 2

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ И АБСОЛЮТНАЯ ЧАСТОТА ГЕНОТИПОВ ИЛ2 (*T330G*), ИЛ10 (*C819T*) И ИЛ10 (*G1082A*)

Генотип	Здоровые (n=100)	ХВГС (n=32)	ЦП (n=40)
T330G ИЛ2			
Аллель *T*	0,96	0,48	0,71
Аллель *G*	0,04	0,52	0,29
Генотип *T/T* p^2 ($p^2 \cdot N$)	0,92	0,07	0,02
Генотип *T/G* $2 \cdot pg$($2 \cdot pg \cdot N$)	0,07	0,16	0,17
Генотип *G/G* g^2 ($g^2 \cdot N$)	0,01	0,09	0,03
C819T ИЛ10			
Аллель *C*	0.98	0,7	0,66
Аллель *T*	0,02	0,3	0,34
Генотип *C/C* p^2 ($p^2 \cdot N$)	0,96	0,17	0,16
Генотип *C/T* $2 \cdot pg$($2 \cdot pg \cdot N$)	0,03	0,13	0,1
Генотип *T/T* g^2 ($g^2 \cdot N$)	0,01	0,03	0,05
G1082A ИЛ10			
Аллель *G*	0,92	0,37	0,75
Аллель *A*	0,08	0,63	0,25
Генотип *G/G* p^2 ($p^2 \cdot N$)	0,85	0,04	0,23
Генотип *G/A* $2 \cdot pg$($2 \cdot pg \cdot N$)	0,14	0,15	0,15
Генотип *A/A* g^2 ($g^2 \cdot N$)	0,01	0,13	0,03

Примечание. p^2 ($p^2 \cdot N$) – относительная частота генотипа; $p^2 \cdot N$, $2 \cdot pg \cdot N$, $g^2 \cdot N$ – абсолютная частота генотипа (N – общее число наблюдений).

ся высокая концентрация провоспалительных цитокинов, что также проводит к неблагоприятному течению заболевания. Так, ранее было показано, что наличие аллели *A* в *C592A* и *G1082A* гена ИЛ10 у больных коклюшем способствует пониженной продукции ИЛ10 и развитию осложнений заболевания [6]. У детей с *T/T*-вариантом участка *C589T* гена ИЛ4 продукция ИЛ4, IgM и IgA более высокая, чем у носителей нормальных гомозигот и гетерозигот. Для обладателей полиморфных маркеров в участке *G1082A* ИЛ10 при неосложненном течении также характерна гиперпродукция противовоспалительных цитокинов. Носители *A/A*-варианта *C592A* гена ИЛ10 отличаются гипопродукцией ИЛ10, ИЛ4, IgM. Наличие полиморфных маркеров в участке *G1082A* гена ИЛ10 ассоциировано со сниженным образованием лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов, а следовательно, и с миграцией иммунокомпетентных клеток в очаг повреждения [6].

Полученные результаты являются подтверждением роли ИЛ2 и ИЛ10 в патогенезе поражения печени при хронической HCV-инфекции. Установлена связь наличия аллеля *G* полиморфного варианта *330T/G* ИЛ2, аллеля *T 819C/T* ИЛ10, аллеля *A 1082G/A* ИЛ10 с выраженностью прогрессирования фиброза и поражения печени при хронической HCV- инфекции.

ВЫВОДЫ

У больных с ХВГС в разных стадиях фибротических изменений частота встречаемости аллельных вариантов полиморфизма генов ИЛ2 (*T330G*), ИЛ10 (*C819T*) и ИЛ10 (*G1082A*) существенно отличается от таковой у здоровых.

У больных ХВГС в разных стадиях фибротических изменений чаще встречается аллель *G* полиморфизма генов ИЛ2 (*T330G*), аллель *T* гена ИЛ10 (*C819T*), аллель *A* гена ИЛ10 (*G1082A*).

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаев С.М., Целищева Ю.И., Самоходская Л.М. и др. Генетические факторы агрессивного течения хронического гепатита С // Вестн. РАМН. – 2007; 1: 8–13.
2. Виноградова С.В. Роль полиморфизма генов цитокинов в развитии заболеваний печени // Сучасна гастроентерологія. – 2004; 5 (19): 23–7.
3. Гастроэнтерология. Клинические рекомендации. – М., ГЭОТАР-Медиа, 2009.
4. Горяйнов С.В., Зорин Н.А. На сегодня нет доказательства преимущества в эффективности одного из пегилированных интерферонов-а (2а и 2b) в комбинации с рибавирином в лечении хронического гепатита С (критическая публикация о современной противовирусной терапии хронического вирусного гепатита С с точки зрения доказательной медицины) // Гепатологический форум. – 2010; 2: 2–10.
5. Доржиева Н.Э., Витковский Ю.А., Судакова Л.Р. и др. Полиморфизм гена ИЛ10 (*C819T*) у больных с воспалительными заболеваниями пародонта в Забайкальском крае // Забайкальский мед. вестн. (электронный ресурс). – 2011; 1: 44–48. – Режим доступа: http://medacadem.chita.ru/zmv (10 июня 2011).
6. Епифанцева Н.В., Витковский Ю.А. Взаимосвязь лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии с цитокинами у детей при коклюшной инфекции (Электронный ресурс) // Забайкальский мед. вестн. – 2011; 2: 98–103. – Режим доступа: http://medacadem.chita.ru/zmv.
7. Зима А.П. Система цитокинов и их рецепторов при хронических вирусных инфекциях: молекулярные механизмы дизрегуляции. Автореф. дисс… докт. мед. наук. – 2008. – 43 с.
8. Ивашкин В.Т., Буеверов А.О, Грязин А.Е. Механизмы устойчивости вируса гепатита С к противовирусным препаратам // Мол. медицина. – 2004; 2: 18–23.
9. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины/СПб.: Фолиант, 2008; 550
10. Коротчаева Ю.В., Самоходская Л.М., Сперанский А.И. и др. Прогностическое значение определения ИЛ6 в сыворотке крови и цитохрома Р450 в ткани печени у больных хроническим вирусным гепатитом С//2008; 18 (2): 42–7.
11. Новицкий В.В., Стрелис А.К., Уразова О.И. и др. Полиморфизм генов ИЛ2 и ИЛ4 при инфильтративном туберкулезе легких // Иммунология. – 2009; 2: 88–92.
12. Кузник Б.И., Цыбиков Н.Н., Витковский Ю.А. Единая клеточно-гуморальная система защиты организма // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2005; 2 (22): 3–14.
13. Рязанцева, Новицкий В.В., Белоконь В.В. и др. Цитокины и противовирусный иммунитет // Успехи физиол. наук. – 2006; 37 (4): 1–11.
14. Семенова Н.А., Рязанцева Н.В. Новицкий В.В. Бычков и др. Роль полиморфизма гена ИЛ6 – *174C/G* в развитии хронической HCV-инфекции // Бюллетень сибирской медицины. – 2010; 5: 93–7.
15. Серов В.В. От целлюлярной патологии Вирхова до молекулярной патологии сегодняшнего дня // Арх. патологии. – 2001; 1: 3–5.
16. Фрейдин М.Б., Гончарова И.А., Рудко А.А. и др. Геномные основы подверженности инфекционным заболеваниям // Мол. медицина. – 2006; 3: 39–46.
17. Robert A., Levine, Schuler O., Sanderson. Оценка прогрессирования фиброза на фоне нелеченного хронического гепатита С у жительниц Ирландии, заразившихся в результате использования анти-RhO(D) – иммуноглобулина // Клин. гастроэнтерол. и гепатол. Русское издание. – 2008; 1 (1): 24–31.
18. Bantel H., Schulce K., Cell Deth. Oshoff // Differ. – 2003; 10: 548–60.
19. Bedossa P., Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group // Hepatology. – 1996; 24: 289–93.