

ВАСКУЛОЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЙ ФАКТОР РОСТА И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА VEGF (RS2010963) В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

Булатова И.А.

ГБОУ ВПО Пермская государственная медицинская академия им. ак Е.А. Вагнера Минздрава России, Россия (614090, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26), psmalf@ru

Цель исследования: исследовать уровень васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) в сыворотке крови и оценить функциональную значимость полиморфизма гена VEGF в участке rs2010963 в патогенезе хронического гепатита С (ХГС). **Материал и методы.** Обследовано 100 больных ХГС, группа контроля – 70 здоровых доноров. Исследована концентрация в крови VEGF. Определена частота аллельных вариантов VEGF (rs2010936) и соответствующих генотипов по анализу кривых плавления, полученных при проведении ПЦР. **Результаты.** Выявлено увеличение концентрации VEGF при ХГС по сравнению с контрольной группой ($p=0,001$), значимое увеличение частоты патологической гомозиготы С/С ($\chi^2=4,55$; $p=0,03$) и достоверная взаимосвязь патологического минорного аллеля С гена VEGF (rs2010963) с уровнем VEGF в сыворотке крови ($r=0,25$, $p=0,007$). **Заключение.** Неблагоприятные аллельные варианты гена, преимущественно за счет гомозиготного носительства С/С, могут выступать как факторы наследственного риска развития повреждения эндотелия при вирусном поражении печени и прогрессирования хронического гепатита С. Ген VEGF (rs2010963) следует считать «кандидатным» или геном предрасположенности к ХГС.

Ключевые слова: васкулоэндотелиальный фактор роста, полиморфизма гена VEGF, хронический гепатит.

VASCULAR ENDOTHELIAL GROW FACTOR AND POLYMORPHISM OF VEGF (RS2010963) GENE IN PATHOGENESIS OF CHRONIC HEPATITIS C

Bulatova I.A.

SBEI HPE Perm State Medical Academy named after ac. E.. Wagner, Health Ministry of Russia, Russia, Perm, (614090, Perm, Petropavlovskaya street, 26), psmalf@ru

Aim of research: to explore the level of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the serum and to evaluate the functional significance of VEGF gene polymorphism in rs2010963 sector in the pathogenesis of chronic hepatitis C (CHC). **Material and methods.** 100 patients CHC were examined, the control group included 70 healthy donors. Concentration of VEGF in blood was investigated by ELISA. The frequency of allelic variants of VEGF (rs2010936) and related genotypes on the analysis of melting curves obtained by polymerase chain reaction were estimated. **Results.** An increase in the concentration of VEGF in CHC in comparison with the control group ($p = 0.001$), a significant increase in the frequency of pathological CC homozygotes ($\chi^2 = 4.55$, $p = 0.03$) were detected. A demonstrative correlation of pathologic minor allele T of VEGF (rs2010963) with the level of VEGF serum ($r = 0.25$, $p = 0,007$) were revealed. **Conclusion.** Adverse allelic variants of the gene, mainly due to homozygous carriers of the CC, can act as hereditary risk factors of endothelial damage in viral hepatic disease and progression of CHC. Gene VEGF (rs2010963) may be considered "candidate" genome of predisposition to CHC.

Keywords: vascular endothelial growth factor, polymorphism of VEGF gene, chronic hepatitis C.

Вирусный гепатит С входит в число социально значимых заболеваний и является одной из основных причин хронической болезни печени. По оценкам ВОЗ, в мире 170 млн людей, или 3% населения, инфицированы вирусом гепатита С (HCV) [9]. В настоящее время «золотым стандартом» противовирусной терапии хронического гепатита С (ХГС) является пегилированный интерферон в сочетании с рибавирином. Комбинированная противовирусная терапия обеспечивает устойчивый вирусологический ответ в среднем у 50–60 % больных хроническим гепатитом С, в том числе у 40–50 % пациентов с генотипом 1 HCV и 70–80 % – с генотипами 2 и 3. Индивидуальный подход к лечению, своевременная

профилактика и коррекция нежелательных явлений повышают эффективность лечения, однако почти в 40 % случаев противовирусная терапия оказывается неэффективной [1]. Появился генетический маркер, позволяющий отчасти прогнозировать ее результат: полиморфизм гена интерлейкина 28В (*IL28B*) определяет в известной степени чувствительность иммунной системы пациента к стимуляции интерфероном [2].

В 2009 г. D. Ge и соавт. обнаружили в 19 хромосоме однонуклеотидную замену в *IL28B*, которая, с учетом локализации, была обозначена как rs12979860. В зависимости от азотистого основания, располагающегося в данном локусе, были выделены 2 аллеля: rs12979860 С (цитозин) и rs12979860 Т (тимин). Исходя из комбинации аллелей, возможны 3 генотипических варианта полиморфизма гена *IL28B*: СС, СТ и ТТ. В зависимости от частоты в популяции аллель rs12979860 С является мажорным, т.е. встречающимся чаще, а аллель rs12979860 Т – минорным [6]. Доказано, что частота позитивного ответа на противовирусную терапию выше у пациентов с генотипами rs12979860 СС (70,5 %) и ниже у пациентов с генотипами rs12979860 СТ и ТТ (32,0 % и 23,3 %, соответственно) [10]. Носительство аллеля Т, повышающее вероятность отрицательного ответа на противовирусную терапию, имеет большее значение, чем «защитный эффект» аллеля С. Тем не менее генотип СС способствует элиминации вируса. Определение полиморфизма гена *IL28B* позволило прогнозировать вероятность достижения устойчивого вирусологического ответа с чувствительностью 65 % и специфичностью 78 % для маркера rs12979860 этого гена [6, 11].

Определение генетического полиморфизма этого маркера имеет наибольшее значение для пациентов с генотипом 1 HCV, учитывая более низкую частоту ответа на стандартную противовирусную терапию. В некоторых исследованиях не было выявлено четкой связи между полиморфизмом *IL28B* и частотой устойчивого вирусологического ответа у таких пациентов [7]. Определение генотипа *IL28B* имеет большое значение для оценки потенциального ответа на противовирусную терапию и отбора пациентов, у которых возможны более короткие курсы лечения. В целом полиморфизм *IL28B* – это один из факторов, позволяющих индивидуализировать лечение хронического гепатита С [10]. В литературе есть данные о том, что полиморфизм гена *IL28B* ассоциирован развитием с гепатоцеллюлярной карциномы, индуцированной HCV [5]. Таким образом, представляется интересным изучение взаимосвязи полиморфизма этого гена с тяжестью поражения печени, в частности с нарушениями функциональных печеночных проб, лабораторными тестами фиброза и регенерации печени, что поможет уточнить роль полиморфизма *IL28B* в патогенезе и прогрессировании ХГС.

Цель исследования – изучить взаимосвязь лабораторных маркеров цитолиза, холестаза, гиалуроновой кислоты (ГК), альфа-фетопротеина (АФП), уровня вирусной нагрузки (ВН) и генетического полиморфизма *IL28B* в участке rs12979860 у больных ХГС.

Материалы и методы. Обследовано 100 пациентов с ХГС в фазе реактивации, госпитализированных в Пермскую краевую инфекционную клиническую больницу для начала проведения комбинированной противовирусной терапии. Средний возраст больных составил $38,3 \pm 10,4$ года, из них 48 мужчин и 52 женщины. Этиологическая верификация диагноза проводилась качественным и количественным определением в крови у пациентов РНК HCV с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также серологических маркеров HCV. По генотипу HCV пациенты с ХГС разделились следующим образом: генотип 1 определен у 56 % больных, генотип 2 и 3 – у 44 %. Сопоставимая по полу контрольная группа включала 90 практически здоровых (доноров) лиц со средним возрастом $36,3 \pm 7,9$ лет, не имеющих заболеваний печени.

Биохимические показатели в сыворотке крови определяли на автоматическом анализаторе «Architect-4000» (США). Уровень ГК – прямого маркера фиброза печени в сыворотке крови, оценивали с помощью набора BSM Diagnostics методом иммуноферментного анализа на анализаторе «Stat-Fax» (США) у 76 больных. Концентрацию АФП в сыворотке крови исследовали методом иммунохемилюминисцентного анализа с помощью набора "AFP" (Siemens) на анализаторе «Immulite-1000» (Германия) у 44 больных. В группе контроля концентрацию ГК и АФП исследовали у 20 практически здоровых лиц.

Для выявления полиморфных вариантов маркера rs12979860 гена *IL28B* использовали аллель-специфическую ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени. Дизайн праймеров и зондов осуществляли сотрудники ЗАО «Синтол» (г. Москва). Термоциклирование проводили на детектирующем амплификаторе «CFX-96» Bio-Rad Laboratories, Inc. (США). Для определения генотипов указанного гена у всех пациентов с ХГС и 90 здоровых доноров проводилось выделение ДНК из цельной венозной крови, предварительно стабилизированной ЭДТА.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 7.0 (StatSoft). Проверку распределения результатов проводили по критерию Колмогорова – Смирнова. Для описания полученных количественных признаков данные представляли в виде медианы (Me) и 25, и 75 перцентиля, минимума (min) и максимума (max). Так как распределение показателей ГК и АФП отклонялось от нормального, для оценки значимости различий независимых групп использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Для описания соотношения частот генотипов и аллелей генов использовали равновесие Харди – Вайнберга. Исследуемые группы

находились в равновесном (устойчивом) состоянии по частотам генотипов изученного гена ($p > 0.05$). Различия в двух популяциях рассчитывались по отношению шансов (OR) с использованием подхода «случай-контроль» для различных моделей наследования: аддитивной, общей, мультипликативной, доминантной и рецессивной, и считались достоверными при $p < 0.05$. Количественная оценка линейной связи между двумя независимыми величинами определялась с использованием коэффициента ранговой корреляции по Спирмену (r). Значимость взаимосвязей и различия между выборками считались достоверными при значении для $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

С учетом биохимических показателей крови у пациентов с ХГС был выявлен синдром цитолиза, который характеризовался увеличением в сыворотке крови активности аланиновой (АЛТ) и аспарагиновой трансаминаз (АСТ), мезенхимально-воспалительный синдром (увеличение тимоловой пробы) и синдром холестаза (повышение активности щелочной фосфатазы, прямого билирубина).

В группе больных ХГС отмечено повышенное содержание ГК, что отражает активацию фиброза на фоне хронического воспаления печени, при этом медиана концентрации ГК в крови в 2 раза превышала уровень показателя в группе контроля ($p = 0,01$) (табл. 1). Концентрация АФП, как маркера регенерации гепатоцитов, у больных ХГС также была достоверно выше, чем в контрольной группе.

Таблица 1

Гиалуроновая кислота и альфа-фетопротеин у больных ХГС и в контрольной группе

Показатель, единица измерения	Значение медианы (25–75 % перцентилей); [Min- и Max- величины показателя]		p
	Группа контроля	Пациенты с ХГС	
ГК, нг/мл	21(8,0–31,4); [0,0–63,0]	40,5(24,15–80,5); [7,4–498,2]	0,0023
АФП, МЕ/мл	1,13(0,8–1,49); [0,5–2,64]	2,2(1,66–2,92); [0,86–27,4]	0,0002

p – значимость различий показателя в исследуемых группах рассчитана по тесту Манна – Уитни.

Вирусемия у больных ХГС демонстрировала большие разбросы показателей ВН. Уровень ВН у больных в 70 % был высокий – выше $2 \cdot 10^6$ копий/мл, в 30 % случаев низкий – ниже $2 \cdot 10^6$ копий/мл. При этом минимальная вирусемия составила $0,022 \cdot 10^6$, максимальная – $8800 \cdot 10^6$ копий/мл. Вариабельность вирусемии в группе обследованных при реактивации ХГС согласуется с литературными данными [8].

В настоящем исследовании мы проанализировали однонуклеотидную замену (SNP) в гене *IL-28B* (rs12979860) у 190 человек (90 доноров без хронических заболеваний печени и 100 пациентов с ХГС).

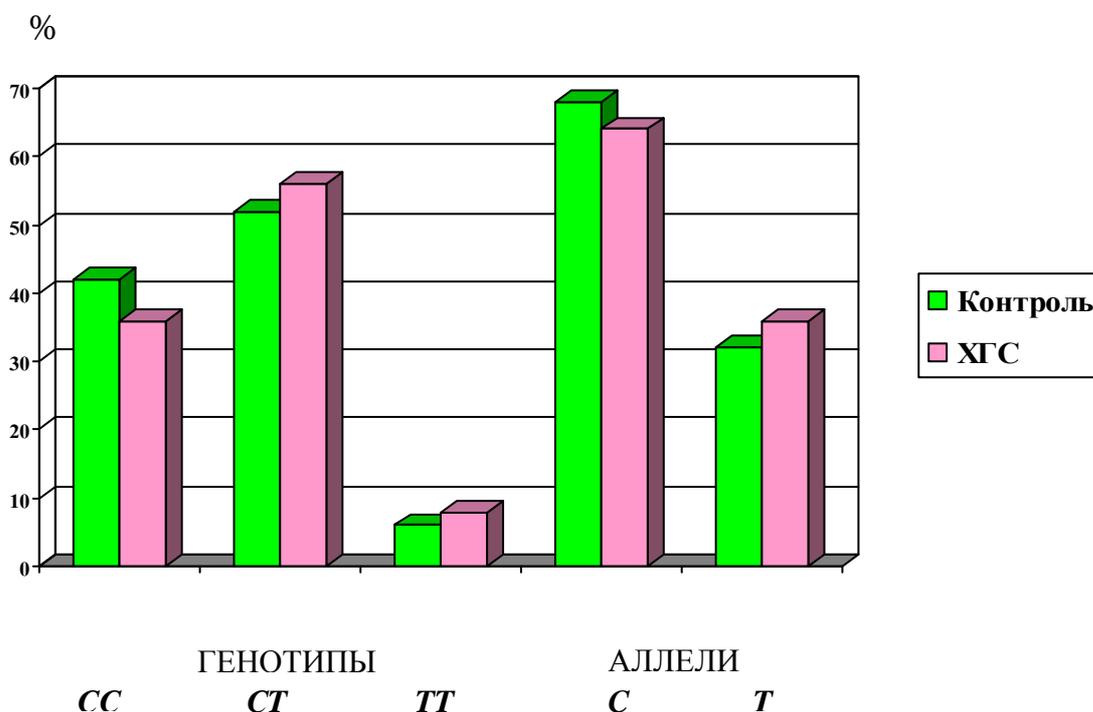


Рисунок 1. Распространенность генотипов и аллелей полиморфизма гена *IL-28B* (rs12979860) у больных ХГС и в группе контроля

Распространенности гомозигот по аллелю С (CC) в группе здоровых и больных ХГС достоверно не отличались ($\chi^2=0,61$; $p=0,44$) и составили соответственно 42 % и 36 % (рис. 1). Встречаемость патологических гомозигот TT в группе здоровых и больных ХГС составила соответственно 6 % и 8 % ($\chi^2=0,35$; $p=0,55$). В обеих группах преобладали гетерозиготы СТ ($\chi^2=0,79$; $p=0,67$). Соотношение частот аллелей изучаемого маркера в исследуемых группах также не характеризовалось различием. Встречаемость патологического минорного аллеля Т в группе с ХГС составила 36 %, в группе контроля 32 % ($\chi^2=0,64$; $p=0,42$). Полученные результаты по встречаемости генотипов и аллелей *IL-28B* (rs12979860) как для здоровых лиц, так и в группе ХГС среди популяции Пермского края практически не отличаются от данных других авторов. В частности, в России распространенность протективного аллеля С в популяции составляет 61–64 %, в наших исследованиях – 64 % у больных ХГС и 61 % в группе контроля [5, 10]. Таким образом, в ходе исследования не было установлено статистически значимого отличия частот генотипов и аллелей маркера *IL-28B* (rs12979860) между группами здоровых индивидуумов и лиц с ХГС. В группе больных ХГС частота аллеля риска Т составила 0,359, что достоверно не отличалось от его частоты 0,319 среди

здоровых. Из 56 больных, инфицированных HCV-1, у 40 человек было выявлено неблагоприятное сочетание генотипов rs12979860 СТ и ТТ (35 и 5 соответственно), что значимо отличалось от группы контроля ($\chi^2=4,55$; $p=0,03$). Таким образом, потенциальный риск развития неустойчивого вирусологического ответа при 1 генотипе HCV составил 71,4 %.

При корреляционном анализе минорный аллель Т гена *IL-28B* (rs12979860) продемонстрировал достоверные взаимосвязи с функциональными печеночными тестами: АЛТ, АСТ, общим и прямым билирубином, что указывает на взаимосвязь полиморфизма гена и тяжести поражения печени. Эти данные также свидетельствуют о неблагоприятном влиянии выраженности цитолиза и холестаза на прогноз противовирусной терапии (табл. 2). Полученные результаты согласуются с данными исследования Agundez J.A. и соавт. (2009), которые выявили взаимосвязь генного полиморфизма с АЛТ, гамма-глутамилтранспептидазой, соотношением АСТ/АЛТ [3].

Таблица 2

Взаимосвязи минорного аллеля Т гена *IL-28B* (rs12979860) с функциональными печеночными пробами, гиалуроновой кислотой и альфа-фетопротеином при ХГС

Показатели	r	p
Аллель Т гена <i>IL-28B</i> и АЛТ	0,25	0,02
Аллель Т гена <i>IL-28B</i> и АСТ	0,22	0,019
Аллель Т гена <i>IL-28B</i> и общий билирубин	0,19	0,049
Аллель Т гена <i>IL-28B</i> и прямой билирубин	0,25	0,02
Аллель Т гена <i>IL-28B</i> и ГК	0,17	0,03
Аллель Т гена <i>IL-28B</i> и АФП	0,25	0,02
Аллель Т гена <i>IL-28B</i> и уровень ВН	0,25	0,021

r – взаимосвязь показателей; p – значимость корреляции.

Положительная достоверная корреляция аллеля Т и ГК указывает на то, что исследуемый ген может быть оценен как фактор прогрессирования фиброза печени. Корреляция с АФП предполагает также взаимосвязь полиморфизма гена с более выраженным поражением печени и риском гепатокарциномы. Eugich D. и соавт. (2012) выявили связь *IL-28B* с АФП при гепатокарциноме на фоне ХГС и с прогрессированием фиброза у пациентов с HCV-инфекцией после трансплантации печени [5]. Взаимосвязь аллеля Т с уровнем ВН может свидетельствовать о более тяжелом поражении гепатоцитов у пациентов с ХГС, что согласуется с выявленной взаимосвязью ГК и степени вирусемии [3]. В целом выявленные взаимосвязи минорного аллеля Т гена с изученными тестами указывают

на тот факт, что генетический полиморфизмом *IL-28B* может реализоваться опосредованно через ряд параметров, участвующих в патогенезе ХГС и оказывающих влияние на эффективность противовирусной терапии. К этим факторам относятся наличие синдромов цитолиза и холестаза, выраженность фиброза печени, активация регенерации гепатоцитов и уровень ВН.

Таким образом, полиморфизм гена *IL-28B* (rs12979860) ассоциирован с тяжестью поражения печени у больных ХГС, что необходимо учитывать для решения вопроса об оптимизации лечения при неблагоприятном сочетании этих факторов, в особенности у пациентов с носительством минорного аллеля Т.

Выводы

1. У пациентов с ХГС в фазе реактивации выявлено повышение ГК и АФП, что свидетельствует об активации фиброза и регенерации в печени.
2. В ходе исследования не было установлено статистически значимого отличия частоты встречаемости генотипов и аллелей гена *IL-28B* (rs12979860) между группами здоровых индивидуумов и больных ХГС с различными генотипами вируса.
3. У 71,4 % больных, зараженных HCV-1, имело место неблагоприятное сочетание генотипов rs12979860 СТ и ТТ и соответственно потенциальный риск развития отрицательного ответа на противовирусную терапию с максимальным его проявлением у гомозигот ТТ.
4. У больных ХГС выявлена взаимосвязь минорного аллеля Т гена *IL-28B* (rs12979860) со степенью выраженности синдромов цитолиза и холестаза, маркерами фиброза и регенерации печени, а также с уровнем вирусемии.
5. Больным ХГС с 1 генотипом HCV для определения прогноза противовирусной терапии и решения вопроса оптимизации лечения необходимо оценивать совокупность факторов: выраженность цитолиза и холестаза, концентрацию ГК, АФП и исходный уровень вирусемии, в особенности у пациентов с носительством минорного аллеля Т гена *IL-28B*.

Список литературы

1. Абдурахманов Д.Т. Перспективы в лечении хронического гепатита С // Клиническая гепатология. – 2010. – № 3. – С. 3-9 .
2. Симанкова Т.В., Гармаш И.В., Аришева О.С., Манухина Н.В. Полиморфизм гена ИЛ-28В как предиктор ответа на противовирусную терапию хронического гепатита С // Клин. фармакол. тер. – 2012. – № 21 (1). – С. 17-22.
3. Щёктова А.П. Взаимосвязь маркеров эндотелиальной дисфункции и фиброза печени с вирусной нагрузкой при хроническом вирусном гепатите С // Современные проблемы науки

и образования (электронный журнал). – 2012. – № 1. – URL: www.science-education.ru/101-5458.

4. Agúndez JA, García-Martin E, Maestro ML, Cuenca F, Martínez C, et al. Relation of *IL28B* Gene Polymorphism with Biochemical and Histological Features in Hepatitis C Virus-Induced Liver Disease. <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0037998>.

5. Eurich D, Boas-Knoop S, Bahra M, Neuhaus R, Somasundaram R, Neuhaus P, Neumann U, Seehofer D. Role of *IL28B* polymorphism in the development of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma, graft fibrosis, and posttransplant antiviral therapy. *Transplantation* / 2012 Mar 27; 93(6):644-9.

6. Ge D., Fellay J., Thompson A. Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance // *Nature*. – 2009. – Vol. 461. – P. 399-401.

7. McCarthy J., Li J., Thompson A. Replicated association between an *IL28B* gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin // *Gastroenterology*. – 2010. – Vol. 138. – P. 2307-2314.

8. Moliner L., Pontisso P., De Salvo G.L. et al. Serum and liver HCV RNA levels in patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and histological features // *Gut*. – 1998. – Vol. 42. – P.856-860.

9. Perz J., Armstrong G., Farrington L. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide // *J. Hepatol.* – 2006. – Vol. 45 (4). – P. 529-538.

10. Stattermayer A.F., Stauber R., Hofer H., Rutter K. et al. Влияние генотипа *IL28B* на ранний и устойчивый вирусологические ответы у ранее не леченных больных хроническим гепатитом С // *Клиническая гастроэнтерология и гепатология*. – 2011. – Т. 4. – № 3. – <http://health.elsevier.ru/journals>.

11. Thomas D.L., Thio C.L., Martin M.P. Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus // *Nature*. – 2009. – Vol. 461 (7265). – P. 798-801.

Рецензенты:

Устинова О.Ю., д.м.н., профессор, заместитель директора по лечебной работе ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь.

Гейн С.В., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УРО РАН, г. Пермь.