

На правах рукописи

Дунаева Людмила Евгеньевна

**КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ТЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКИХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В
ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИММУНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО
СТАТУСА БОЛЬНЫХ**

14.00.05 – внутренние болезни
03.00.15 - генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск 2005

Работа выполнена в ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава и ГУ НИИ медицинской генетики Томского научного центра Сибирского отделения РАМН, г.Томск.

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор
Белобородова Эльвира Ивановна

академик РАМН,
доктор медицинских наук, профессор
Пузырев Валерий Павлович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ
Тепляков Александр Трофимович

кандидат медицинских наук, доцент
Салюкова Ольга Александровна

Ведущая организация: ГОУ ВПО Новосибирская государственная медицинская академия Росздрава

Защита диссертации состоится « ___ » _____ 2005 г. в ___ час.
на заседании диссертационного совета Д 208.096.02 при Сибирском
государственном медицинском университете (634050 г. Томск, Московский
тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Сибирского
государственного медицинского университета (634050 г. Томск, пр. Ленина,
107)

Автореферат разослан «___» августа 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Тюкалова Л.И.

Актуальность работы. Хронические заболевания печени (ХЗП) – одна из актуальных проблем современной медицины, что обусловлено их широкой распространенностью, прогрессирующим течением, развитием тяжелых осложнений и ограниченными возможностями терапии. По данным ВОЗ, от хронических заболеваний печени, включая цирроз и первичную карциному печени, ежегодно погибает более 700 тыс. человек. При всеобщем признании полиэтиологичности ХЗП, ведущая роль в их возникновении принадлежит гепатотропным вирусам [Хазанов А.И., 1999; Радченко В.Г., Шабров А.В., Нечаев В.В., 2000].

Активное участие ученых различных специальностей в решении данной проблемы привело к накоплению знаний о широком спектре вариантов течения и исходов инфицирования гепатотропными вирусами. Однако механизмы хронизации и прогрессирования вирусной инфекции во многом не определены [Ягода А.В., Гейвандова Н.И., Хубиев Ш.М., 2000].

Роль генетических факторов в патогенезе заболеваний печени очевидна, но на сегодняшний день не установлены конкретные гены, лежащие в основе подверженности к заболеванию и механизмов его развития [Bathgate A.J., 2000; Wasmuth H.E., 2003; Игнатова Т.М., 2002; Пинцани М., 2002]. Изучение генетических основ предрасположенности к вирусным гепатитам и детерминации индивидуальных особенностей течения и исхода заболевания, обретает все большую актуальность. Среди маркерных систем большое внимание уделяется генам иммунной системы, медиаторы которой, в частности, принимают участие в регуляции воспалительного процесса и фиброза печени у больных ХВГ. Центральное место в регуляции и развитии как локального иммунного ответа в месте репродукции возбудителя, так и в общей реакции организма на патоген принадлежит цитокинам [Фрейдлин И.С., Назаров П.Г., 1999]. Существующие на сегодня данные позволяют предположить, что полиморфные варианты генов цитокинов способны принимать активное участие в формировании специфического иммунного ответа на патологические состояния человека [Lipsitch M., 2002; Roy S., 2002; Plebanski M., 2002; Gonzalez E., 2001]. При этом отдельные аллельные варианты ассоциированы с уровнем продукции соответствующего белкового продукта, что тоже оказывает влияние на характер течения, возникновение определенных осложнений заболевания.

В связи с этим, представляет интерес изучение полиморфных вариантов генов цитокинов для определения генетических факторов подверженности и прогнозирования исхода заболевания при заражении вирусом гепатита. Кроме того, учитывая, что этиологическим фактором ХВГ является инфекция, обоснованным представляется изучение гена макрофагального протеина 1 (NRAMP1), ассоциированного с естественной резистентностью к инфекционным заболеваниям, который участвует в определении чувствительности или невосприимчивости к некоторым инфекционным агентам [Govoni G., Gros P., 1998]. В последние годы

выполнено большое количество исследований ассоциации этого гена с некоторыми заболеваниями человека, в том числе инфекционной этиологии [Donninger H., 2004; Abe T., 2003; Mohamed H.S., 2004; Abel L., 1998].

Исследования генетической компоненты хронических вирусных гепатитов (ХВГ) наиболее интенсивно стали проводиться в последнее время. Ведется активный поиск генов-кандидатов подверженности к вирусным гепатитам. С этой целью изучаются гены различных систем организма, это, в первую очередь, целый спектр генов иммунной системы (*TNF α* , *IL1*, *IL6*, *IL10*, *TGF*, *IFN γ* , *CCR5*, *RANTES*), ренин-ангиотензиновой систем (*AT*, *ACE*) и другие. Получены данные о функциональной значимости различных полиморфных вариантов гена *TNF α* в формировании предрасположенности к вирусным гепатитам В и С в популяциях европеоидного (-308G/A) и монголоидного (-863C/A) происхождения [Hohler T., 1998; Yee L.J., 2000; Goyal A., 2004; Yoon Jun Kim, 2003]. Проведено большое количество исследований по изучению вовлеченности гена *IL10*. Показан вклад полиморфизмов -592A/C, -1082G/A, -819T/C в предрасположенность к гепатиту С, ответ на терапию и исход заболевания в европеоидных и монголоидных популяциях [Yee L.J., 2001; Vidigal P.G., 2002; Tambur A.R., 2001; Lio D., 2003; Knapp S., 2003]. Однако полученные результаты зачастую носят противоречивый характер. Так для полиморфизмов генов *TNF α* и *IL10*, рядом исследователей не было показано ассоциаций с гепатитом [Hohler T., 1998; Rosen H.R., 2002; Constantini P.K., 2002; Barrett S., 2003; Powell E.E., 2004; Ben-Ari Z., 2003; Mangia A., 2004]. То же касается и полиморфных вариантов других исследованных генов. В отношении связи генов *IL12B* и *NRAMP1* с ХВГ имеются лишь единичные исследования [Romero-Gómez M., 2004; Yin L.M., 2004].

Таким образом, гены *TNF α* , *IL12B* и *NRAMP1* требуют дальнейшего изучения и уточнения их роли в предрасположенности к развитию ХВГ и особенностях течения заболевания. Информации об исследовании связи генов *IL4*, *IL4RA* с ХВГ в доступной литературе не обнаружено.

Цель исследования. Изучить клинико-морфологические особенности течения хронических вирусных гепатитов в зависимости от количественных показателей цитокинового обмена и полиморфных вариантов генов *IL4*, *IL4RA*, *IL12B*, *TNF α* и *NRAMP1*.

Задачи исследования:

1. Исследовать продукцию цитокинов - ИЛ4, ИЛ6, ИЛ2, ИЛ10, ИЛ12, γ -ИФН и ФНО α мононуклеарными клетками крови у больных хроническими вирусными гепатитами в зависимости от клинико-морфологической активности и стадии процесса с целью определения их диагностической значимости.
2. Охарактеризовать полиморфные варианты генов *IL4* (С-590Т), *IL4RA* (Ple50Val), *IL12B* (A1188С), *TNF α* (G-308А) и *NRAMP1* (D543N, 469+14G/С) у больных хроническим вирусным гепатитом.
3. Провести анализ ассоциаций аллельных вариантов генов цитокинов и гена макрофагального протеина 1 с хроническим вирусным гепатитом, его

морфологическими критериями прогрессирования - стадией фиброза, на основе чего изучить возможности прогнозирования характера течения заболевания.

4. Оценить связь аллельных вариантов генов *IL4*, *IL4RA*, *IL12B*, *TNF α* , *NRAMP1* с патогенетически значимыми количественными показателями цитокинов у больных хроническим вирусным гепатитом.

Научная новизна. Впервые проведено исследование полиморфизма генов *IL4*, *IL4RA*, *NRAMP1* (полиморфизмы D543N, 469+14G/C) у больных хроническим вирусным гепатитом; изучена вовлеченность аллельных вариантов генов *IL4*, *IL4RA*, *IL12B*, *TNF α* , *NRAMP1* в формирование предрасположенности к хроническим вирусным гепатитам; проведено исследование связи полиморфных вариантов генов *IL4*, *IL4RA*, *IL12B*, *TNF α* , *NRAMP1* с качественными и количественными признаками, патогенетически значимыми в развитии заболевания. Установлена значимость генов *IL4* (C-590T) и *NRAMP1* (D543N) в предрасположенности к хроническому вирусному гепатиту. Выявлена связь полиморфных вариантов генов *IL4*, *NRAMP1* с хроническим вирусным гепатитом, генов *IL4RA* (полиморфизм Ile50Val) и *TNF α* (полиморфизм G-308A) со стадией фиброза. Показана связь гена *TNF α* (полиморфизм G-308A) с уровнем ФНО α , гена *IL12B* (полиморфизм A1188C) – с уровнем ИЛ4.

Практическая значимость работы. Сведения о вкладе генетических факторов в развитие и варианты течения ХВГ и структуре наследственной компоненты в терминах конкретных генов, а также обнаруженные взаимосвязи аллельных вариантов, участвующих в регуляции цитокинов, могут быть использованы в создании исследовательских и диагностических панелей маркеров. Полученные молекулярно-генетические данные могут стать основой прогноза течения, исхода заболевания, а также индивидуализированного подхода в лечении ХВГ.

Положения, выносимые на защиту:

1. У пациентов с хроническим вирусным гепатитом в ответ на инфекцию гепатотропными вирусами типичным является смещение иммунного ответа в сторону цитокинов Th2-типа вне зависимости от степени активности и стадии хронизации процесса, что приводит к персистенции вирусной инфекции и прогрессированию процесса.

2. В случае контакта с гепатотропным вирусом, риск развития хронического вирусного гепатита повышен у лиц, имеющих однонуклеотидные замены в генах *IL4* (C-590T) и *NRAMP1* (D543N).

Риск развития фиброза печени увеличивается у больных хроническим вирусным гепатитом – носителей гетерозиготного генотипа полиморфного варианта гена *IL4RA* (Ile50Val), у пациентов с гетерозиготным генотипом по полиморфизму G-308A гена *TNF α* с большей вероятностью сформируется слабый фиброз.

3. У больных хроническим вирусным гепатитом уровень провоспалительного цитокина ФНО α детерминирован одноименным геном (полиморфизм G-

308А). Продукция противовоспалительного ИЛ4 ассоциирована с полиморфным вариантом А1188С гена *IL12B*.

Внедрение результатов работы в практику. Данные по результатам исследования иммуно-генетического статуса больных хроническими вирусными гепатитами используются в учебно-педагогическом процессе кафедры терапии ФПК и ППС СибГМУ и кафедры госпитальной терапии СибГМУ.

Апробация работы. Основные положения работы докладывались и обсуждались на 11-ой и 12-ой научно-практических конференциях «Достижения современной гастроэнтерологии» (сентябрь 2003, 2004гг., г. Томск), научно-практических конференциях «Диагностика и лечение хронических гепатитов, достижения и перспективы» (март 2003г., апрель 2004г, г. Томск), на областном научно-практическом обществе терапевтов (Томск, 2004), на заседании проблемной комиссии «Внутренние болезни» (Томск, 2001г.), на заседании экспертной комиссии по «Внутренним болезням» СибГМУ (Томск, 2005г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ в отечественной и зарубежной печати.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 138 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Данные проиллюстрированы 21 таблицей и 10 рисунками. Список литературы включает 306 источников, из них 218 зарубежных.

Материалы и методы исследования

Работа проводилась с 2001 по 2005 год на кафедре терапии ФПК и ППС Сибирского государственного медицинского университета (зав. кафедрой – д.м.н., профессор Белобородова Э.И.), ГУ НИИ медицинской генетики Томского научного центра СО РАМН (директор НИИ – академик РАМН, д.м.н., профессор Пузырев В.П.), на базе гастроэнтерологического отделения ГУЗ ТОКБ г. Томска (гл. врач – Серых Б.Т.).

В исследование были включены 80 пациентов (67,5% мужчин и 32,5% женщин) в возрасте от 17 до 56 лет, (средний возраст $30,8 \pm 1,39$) с хроническим вирусным гепатитом. Все пациенты проживали в Томской области. ХВГ-С диагностирован у 55 человек (68,75%). ХВГ-В выявлен у 16 больных (20%). Сочетанное инфицирование вирусами гепатита В и С обнаружено у 9 пациентов (11,25%). В группу сравнения вошли 128 практически здоровых лиц, проживающих в г. Томске. Основная группа и группа сравнения были сопоставимы по полу и возрасту.

Давность хронического вирусного гепатита была от полугода до 36 лет, в среднем составляя $7,02 \pm 3$ года. До момента исследования больные не получали длительных, рекомендованных ведущими гепатологами, стандартных схем этиотропной противовирусной терапии. Пациенты, получавшие на момент исследования лечение препаратами интерферона, в

работу включены не были. Критерием исключения больных из исследования также являлось наличие цирроза печени. Клинически и анамнестически у обследованных были исключены злоупотребление алкоголем, прием гепатотоксичных веществ. У части больных в анамнезе были эпизоды наркомании, не превышавшие 12 месяцев; на момент обследования абстиненция была более 6-ти месяцев. На учете у нарколога больные не состояли. У всех обследованных была исключена тяжелая сопутствующая патология.

Всем больным проведены общеклинические методы исследования: ОАК, ОАМ, ЭКГ.

Диагноз хронического вирусного гепатита основывался на наличии клинико-инструментальных симптомов (гепато-, спленомегалии) [верифицировались по данным УЗИ: для печени переднее-задний размер правой доли более 130 мм и левой – более 70 мм, высота правой доли – более 140 мм и левой – более 100 мм, для селезенки – длинник более 120 мм и поперечник более 60 мм], клинико-лабораторных синдромов: цитолиза (повышение в сыворотке крови АсАТ, АлаТ, γ -ГТП), холестаза (повышение в сыворотке крови билирубина, щелочной фосфатазы), мезенхимально-воспалительного (повышение тимоловой пробы, γ -глобулинов сыворотки крови). Синтетическую функцию печени характеризовал протромбиновый индекс (ПТИ), определявшийся методом Квика и общий фибриноген, определявшийся унифицированным методом Рутберга. Этиологическая верификация диагноза проводилась выявлением в сыворотке крови ДНК HBV, РНК HCV (метод ПЦР), серологических маркеров HBV (HBeAg, HBeAb, HBsAg, HBcAb IgM, HBcAb сумм.) и HCV (анти-HCV IgG к core, неструктурным белкам (NS3, NS4, NS5), анти-HCV IgM). Генотип вируса гепатита С определен у 20 человек, среди них в 55% случаев (n=11) выявлен 1b генотип. Морфологическая верификация диагноза по биоптату печени с установлением степени активности и стадии хронизации процесса проведена 80 больным (в 100% случаев).

Биоптаты получали методом слепой чрескожной пункционной биопсии печени под местной инфильтрационной анестезией 2%-раствором новокаина бмл. Забор материала осуществлялся после исключения всех абсолютных и относительных противопоказаний, предварительного общеклинического обследования пациентов с обязательным контролем основных показателей гемостаза. Для получения биоптата использовался одноразовый набор «Нераfix» фирмы «Braun» (Германия) с внутренним диаметром иглы от 1,4 до 1,8 мм и длиной иглы 88мм. Взятый для исследования фрагмент помещался в фиксирующую жидкость, состоящую из 96% спирта и формалина в соотношении 1/4. Препараты готовились по стандартной методике, заливались в парафин. Срезы толщиной 5-6 мкм исследовались с помощью следующих гистологических методик: окраска гематоксилином и эозином, окраска пикрофуксином по Ван-Гизону коллагеновых волокон соединительной ткани стромы печени, Шик-реакция по Мак-Манусу на гликоген и гликопротеиды, окраска на жир суданом 3.

Индекс гистологической активности (ИГА) гепатита и степень фиброза рассчитывали по Desmet V.J. и соавт. (1994г.), (минимальная активность – от 1 до 3-х баллов, слабая – от 4 до 8-ми баллов, умеренная – 9–12 баллов, высокая – 13-18 баллов; при наличии портального и перипортального фиброза он считался слабым, одной и более порто-портальных септ – умеренным, одной и более порто-центральных септ – тяжелым, наличие ложных долек – циррозом печени).

Иммунологические методы исследования: исследование уровня продукции цитокинов включало определение количества ФНО- α , ИЛ4, ИЛ12, ИЛ2, ИЛ6, ИЛ10 и γ -ИФН в культивированных мононуклеарных клетках крови. Определение уровней цитокинов в супернатантах проводили с использованием твердофазного иммуноферментного метода. Процедуру выполнения иммуноферментного анализа проводили по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Procon», Россия; «Цитокин», Санкт-Петербург; «Cytimmune», США).

Молекулярно-генетическое исследование: исследованы полиморфные варианты генов *IL4* (C-590T), *IL4RA* (Ile50Val), *IL12B* (A1188C), *TNF α* (G-308A), *NRAMP1* (D543N, 469+14G/C). Выделение ДНК проводили методом фенольной экстракции с помощью коммерческого набора «ВектоДНКэкстракция» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Изучение полиморфных вариантов исследуемых генов проводили с помощью амплификации соответствующих участков генома методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в геномной базе данных (GDB) и литературе. Рестрикцию изучаемых участков генома проводили соответствующими рестриктазами, изготовленными фирмой «Сибэнзим» (Новосибирск).

Генотипирование полиморфизмов осуществляли путем ПДРФ-анализа продуктов амплификации соответствующими рестриктазами и последующим разделением продуктов рестрикции в 3% агарозном геле. Фрагменты ДНК окрашивали бромистым этидием и визуализировали в проходящем УФ-свете на установке фирмы Biokad.

Статистические методы: анализ связи уровня цитокинов (ЦК) с морфологическими критериями тяжести гепатита и анализ ассоциаций исследуемых полиморфных вариантов генов с количественными патогенетическими признаками, такими как уровень цитокинов проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа и непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса. Для вычисления зависимости между такими переменными как уровень ЦК и биохимическими показателями активности гепатита использовали корреляционный анализ с помощью критерия Пирсона и методом Спирмена. При описании генетической структуры использовали: тестирование на соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга (РХВ) и сравнение частот аллелей и генотипов проводили с помощью критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и точным тестом Фишера [Вейр, 1995]; определение теоретической и

ожидаемой гетерозиготности рассчитывали по методу Nei (1987). Для оценки ассоциаций полиморфных вариантов генов с патологическим фенотипом рассчитывали относительный риск (OR) [Allison, 1997]. Обсуждение величин OR проводили при уровне значимости не более 5%.

Все расчеты проводили с помощью программ «STATISTICA for Windows 5.0», «Microsoft Excel 97», «Graph PAD Instat», «Graph PAD SoftWare Version 1.12a».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Результаты клинического исследования больных

В клинической картине у больных ХВГ доминировали астенический и болевой синдромы (68,8% и 63,8% соответственно). Реже встречались синдромы диспепсии (15%) и коагулопатии (18,8%). Гепатомегалия выявлена у 41 пациента (51,25%). Пальпаторно печень была увеличена, болезненна, зачастую изменена ее консистенция. Спленомегалия обнаружена в 7,5 % случаев. Физикально у таких больных пальпировался болезненный край селезенки. В большинстве случаев гепато- и спленомегалия, установленные физикально, подтверждались ультразвуковым исследованием. По данным УЗИ у 100% больных обнаружены диффузные изменения печени, проявлявшиеся усилением эхосигналов. Это можно объяснить наличием жировой дистрофии гепатоцитов у данных больных, которая приводит к повышению эхоплотности печени [Подымова С.Д., 1998].

При исследовании биохимических показателей крови наиболее часто выявлялся синдром цитолиза. Повышение АлаТ и АсаТ обнаружено у 86,25 % пациентов. Активность АсаТ увеличивалась в среднем не более чем в 2 раза, а активность АлаТ – в 3 раза. Незначительное повышение показателей общего билирубина выявлено у 17 пациентов (21,25%). Максимальные значения составили 50,9 мкмоль/л. Повышение тимоловой пробы, как проявление мезенхимально-воспалительного синдрома обнаружено в 28,75% случаев. Снижение ПТИ выявлено у 16,25 % пациентов.

Морфологическое исследование биоптатов печени больных позволило определить степень активности и стадию хронизации процесса. Наиболее часто встречалась умеренная степень активности (51,25%). Слабая степень активности встречалась в 28,75% случаев. Наименьшее количество больных имело минимальную (11,25%) и высокую (8,75%) степень активности. Фиброз отсутствовал у 20% больных. В большинстве случаев степень фиброзирования была слабой (38,75%). Умеренный фиброз встречался у 35% пациентов. Тяжелая степень фиброза обнаружена у 5 больных (6,25%).

Исследование продукции цитокинов МНК крови у больных ХВГ

Больные ХВГ характеризовались достоверным изменением цитокин-продуцирующей способности мононуклеарных клеток крови по сравнению с группой контроля (табл.1). У пациентов ХВГ выявлено статистически значимое увеличение спонтанной продукции мононуклеарами (МНК) *in vitro* противовоспалительных ЦК ИЛ4 ($p=0,06$), ИЛ10 ($p=10^{-6}$) с одной стороны и

снижение концентрации такого провоспалительного цитокина, как ФНО α ($p=10^{-6}$), с другой. В то же время уровень спонтанной продукции провоспалительных цитокинов – ИЛ6 и γ -ИФН был достоверно выше у больных ХВГ по сравнению с контролем ($p=10^{-6}$ и 0,043 соответственно). Спонтанная продукция ИЛ12 и ИЛ2 у пациентов ХВГ не отличалась от контрольной группы ($p<0,05$).

Таблица 1

Показатели спонтанной и стимулированной продукции исследованных цитокинов (пг/мл) МНК у больных ХВГ

Цитокины	Показатели продукции ЦК	Больные ХВГ (n=53)	Здоровые доноры (n=25)	P
ФНО α	спонтанная	43,26 \pm 2,71	109,42 \pm 13,99	10⁻⁶
	стимулир.	91,70 \pm 7,70	373,21 \pm 60,37	10⁻⁶
ИЛ4	спонтанная	89,61 \pm 4,60	63,58 \pm 6,28	0,006
	стимулир.	213,13 \pm 14,15	144,92 \pm 13,09	0,019
ИЛ10	спонтанная	175,33 \pm 14,74	61,15 \pm 5,98	10⁻⁶
	стимулир.	383,94 \pm 12,84	153,05 \pm 12,67	10⁻⁶
ИЛ12	спонтанная	61,76 \pm 2,79	65,48 \pm 4,05	0,477
	стимулир.	235,82 \pm 8,38	597,35 \pm 24,34	10⁻⁶
ИЛ6	спонтанная	184,46 \pm 15,11	82,50 \pm 7,12	10⁻⁶
	стимулир.	416,93 \pm 14,74	131,58 \pm 27,36	10⁻⁶
γ ИФН	спонтанная	182,76 \pm 17,87	115,00 \pm 8,68	0,043
	стимулир.	336,71 \pm 23,76	274,58 \pm 16,82	0,495
ИЛ2	спонтанная	50,09 \pm 4,87	41,67 \pm 6,29	0,765
	стимулир.	132,86 \pm 9,82	199,42 \pm 17,73	0,002

Примечание: P – уровень значимости при сравнении уровней цитокинов между больными и здоровыми, полученный с помощью критерия Манна-Уитни.

Таким образом, хронические вирусные гепатиты сопровождаются достоверным изменением цитокин-продуцирующей способности мононуклеарных лейкоцитов крови, что подтверждает вклад этих ЦК в патогенез ХВГ. Разнонаправленные уровни про- и противовоспалительных ЦК при ХВГ вне зависимости от степени гистологической активности и стадии хронизации свидетельствуют о серьезных нарушениях в работе иммунной системы. Функциональный дисбаланс звеньев иммунитета в сторону преобладания Th2-цитокинов типа, биологические эффекты которых направлены не на элиминацию вируса гепатита, а лишь на ограничение интенсивности и распространения воспаления в печени, что сопровождается активным антителообразованием и стимуляцией фибробластов, способствует продолжающейся вирусной агрессии. Это в свою очередь приводит к активному фиброгенезу, который обуславливает тяжесть поражения печени.

Анализ связи уровня цитокинов с морфологическими критериями активности гепатита и стадией хронизации

С целью определения диагностической информативности показателей продукции исследуемых ЦК и возможностей прогнозирования на их основе исхода ХВГ, нами проведен анализ связи продукции цитокинов МНК крови больных в зависимости от гистологической активности процесса в печени и стадии хронизации.

Уровень спонтанной продукции ИЛ2 у больных ХВГ с высокой степенью активности оказался достоверно ниже, чем у лиц с минимальной и слабой активностью ($p=0,007$). Однако данный цитокин не может служить точным предиктором воспалительных изменений в печени при ХВГ. У больных ХВГ уровень стимулированной секреции ИЛ6 и ИЛ12 достоверно уменьшался по мере увеличения степени активности гепатита ($p<0,05$). Полученные результаты можно объяснить истощением резервной возможности синтеза цитокинов МНК крови больных ХВГ при повышенной антигенной стимуляции (вирусы гепатита). Снижение стимулированной продукции МНК ИЛ6, ИЛ12 может служить косвенным показателем высокой активности гепатита.

Нами не установлено достоверных различий уровней всех исследованных цитокинов в зависимости от стадии хронизации гепатита ($p<0,05$) (рис.1).

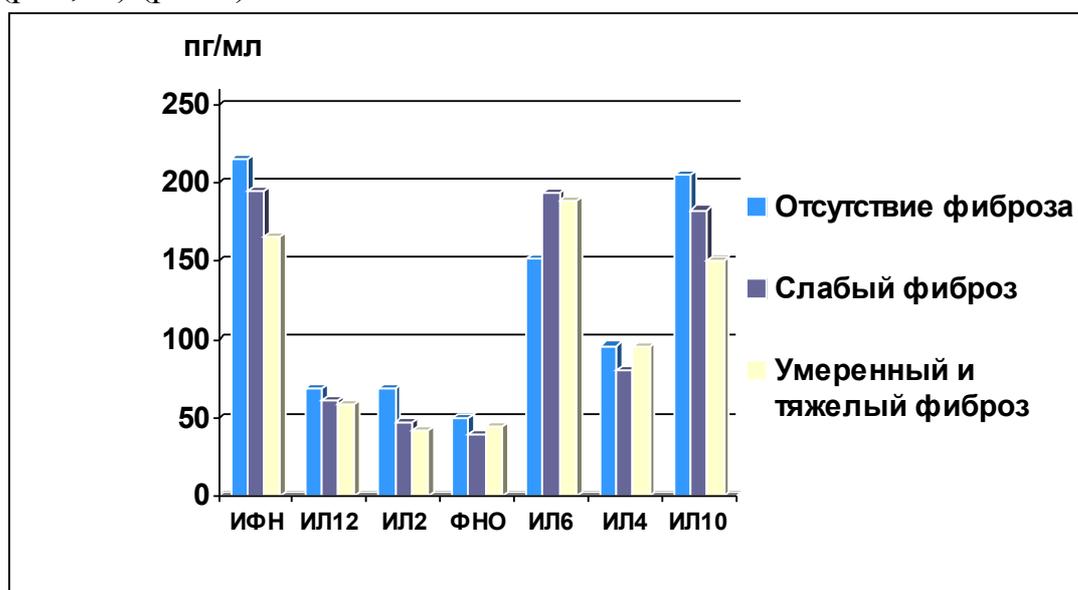


Рис.1.

Спонтанная продукция цитокинов МНК больных ХВГ в зависимости от стадии хронизации

Полученные нами данные не позволяют использовать показатели ЦК в качестве метода оценки тяжести и стадии хронизации гепатита.

Корреляционные связи между клинико-лабораторными синдромами и уровнем цитокинов у больных ХВГ

Для уточнения роли ЦК в патогенезе ХВГ и оценки их прогностического значения, нами было проведено исследование связи биохимических показателей активности гепатита (АлаТ, АсаТ, ЩФ, билирубин, тимоловая проба) с уровнем ЦК с помощью корреляционного анализа. Выявлены немногочисленные, но значимые корреляционные связи между биохимическими показателями и уровнем ЦК у больных ХВГ (рис.2). Как видно из рис. 2, имелась прямая корреляция между уровнем общего билирубина и показателями спонтанной и стимулированной продукции ИЛ6 и стимулированной активностью γ -ИФН. При увеличении концентрации этих цитокинов отмечено увеличение показателей общего билирубина. Полученные данные могут отражать участие этих цитокинов в патогенезе поражения печеночной ткани при ХВГ, а именно в формировании синдромов цитолиза и холестаза.

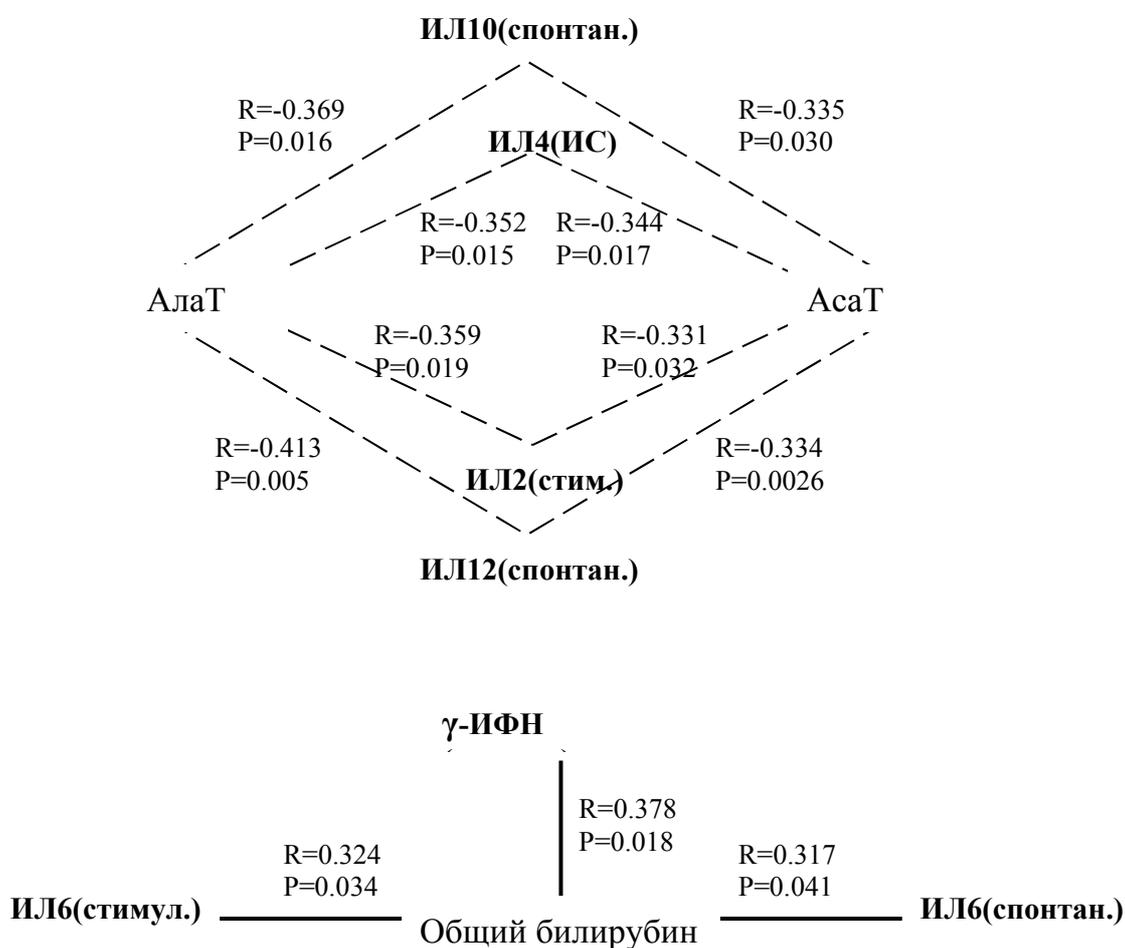


Рис. 2. Корреляционные связи между показателями биохимической активности ХВГ и различными цитокинами (сплошная линия – прямая корреляция, пунктирная линия – обратная корреляция).

Уровни АсаТ и АлаТ имели обратную корреляционную связь со спонтанной продукцией ИЛ10, ИЛ12, а также со стимулированной продукцией ИЛ2.

Полученные связи свидетельствуют об участии данных ЦК в регуляции цитолитического синдрома у больных ХВГ. Следует отметить, что наличие

корреляционных связей между показателями – это математическая модель, позволяющая с большей или меньшей вероятностью предполагать реальную взаимосвязь показателей, поэтому при описании этих связей речь идет о вероятностной взаимосвязи признаков. Тем не менее, предполагаемые гипотезы основаны на достоверных математических моделях, которые будут подтверждаться или отвергаться в ходе дальнейших исследований.

Характеристика полиморфных вариантов генов *IL4*, *IL4RA*, *IL12B*, *TNF α* , *NRAMP1* у больных ХВГ

Согласно поставленным задачам было проведено исследование распространенности аллелей полиморфных вариантов генов *IL4*, *IL4RA*, *IL12B*, *TNF* и *NRAMP1* у здоровых индивидуумов (контрольная выборка) и больных хроническим вирусным гепатитом, проживающих на территории Томской области. Анализ по полиморфным вариантам генов *IL4* (C-590T), *IL4RA* (Ile50Val), *IL12B* (A1188C), *TNF α* (G-308A), *NRAMP1* (D543N, 469+14G/C) в группе контроля и у больных ХВГ не выявил отклонения распределения наблюдаемых генотипов от ожидаемых при равновесии Харди-Вайнберга (ПХВ) (табл. 2).

Таблица 2

Распределение частот аллелей и генотипов исследованных генов у больных ХВГ

Ген	Полиморфизм	Генотипы	N.O.	N.E.	χ^2 d.f.=1	Частота аллеля (%)	$h_{obs} \pm s.e.$ $h_{exp} \pm s.e.$	D
<i>IL4</i>	C-590T	CC	27	26,89	0,004 p=0,949	C-66,4 T-33,6	0,44±0,06 0,45±0,28	-0,008
		CT	27	27,22				
		TT	7	6,89				
<i>IL4RA</i>	Ile50Val	Ile/Ile	21	18,95	0,539 p=0,80	Ile-55,7 Val-44,3	0,43±0,06 0,49±0,01	-0,136
		Ile/Val	26	30,10				
		Val/Val	14	11,95				
<i>IL12B</i>	A1188C	AA	36	35,86	0,011 p=0,92	A-78 C-22	0,34±0,06 0,34±0,04	-0,013
		AC	20	20,27				
		CC	3	2,86				
<i>NRAMP1</i>	D543N	DD	49	49,59	0,726 p=0,39	D-90,2 N-9,8	0,19±0,05 0,18±0,04	+0,109
		DN	12	10,82				
		NN	0	0,59				
	469+14G/C	GG	38	38,40	0,104 p=0,75	G-80 C-20	0,33±0,06 0,32±0,04	+0,042
		GC	20	19,20				
		CC	2	2,40				
<i>TNFα</i>	G-308A	GG	40	40,98	0,726 p=0,394	G-81,9 A-18,1	0,43±0,06 0,48±0,01	-0,105
		GA	20	18,03				
		AA	1	1,98				

Примечание: N.O. – наблюдаемая численность генотипов; N.E. – ожидаемая численность генотипов; критерий χ^2 использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга.

Вайнберга; $d.f.$ – число степеней свободы; $h_{obs} \pm s.e.$ и $h_{exp} \pm s.e.$ – соответственно наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность с ошибкой; D – относительное отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой.

При анализе литературных данных показано, что распределение частот аллелей полиморфных вариантов генов *IL4* (C-590T), *IL4RA* (Ile50Val), *IL12B* (A1188C), *TNF α* (G-308A) и *NRAMP1* (D543N, 469+14G/C) у больных хроническим вирусным гепатитом г. Томска находятся в пределах частот аллелей, полученных для других европейских популяций [Powell E.E., 2000; Thio C.L., 2004; Timothy D. Howard, 2002].

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *IL4*, *IL4RA*, *IL12B*, *TNF α* и *NRAMP1* с хроническим вирусным гепатитом

Изучение вклада аллельных вариантов генов в предрасположенность к заболеванию предусматривает сравнение частот аллелей и генотипов в группах больных и здоровых индивидов в одной и той же популяции. Если частота генетического маркера среди больных значимо выше, чем в контрольной выборке, то данный маркер считается ассоциированным с заболеванием [Пузырев В.П., Степанов В.А., 1997].

Не было показано различий между больными ХВГ и контрольной группой по частотам аллелей и генотипов по аллельным вариантам генов *IL4RA*, *IL12B*, *TNF α* , а также полиморфизму 469+14G/C гена *NRAMP1* (табл. 3). При исследовании аллельного варианта C-590T гена *IL4* нами установлены статистически значимые различия в распределении частот генотипов между больными ХВГ и здоровыми лицами (табл. 3). В группе больных ХВГ отмечена достоверно более высокая частота генотипов, несущих патологический аллель «Т» данного полиморфизма по сравнению с контрольной группой ($p=0,041$). Нами установлены различия между сравниваемыми группами за счет избытка (накопления) гомозиготного генотипа «ТТ» у пациентов с ХВГ (11,5% по сравнению с контрольной выборкой – 3,9%) (табл. 3).

Опираясь на известные данные о том, что точечная замена, C-590T гена *IL4* обуславливают повышенную по сравнению с «диким» типом аллеля («С») активность промотора, и, как результат этого, увеличенную экспрессию и продукцию ИЛ4 [Song Z., 1996], можно предположить, что данный аллель играет значимую роль в особенностях ответа макроорганизма на инфицирование вирусами гепатита.

Анализ D543N полиморфизма гена *NRAMP1* выявил статистически значимые различия в распределении частот генотипов и аллелей у пациентов с ХВГ и в контрольной группе. Аллель «N» данного полиморфного варианта был чаще зарегистрирован у больных ХВГ по сравнению с контрольной группой (9,8% у больных и 4,2% у здоровых); ($p=0,052$) (табл. 3). В группе больных ХВГ зафиксирован недостаток «DD» гомозиготных носителей за счет накопления генотипа «DN» по сравнению с группой контроля ($p=0,045$). «NN» генотипа не было зарегистрировано в обеих группах. Известно, что

полиморфизм D543N гена *NRAMP1* приводит к замене аспарагиновой аминокислоты на аспарагин в кодируемом продукте. Функциональные свойства белка, связанные с заменой аминокислоты не изучены. Как упоминалось ранее, антибактериальная активность белка, кодируемого *NRAMP1*, связана с ионами железа и марганца, необходимых для нормального функционирования ферментов каталазы и супероксиддисмутазы. Опираясь на известные данные, можно предположить, что аминокислотная замена приводит к нарушению функционирования этих ферментов, необходимых для защиты макрофагов в ответ на воздействие патогенного фактора (в данном случае вируса гепатита).

Таблица 3

Частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов исследуемых генов у больных ХВГ и в контрольной группе

Ген	Полиморфизм	Генотипы (аллель)	Контроль		Больные		χ^2	p	OR
			N	%	N	%			
<i>IL4</i>	C-590T	CC	66	51,6	27	44,3	4,175	0,041	
		CT	57	44,5	27	44,3			
		TT	5	3,9	7	11,5			
		T	67	26,2	41	33,6	1,89	0,169	0,70
<i>IL4RA</i>	Ile50Val	Ile/Ile	42	32,8	21	34,4	1,92	0,378	
		Ile/Val	66	51,6	26	42,6			
		Val/Val	20	15,6	14	23			
		Val	106	41,4	54	44,3	0,17	0,678	1,12
<i>IL12B</i>	A1188C	AA	71	59,6	36	61	0,41	0,813	
		AC	44	37	20	33,9			
		CC	4	3,4	3	5,1			
		C	52	21,8	26	22	0,01	0,923	1,01
<i>NRAMP1</i>	D543N	DD	120	91,6	49	80,3	4,01	0,045	
		DN	11	8,4	12	19,7			
		NN	0	0	0	0			
		N	11	4,2	12	9,8	3,75	0,052	2,49
	469+14G/C	GG	65	58,6	38	63,3	0,419	0,811	
		GC	41	36,9	20	33,3			
		CC	5	4,5	2	3,4			
		C	51	23	24	21,8	1,34	0,247	0,84
<i>TNF</i>	G-308A	GG	98	78,4	40	65,6	2,88	0,089	
		GA	26	20,8	20	32,8			
		AA	1	0,8	1	1,6			
		A	28	11,2	22	18,1	2,73	0,098	1,74

Примечание: N – абсолютное число наблюдаемых генотипов и аллелей.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможной роли генотипа «ТТ» C-590T полиморфизма гена *IL4* и аллеля «N» и генотипа «DN» полиморфизма D543N гена *NRAMP1* в ответе «хозяина» на инфекцию вирусным гепатитом. А лица, несущие однонуклеотидные замены в генах

IL4(C-590T) и *NRAMP1* (D543N), имеют большую подверженность к заболеванию вирусным гепатитом в случае контакта с патогеном. Отсутствие статистически значимой ассоциации с ХВГ других полиморфизмов исследованных генов, тем не менее, не исключает возможной вовлеченности данных аллельных вариантов в формирование особенностей течения заболевания, а также их связь с вариантами ответа на проводимую терапию.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *IL4*, *IL4RA*, *IL12B*, *TNF*, *NRAMP1* с морфологическими особенностями течения хронических вирусных гепатитов

Проведенное морфологическое исследование биоптатов печени дало возможность изучить связь полиморфизмов генов *IL4* (C-590T), *IL4RA* (Ile50Val), *IL12B* (A1188C), *TNF α* (G-308A) и *NRAMP1* (D543N, 469+14G/C) со стадией фиброза у больных ХВГ. В настоящем исследовании полиморфизм исследуемых генов рассмотрен в качестве возможного прогностического фактора риска развития фиброза у больных ХВГ.

Для анализа ассоциаций изученных вариантов генов с характером течения заболевания, больные ХВГ были разделены на 3 подгруппы в зависимости от стадии фиброза. К первой подгруппе (I) отнесены пациенты (n=14) без признаков фиброза (индекс фиброза 0). Во вторую подгруппу(II) включены больные (n=21) со слабой степенью фиброза (индекс фиброза 1). Третью подгруппу (III) составили пациенты (n=26) с умеренной и выраженной степенью фиброза (индекс фиброза 2, 3).

Во избежание ложных ассоциаций полиморфных вариантов исследуемых генов с морфологическими критериями заболевания, на первом этапе была определена зависимость стадии фиброза от следующих факторов: пол, возраст, длительность инфицирования, этиология гепатита, генотип вируса гепатита С, морфологическая активность заболевания. Проведенные расчеты показали отсутствие влияния данных факторов на степень выраженности фиброза в группе больных ХВГ (p<0,05) .

При сравнении частот аллелей гена *IL4RA* в подгруппах больных ХВГ, разделенных в зависимости от стадии фиброза, не было обнаружено различий между ними (табл. 4).

Таблица 4

Распределение частот генотипов и аллелей гена *IL4RA* в подгруппах больных хроническим вирусным гепатитом с различной стадией фиброза

Группы по стадии фиброза	Частоты				
	генотипов			аллелей	
	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	Ile	Val
I (n=14)	7 (50%)	1 (7,1%)	6 (42,9%)	15 (53,6%)	13 (46,4%)
II (n=21)	7 (16,7%)	10 (47,6%)	4 (19%)	24 (57,1%)	18 (42,9%)
III (n=26)	6 (26,9%)	15 (57,7%)	4 (15,4%)	27 (54%)	23 (46%)

p*	I и II	0,035	0,968
	I и III	0,004	0,841
	II и III	0,721	0,927

Примечание: * – уровень значимости по двустороннему точному тесту Фишера.

Однако функциональное значение в детерминации генетической предрасположенности пациента к той или иной патологии могут иметь как аллельные варианты, так и генотипы. В проведенном исследовании, несмотря на отсутствие различий в частотах аллелей в исследованных подгруппах больных, были обнаружены различия в частотах генотипов (табл. 4). В подгруппах с различной степенью выраженности фиброза наблюдается накопление гетерозигот по мере увеличения стадии фиброза от 7,1% (I группа), до 57,7% (III группа) (табл. 4). В зависимости от увеличения стадии фиброза происходит накопление гетерозигот за счет уменьшения частоты гомозигот обоих классов. Распределение частот генотипов в подгруппе больных без признаков фиброза (I) отклонялось от ожидаемого при РХВ ($\chi^2 = 10,2681$, d.f.=1, p=0,0013). Недостаток гетерозигот Pe/Val находится на уровне 86%. Причем данная подгруппа больных характеризуется значительным недостатком гетерозигот и по сравнению с контрольной группой (7.1% и 51.6% соответственно) (p=0,002), (табл. 3, 4). Во II и III подгруппах распределение частот генотипов соответствует ожидаемому при РХВ. Частота гетерозигот составляет 47,6% и 57,7% соответственно, что не отличается от контрольной группы, но превышает значения, выявленные для подгруппы больных без признаков фиброза (I группа).

Полученные данные позволяют предположить, что при заражении вирусным гепатитом, носители гетерозиготного генотипа, вероятно, будут иметь повышенный риск развития фиброза печени.

При сравнении групп больных ХВГ с различной стадией хронизации процесса по распространенности аллелей гена *TNF α* достоверных различий обнаружено не было, но наблюдалась тенденция к более частой встречаемости аллеля «А» данного полиморфного варианта гена у больных II группы (слабая степень фиброза) по сравнению с пациентами, у которых фиброз печени отсутствовал (I группа) (28,6% и 8,7% соответственно), (табл. 5).

Таблица 5

Распределение частот генотипов и аллелей гена *TNF α* в подгруппах больных хроническим вирусным гепатитом с различной стадией фиброза

Группы по стадиям фиброза	Частоты				
	генотипов			аллелей	
	GG	AG	AA	G	A
I (n=13)	11(84,6%))	2 (15,4%)	0 (0%)	24 (92,3%)	2 (8,7%)

II (n=21)		9 (42,9%)	12 (57,1%)	0 (0%)	30 (71,4%)	12 (28,6%)
III (n=27)		20(74,1%)	6 (22,2%)	1 (3,7%)	46 (85,2%)	8 (14,8%)
p	I и II	0,041			0,078	
	I и III	0,731			0,588	
	II и III	0,058			0,163	

Однако при этом, нами обнаружены достоверные различия в частотах генотипов по исследованному полиморфизму между сравниваемыми группами больных. У пациентов с ХВГ первой стадии хронизации (II группа) чаще встречался гетерозиготный генотип «GA» гена *TNFα* (57,1%) в отличие от больных с отсутствием признаков фиброза (15,4%) (табл. 5). Кроме того, наблюдалась тенденция к большей частоте гетерозиготных носителей в этой группе (II) по сравнению с больными со средней и тяжелой степенью выраженности фиброза (57,1% и 22,2%), но уровня значимости достигнуто не было (табл. 5). Интересным и одновременно труднообъяснимым представляется тот факт, что увеличение количества пациентов с «GA» генотипом наблюдается только во II группе и отсутствуют различия между больными I и III группы. Вероятно данный полиморфный вариант (G-308A) гена *TNFα* в гетерозиготном состоянии ассоциирован лишь с развитием слабого фиброза печени.

Ассоциации полиморфных вариантов генов *IL4*, *IL4RA*, *IL12B*, *TNF*, *NRAMP1* с количественными показателями цитокинов у больных хроническим вирусным гепатитом

Следующим этапом нашей работы была оценка функциональной значимости исследуемых генов в фенотипической изменчивости количественных признаков, таких как: γ -интерферон (γ -ИФН), фактор некроза опухолей-альфа (ФНО α), интерлейкин-4 (ИЛ4), интерлейкин-2 (ИЛ2), интерлейкин-10 (ИЛ10), интерлейкин-6 (ИЛ6), интерлейкин-12 (ИЛ12).

В итоге сравнения средних значений показателей ЦК у больных-носителей разных генотипов изучаемых генов-кандидатов ХВГ получены следующие результаты. Нами показано, что полиморфизм -308G/A гена *TNFα* связан с уровнем синтеза ФНО- α мононуклеарными клетками (МНК) крови обследованных пациентов (рис.3).

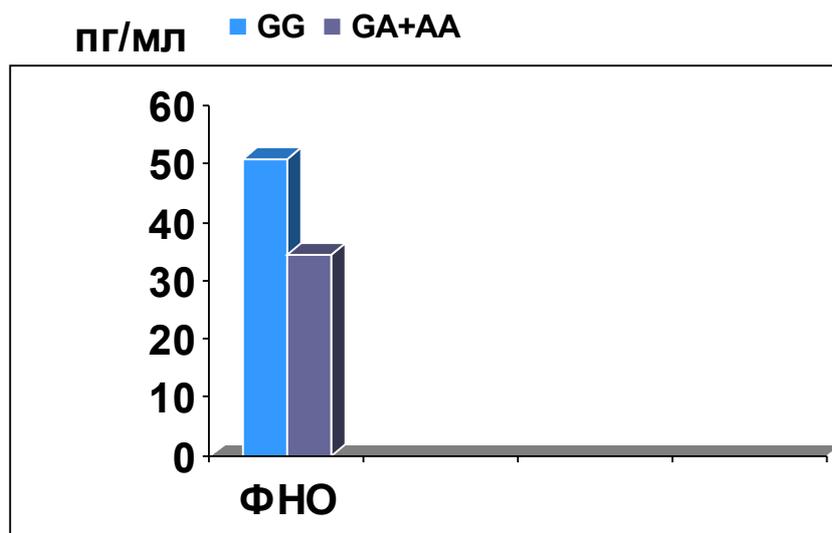


Рис.3. Средний уровень ФНО у больных ХВГ с разными генотипами по гену *TNFα* (G-308A).

У больных ХВГ аллель «А» в гомо- и гетерозиготном состоянии ассоциирован с более низкими средними показателями спонтанной продукции ФНО-α ($p=0,049$). Как показано ранее, нами получены данные по достоверно более частой встречаемости гетерозигот по исследованному полиморфизму гена *TNFα* в группе больных ХВГ со слабой степенью фиброза печени по сравнению с пациентами с отсутствием фиброза (табл. 5). Если у больных - гомозиготных носителей наблюдается более высокая продукция ФНОα, то можно предположить, что у пациентов – носителей «А» аллеля наблюдается превалирование ЦК с противовоспалительными свойствами, что вероятно приводит к начинающимся процессам фиброгенеза.

Кроме того, нами выявлена ассоциация гетерозиготного генотипа «СТ» полиморфного варианта A1188C гена *IL12B* с пониженной продукцией МНК крови ИЛ4 ($p=0,033$) (рис.4).

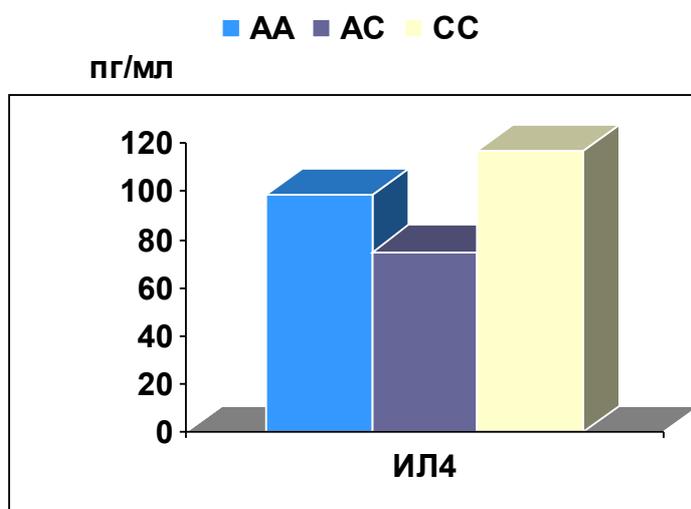


Рис.4. Средний уровень ИЛ4 у больных ХВГ с разными генотипами по гену *IL12B* (A1188C).

Учитывая известные данные об антагонистическом действии ИЛ12 и ИЛ4, возможно полученные результаты являются закономерными. Можно предположить, что особенности продукции и взаимодействия данных цитокинов у больных ХВГ, помимо всего, определяются на генетическом уровне. Однако, полученная ассоциация не указывает на прямую связь между исследованным полиморфизмом гена *IL12B* и уровнем ИЛ4 у больных ХВГ. Не исключено, что в данной ситуации имеет место ситуация сцепления гена *IL12B* с другими генами. Возможно, что данный полиморфизм гена *IL12B* модифицирует эффекты других генов и (или) запускает каскад биологических реакций, приводящий в итоге к изменению уровня ИЛ4.

Суммируя полученные данные можно отметить следующее: полиморфные варианты исследуемых генов вносят определенный вклад в подверженность к развитию хронического гепатита, определяя характер клинических проявлений, и могут иметь прогностическое значение. Результаты настоящей работы предопределяют направления будущих исследований, которые позволят полностью понять эндогенные механизмы персистенции гепатотропных вирусов и формирования хронического заболевания.

Выводы

1. У больных хроническим вирусным гепатитом выявлены достоверные изменения цитокин-продуцирующей способности мононуклеарных клеток периферической крови – увеличение спонтанного синтеза ИЛ4, ИЛ10, ИЛ6, γ -ИФН и уменьшение спонтанной секреции ФНО α , стимулированной продукции ФНО α , ИЛ12, ИЛ2.
2. Выявленное увеличение синтеза мононуклеарными клетками крови ИЛ4, ИЛ10 и уменьшение продукции ФНО α у больных хроническим вирусным гепатитом вне зависимости от степени активности и стадии хронизации процесса отражает смещение цитокинового баланса в сторону факторов с противовоспалительной активностью. Полученные результаты позволяют предположить, что выраженный цитокиновый ответ Th2-типа, характеризующийся избыточной продукцией ИЛ4 и ИЛ10, является типичным для больных хроническим вирусным гепатитом, что приводит к персистенции гепатотропных вирусов и прогрессированию хронического гепатита.
3. Количественное определение спонтанной продукции цитокинов мононуклеарными клетками крови у больных хроническим вирусным гепатитом не может использоваться для оценки степени активности процесса и стадии хронизации.
4. Распределение частот аллелей полиморфных вариантов генов *IL4* (C-590T), *IL4RA* (Ile50Val), *IL12B* (A1188C), *TNF α* (G-308A) и *NRAMP1* (D543N, 469+14G/C) у больных хроническим вирусным гепатитом г. Томска находятся в пределах частот, полученных для других европейских популяций.

5. Выявлены различия по частотам аллелей гена *NRAMP1* (D543N) и генотипов генов *IL4* (C-590T) и *NRAMP1* (D543N) между больными хроническим вирусным гепатитом и здоровыми лицами. Больные хроническим вирусным гепатитом характеризовались повышенной частотой «патологического» аллеля «N» полиморфного варианта (D543N) гена *NRAMP1* и увеличением генотипов, несущих аллель «T» гена *IL4* (C-590T) по сравнению с контрольной группой. Лица, несущие аллели «T» гена *IL4* и «N» гена *NRAMP1* имеют большую подверженность к развитию заболевания хроническим вирусным гепатитом в случае контакта с патогеном.

6. Гены *IL4RA* (Ile50Val) и *TNF α* (G-308A) участвуют в формировании особенностей течения хронических вирусных гепатитов – Ile/Val генотип гена *IL4RA* ассоциируется с более выраженными стадиями хронизации, а генотип G/A гена *TNF α* – со слабой степенью фиброза. Больные хроническим вирусным гепатитом - носители гетерозиготного генотипа по гену *IL4RA* (Ile50Val) будут иметь повышенный риск развития фиброза печени.

7. У больных хроническим вирусным гепатитом уровень продукции ФНО- α мононуклеарными клетками крови ассоциирован с одноименным геном *TNF α* (полиморфизм G-308A) – пациенты с генотипами, несущими аллель «A» характеризуются более низким синтезом ФНО α . Количественные показатели ИЛ4 ассоциированы с полиморфизмом A1188C гена *IL12B* – уровень продукции ИЛ4 мононуклеарами больных хроническим вирусным гепатитом с гетерозиготным генотипом по данному аллельному варианту снижен.

Практические рекомендации

Полученные молекулярно-генетические данные могут быть использовать в клинической практике: 1.Выявление генотипа у больных острыми вирусными гепатитами В и С по полиморфным вариантам генов *IL4* (C-590T) и *NRAMP1* (D543N) на предмет выявления возможной хронизации процесса, на основе чего формировать группы риска. Такой подход позволит индивидуализировать лечебную тактику в отношении пациентов с острыми парентеральными гепатитами (особенно гепатитом С), поможет принять решение о назначении противовирусной терапии, обратит внимание врача на более тщательное диспансерное наблюдение за больными, имеющими генетические факторы риска формирования хронической патологии печени. 2.Определение генотипа у больных ХВГ по полиморфизму Ile50Val гена *IL4RA* и G-308A гена *TNF* с целью оценки прогноза течения (формирование фиброза), исхода заболевания, а в связи с этим индивидуализированного подхода в лечении пациентов с ХВГ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1.Возможности прогнозирования неблагоприятных исходов интерферонотерапии для хронического вирусного гепатита // Материалы IX Российской конференции «Гепатология сегодня» (Москва, 22-24 марта

- 2004г.) / Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2004. – №1. – Приложение №22. – Том XIV. – С.6. (соавт.: Белобородова Э.И., Черногорюк Г.Э., Савченко И.В., Белобородова Е.В., Бурковская В.А., Абдрашитов Р.Ф., Лившиц И.К., Суходолин Д.А., Рован Н.Н.)
- 2.Состояние системы гемостаза у больных хроническими вирусными гепатитами с поражением миокарда // Материалы IX Российской конференции «Гепатология сегодня» (Москва, 22-24 марта 2004г.) / Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2004. - №1. – Приложение №22. – Том XIV. – С.15. (соавт.: Кишук И.П., Белобородова Э.И., Тюкалова Л.И., Абдрашитов Р.Ф., Челнов В.Г.)
- 3.Содержание альфа-фетопротеина в сыворотке крови у больных хроническими вирусными гепатитами // III конференция гастроэнтерологов по Южному федеральному округу, г. Ростов на Дону. – 2004. – С.87-88. (соавт.: Белобородова Э.И., Савченко И.В., Белобородова Е.В., Абдрашитов Р.Ф., Пурлик И.Л., Лившиц И.К.)
- 4.Особенности течения хронических вирусных гепатитов при сочетании с хроническим описторхозом // Клиническая медицина. – 2004. – №8. – С.48-51. (соавт.: Белобородова Э.И., Белобородова Е.В., Бурковская В.А., Внушинская М.А., Савченко И.В., Кишук И.П., Челнов В.Г., Абдрашитов Р.Ф.)
- 5.Метаболические аспекты прогнозирования исходов хронических вирусных гепатитов // Клиническая медицина – 2005. – №2. – С.53-56. (соавт.: Белобородова Э.И., Савченко И.В., Белобородова Е.В., Рачковский М.И., Абдрашитов Р.Ф., Бурковская В.А.)
- 6.Изменение структуры и функции лимфоцитов периферической крови у больных хроническим вирусным гепатитом С // Бюллетень Сибирского отделения РАМН – 2005. – №2. – С. 52-53. (соавт.: Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Наследникова И.О., Токарева Н.В., Ткаченко С.Б., Белобородова Э.И., Белобородова Е.В., Антошина М.А., Белоконь В.В., Жукова О.Б.)
- 7.Прогнозирование исходов хронических вирусных гепатитов // Международная научная конференция «Медико-биологические и экологические проблемы здоровья человека на Севере» (Сургут, 11 ноября 2004г.) – С.92-94. (соавт.: Белобородова Э.И., Савченко И.В., Белобородова Е.В., Абдрашитов Р.Ф., Кнутарева Е.Н., Кишук И.П., Челнов В.Г., Волчановская М.М.)
- 8.Оценка ПОЛ у больных хроническим вирусным гепатитом С // Материалы IX Российской гастроэнтерологической недели (Москва) / Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии – 2003. – Т.13. – №5. – С.82. (соавт.: Белобородова Э.И., Савченко И.В., Нагайцев О.С., Белобородова Е.В., Бурковская В.А.)
- 9.Анализ связи полиморфизма ILE50VAL гена рецептора интерлейкина-4 (IL4RA) с хроническим вирусным гепатитом // Молекулярная биология – Т.39. – №3. – С.379-384. (соавт.: Гончарова И.А., Фрейдин М.Б., Пузырев В.П., Белобородова Е.В., Белобородова Э.И.)

10. Вклад полиморфных вариантов генов IL4 (C-590T), IL4RA (Ile50Val), IL12B (A1188C), NRAM1 (D543N, 469+14G/C) в подверженность к хроническим вирусным гепатитам // Материалы 5-ой Восточно-Сибирской гастроэнтерологической конференции: «Клинико-эпидемиологические и этно-экологические проблемы заболеваний органов пищеварения», г. Красноярск, 27-28 апреля – 2005. – С. 211-219. (соавт.: Гончарова И.А., Белобородова Е.В., Белобородова Э.И., Пузырев В.П., Рудко А.А., Фрейдин М.Б.).

11. Распространенность вирусных гепатитов среди медицинских работников многопрофильного стационара // Сибирский журнал гастроэнтерологии и гепатологии СО РАМН – 2001. – С. 192-193. (соавт.: Шаловой А.А., Перегонцева С.А.).

12. Оценка связи полиморфизма гена IL4RA (Ile50Val) с вирусными гепатитами // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2005. - №1. – Приложение №24. – Том XV. – С.4. (соавт.: Гончарова И.А., Белобородова Е.В., Белобородова Э.И., Пузырев В.П., Фрейдин М.Б.).

13. Contribution of polymorphisms Ile50Val and A1188C in IL4RA and IL12B genes into predisposition to hepatofibrosis development in patients with viral hepatitis. // Europe Journal of Human Genetics. - 2005. - Suppl.1. - P.315. (with Goncharova I.A., Freidin M.B., Beloborodova E.V., Beloborodova E.I., Puzyrev V.P.).

14. Геномные основы подверженности к инфекционным заболеваниям // Вестник ВОГиС. – 2005. – №3. – С. 212-219. (соавт.: Гончарова И.А., Пузырев В.П., Рудко А.А., Фрейдин М.Б., Напалкова О.В., Колоколова О.В., Ондар Э.А., Белобородова Е.В.)

15. Изучение связи гена IL4RA (Ile50Val) с хроническим вирусным гепатитом // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология (Материалы 5 съезда ЦНИИ гастроэнтерологии, Москва, 3-6 февраля 2005). – 2005. – С.162. (соавт.: Гончарова И.А., Белобородова Е.В., Белобородова Э.И., Пузырев В.П., Фрейдин М.Б.).

16. Цитокиновый обмен при хроническом вирусном гепатите // World Congress of gastroenterology. Monreal, Canada, September 10-14, Abstract, 2005. (соавт.: Наследникова И.О., Белобородова Э.И., Белобородова Е.В.)

Список использованных сокращений

ИГА – индекс гистологической активности

ИЛ – интерлейкин

IL4RA – рецептор интерлейкина-4

МНК – мононуклеарные клетки

NRAMP1 – макрофагальный белок 1, ассоциированный с естественной резистентностью к инфекционным заболеваниям

ПЦР – полимеразная цепная реакция

УЗИ – ультразвуковое исследование

ХВГ – хронический вирусный гепатит

ХЗП – хронические заболевания печени
ЦТ – цитокины
ФНО α – фактор некроза опухолей-альфа
 γ -ИФН – гамма-интерферон
HBV – вирус гепатита В
HCV – вирус гепатита С