

## Роль полиморфизма гена *IL6* –174C/G в развитии хронической HCV-инфекции

Семёнова Н.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Бычков В.А., Чечина О.Е.

## Role of *IL6* –174C/G gene polymorphism in development of chronic HCV infection

Semyonova N.A., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V., Bychkov V.A., Chechina O.Ye.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Семёнова Н.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. и др.

Исследована функциональная значимость полиморфизма гена интерлейкина-6 (*IL6*) в развитии хронической hepatitis C virus (HCV) инфекции. Проведен анализ частот встречаемости полиморфизма –174C/G промотерной области гена *IL6* у здоровых доноров и больных хронической HCV-инфекцией европеоидной популяции Томской области. Среди пациентов с высокой степенью активности воспалительного процесса достоверно преобладали носители генотипа G/G, что говорит о влиянии носительства G-аллеля на усугубление активности воспалительного процесса в печени при HCV-инфекции. Напротив, носительство генотипов C/G и C/C полиморфизма –174C/G гена *IL6* чаще встречалось у пациентов с минимальной и умеренной степенью воспалительного процесса.

**Ключевые слова:** *IL6*, полиморфизм гена, HCV-инфекция.

In the investigation it has been estimated the functional importance of gene interleukin 6 (*IL6*) polymorphism in progressing the chronic hepatitis C virus (HCV) infection. It has been determined the analysis of polymorphism –174 C/G frequency in gene *IL6* promote zone at healthy donors and patients with chronic HCV-infection who are the Caucasian representatives of Tomsk region. The genotype GG carriers definitely dominated at patients with high activity rate of inflammatory process: it shows that G allele carriership have an impact on aggravation of inflammatory process activity in the liver patients with HCV-infections. In contrast to, carriership of C/G and C/C genotypes of polymorphism –174 C/G of gene *IL6* have met more often at patients with minimal and moderate degree of inflammatory process.

**Key words:** *IL6*, gene polymorphism, HCV infection.

УДК 616.36-002.2-02:575.174.015.3

### Введение

Хроническая HCV-инфекция представляет одну из важнейших проблем здравоохранения во всем мире. Заболеваемость и смертность от хронического вирусного гепатита С и его осложнений в Российской Федерации и в мире в целом достигли высокого уровня и имеют тенденцию к повышению [3].

Наряду с решающими успехами международной программы «Геном человека» все большее внимание привлекает и проблема разнообразия генома человека, т.е. генетического полиморфизма. Научное и прикладное значение этого сравнительно нового направления носит преимущественно прикладной характер и касается выяснения генетических основ индивидуальной чувствительности или устойчиво-

сти человека к различным неблагоприятным экзогенным факторам.

В последние годы внимание исследователей сконцентрировано на генетических факторах, которые определяют характер взаимодействия возбудителя и макроорганизма, влияют на хронизацию HCV-инфекции и модифицируют скорость фиброгенеза в печени при хроническом вирусном гепатите С (ХВГС). Изучена ассоциация полиморфизма примерно 20 генов-кандидатов с ХВГС, особенностями течения этого заболевания и его осложнениями [7, 8]. При этом особая значимость придается роли полиморфизма генов цитокинов — важных участников иммунопатогенеза вирусных гепатитов.

Интерлейкин-6 (IL-6) является цитокином, участвующим в реализации иммунного ответа и воспаления

при патологических процессах и состояниях разного генеза. Доказана роль полиморфизма гена *IL6* в патогенезе ряда заболеваний. В частности, наличие полиморфизма G174C в промотерной зоне гена *IL6* является фактором риска развития осложнений при трансплантации тканей и снижения выживаемости после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с заболеваниями системы крови [9]. Существуют данные о более высокой распространенности диабетической ретинопатии у пациентов с сахарным диабетом и наличием генотипа CC по сравнению с пациентами с генотипом GC [17]. В исследованиях A. Manginas и соавт. была найдена статистически значимая встречаемость полиморфного варианта G174C гена *IL6* у пациентов с инфарктом миокарда, что было рассмотрено авторами как фактор генетической предрасположенности развития инфаркта миокарда [15].

Наличие аллельных вариантов в промотерной области гена *IL6* приводит к различным уровням транскрипции данного гена. Так, гиперпродукция IL-6 чаще сочетается с носительством аллеля гена *IL6*-174G, чем аллеля *IL6*-174C, указывая на наличие генетической предрасположенности к повышению продукции IL-6 [2, 4, 12].

На сегодняшний день убедительные данные об ассоциации однонуклеотидных замен с особенностями течения ХВГС получены только для малого числа полиморфизмов и не существует однозначных данных о влиянии полиморфизма в промотерной области гена *IL6* на патогенез хронической HCV-инфекции и развитие осложнений. Особо следует отметить крайнюю немногочисленность отечественных работ по изучению генетического полиморфизма при заболеваниях печени, которые представлены лишь исследованиями по установлению генетических маркеров быстрого развития цирроза печени у пациентов с HCV-инфекцией [1].

Учитывая наличие патогенетической взаимосвязи течения хронического вирусного гепатита С с особенностями функционирования провоспалительного цитокина IL-6, целью настоящего исследования явилась оценка роли полиморфизма промотерной области гена *IL6* в развитии ХВГС и его осложнений у представителей европеоидной популяции.

## Материал и методы

Обследованы 98 пациентов (56 мужчин и 42 женщины) с диагнозом «хронический вирусный гепатит С», находящихся на стационарном лечении и диспансерном учете в отделении гастроэнтерологии Томской областной клинической больницы и клинической больницы № 81 г. Северска; все представители европеоидной популяции в возрасте от 18 до 56 лет (средний  $(33 \pm 4)$  года). Контрольную группу составил 171 здоровый донор (из них 98 мужчин и 73 женщины), сопоставимый по возрасту и расе.

Диагноз устанавливали на основании данных инструментального исследования (сцинтиграфическое и ультразвуковое исследования печени), морфологического исследования биоптата печени, серологического (определяли анти-HCV<sub>core</sub> IgG и антитела к NS3, NS5 HCV методом иммуноферментного анализа) и генетического (полимеразная цепная реакция (ПЦР)) методов.

Для гистологического исследования печени использовали биопсийный фрагмент печеночной паренхимы. Степень активности процесса в печени определялась в соответствии с полуколичественным гистологическим индексом активности (ИГА) по Knodell с оценкой в баллах по шкале: 1—3 балла — минимальная, 4—8 — слабовыраженная, 9—12 — умеренно выраженная, 13—18 — выраженная. Оценка стадии фиброза проводилась согласно системе METAVIR по шкале: 0 — нет фиброза, 1 — перипортальный фиброз, 2 — порто-портальный фиброз, 3 — портоцентральный фиброз, 4 — цирроз печени [11].

Венозную кровь собирали в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА. Геномную ДНК выделяли с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. Для исследования ДНК на наличие полиморфизма –174C/C в промотерной области гена *IL6* использовали методику ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция с последующей обработкой специфическими рестриктазами и определением длин фрагментов рестрикции).

Аmplификацию промотерной области гена *IL6*, содержащего полиморфный сайт C174G, осуществляли методом ПЦР, используя структуру следующих праймеров: 5'-ttg-tca-aga-cat-gcc-aaa-gtc-'3 (прямой) и 5'-tca-gac-atc-tcc-agt-cct-ata-'3 (обратный) («СибЭнзим», г. Новосибирск) в амплификаторе «Терцик МС2» («ДНК-технология», Россия). Реакционная смесь содержала 15—20 нг геномной ДНК; 0,2 ммоль смеси dNTP-mix; 3,5 ммоль хлорида магния и 1 ед.а. Таq-полимеразы в

общем объеме 25 мкл. Реакция проводилась при следующих условиях: денатурация при температуре 95 °С в течение 5 мин, 35 циклов амплификации (30 с при температуре 94 °С, 30 с при 60 °С и 45 с при 65 °С) с последующей 5-минутной элонгацией при температуре 72 °С. Фрагмент амплификации, содержащий полиморфный участок С174G, был размером в 300 п.о. Аликвоты продуктов ПЦР подвергали электрофорезу в 1%-м агарозном геле для подтверждения наличия ожидаемых фрагментов.

Генотипирование гена *IL6* осуществляли с помощью рестриктазы *FaeI* («Сибэнзим», г. Новосибирск). Рестриктию проводили в течение 3 ч при температуре 37 °С. В случае присутствия аллеля С в сайте -174C/G фермент разрезал продукты амплификации на фрагменты длиной 165 и 135 п.о., а в случае наличия аллеля G — фрагменты длиной 54 и 246 п.о. Продукты рестрикции фракционировали в 3%-м агарозном геле посредством электрофореза. В качестве маркера размера фрагментов ДНК использовали плазмиду pUC19, расщепленную рестриктазой *MspI* («Сибэнзим», г. Новосибирск).

Имеющиеся данные типа «случай — контроль» относились к качественным, выборки были независимы. Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди—Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона. Обработку результатов генетического исследова-

ния осуществляли с использованием критерия отношения шансов (ОШ) с расчетом для него 95%-го доверительного интервала.

## Результаты и обсуждение

В результате проведенного анализа полиморфизма -174C/G в промотерной области гена *IL6* выявлено, что частота встречаемости аллеля G у больных HCV-инфекцией составляла 68,4%, у здоровых доноров — 62,6%. Аллель С у больных хроническим вирусным гепатитом С встречался в 31,4%, в группе контроля в 37,4% случаев. Данные различия в исследованных группах не были достоверны ( $p > 0,05$ ) (табл. 1).

При оценке значения полиморфизма -174C/G в промотерной области гена *IL6* в развитии фиброза также были получены недостоверные различия частот встречаемости вариантных аллелей и генотипов гена у больных HCV-инфекцией с различной степенью фиброза печени ( $p > 0,05$ ). Так, частоты встречаемости аллеля G у пациентов без фиброза печени, слабовыраженным перипортальным фиброзом и с умеренным фиброзом с порто-портальными септами были равны 66,1; 70,4 и 68,8% соответственно. Аллель С в исследованных группах пациентов с ХВГС встречался со следующей частотой: у пациентов без фиброза печени в 33,9% случаев, у больных со слабовыраженным перипортальным фиброзом — в 29,6% и с умеренным фиброзом с порто-портальными септами — в 31,2% (табл. 2).

Таблица 1

Распределение частот аллелей и генотипов гена *IL6* среди здоровых доноров и больных хронической HCV-инфекцией, % (абс.)

Генотипы и аллели	Контроль	Больные ХГС	<i>p</i>	OR
Генотип GG	39,8 (68)	48,0 (47)	>0,05	1,4 (0,85—2,30)
Генотип GC	45,6 (78)	40,8 (40)		0,82 (0,50—1,36)
Генотип CC	14,6 (25)	11,2 (11)		0,74 (0,35—1,57)
Аллель G	62,6 (107)	68,4 (67)	>0,05	1,29 (0,89—1,88)
Аллель С	37,4 (64)	31,4 (31)		0,77 (0,53—1,12)

Примечание. *p* — достоверность различий показателей по сравнению с их значениями у здоровых доноров.

Таблица 2

Частота полиморфных генотипов и аллелей гена *IL6* в зависимости от степени фиброза печени у больных хронической HCV-инфекцией, % (абс.)

Генотипы и аллели	Степень фиброза			$\chi^2$	<i>p</i>
	Нет фиброза	Слабовыраженный перипортальный фиброз	Умеренный фиброз с порто-портальными септами		
G/G	41,9 (13)	51,9 (14)	50,0 (20)	1,117	0,9
C/G	48,4 (15)	37,0 (10)	37,5 (15)		
C/C	9,7 (3)	11,1 (3)	12,5 (5)		
G	66,1	70,4	68,8		

С	33,9	29,6	31,2
---	------	------	------

Примечание. Здесь и в табл. 3: *p* — уровень статистической значимости различий параметров между подгруппами больных HCV-инфекцией с различной стадией фиброза.

Таблица 3

Распределение генотипов и аллелей гена *IL6* в зависимости от активности воспаления печени у больных хронической HCV-инфекцией, % (абс.)

Регистрируемый генотип	Гистологический индекс активности воспаления			$\chi^2$	<i>p</i>
	1—3	4—8	9—18		
G/G	37,7 (20)	40,8 (11)	88,8*** (16)	15,464	0,004
G/C	51,0 (27)	44,4 (12)	5,6*** (1)		
C/C	11,3 (6)	14,8 (4)	5,6*** (1)		
G	63,2	63,0	91,6***		
C	36,8	37,0	8,4***		

\* Достоверность различий по сравнению с пациентами с активностью воспаления 1—3 балла (*p* < 0,05).

\*\* Достоверность различий по сравнению с пациентами с активностью воспаления 4—8 балла (*p* < 0,05).

При изучении распределения аллелей и генотипов полиморфизма –174C/G гена *IL6* в зависимости от степени активности воспаления получены статистически значимые различия у пациентов с выраженной, средней и минимальной степенью воспалительного процесса. У пациентов с минимальной и средней степенями активности воспаления частота встречаемости аллеля С была достоверно выше (*p* < 0,05) в 4 раза, а частота встречаемости аллеля G была достоверно ниже (*p* < 0,05) в 1,5 раза по сравнению с аналогичными показателями у больных с выраженной степенью активности воспаления печени (табл. 3).

IL-6 является фактором дифференцировки В-клеток, способствуя созреванию В-лимфоцитов в антителопродуцирующие клетки. Он индуцирует синтез белков острой фазы, в связи с чем (так же как и интерлейкин-1 (IL-1) и фактор некроза опухоли альфа (TNF-α)) может быть отнесен к цитокинам воспаления [5].

Повышение уровня IL-6 наблюдается при многих патологических состояниях, в том числе при HCV-инфекции. В исследованиях С. Миловановой и соавт. было выявлено повышение уровня в сыворотке крови у больных хронической HCV-инфекцией [6]. Гиперпродукция IL-6 с повышением его уровня в сыворотке крови достоверно чаще сочеталась с носительством аллеля гена *IL6* –174G, чем аллеля *IL6* –174C (*p* < 0,05). Кроме того, была обнаружена ассоциация наличия криоглобулинемии и связанных с ней системных проявлений, включая прогрессирование фиброза и поражение почек, среди больных с повышенным уровнем сывороточного IL-6 по сравнению с больными без его повышения [6]. В исследованиях А.

Antonelli и соавт. содержания IL-6 в сыворотке крови у пациентов с хронической HCV-инфекцией также был зарегистрирован повышенный уровень данного цитокина по сравнению с группой здоровых доноров.

IL-6 участвует в регуляции процессов пролиферации эпителиальных клеток желчных протоков, клеток печени, образования гранулем и развития фиброза печени. Повышение продукции IL-6 отмечено при обострениях язвенной болезни, панкреатита, глютенной энтеропатии, болезни Крона, неспецифического язвенного колита, вирусного гепатита, первичного билиарного цирроза. Наряду с другими провоспалительными цитокинами (TNF-α и IL-1) IL-6 секретируются клетками Купфера при действии различных стимулов, индуцирующих развитие гепатитов. Этот эффект сопряжен с синтезом белков острой фазы и повышением адгезии нейтрофилов в синусоидах. Считают, что TNF-α и IL-1 определяют механизмы некроза и нарушения транспортных систем, а IL-6 стимулирует синтез белков острой фазы [14, 18].

Доминирование провоспалительных цитокинов ассоциировано с быстрым прогрессированием фиброза печени и лучшим ответом на противовирусную терапию, тогда как преобладание противовоспалительных цитокинов — с медленным развитием фиброза и более низкой эффективностью противовирусной терапии [13, 16].

## Заключение

Полученные результаты являются подтверждением роли IL-6 в патогенезе поражения печени при хро-

нической HCV-инфекции. Установлена связь наличия аллеля G полиморфного варианта –174C/G промотерного региона гена *IL6* с активностью воспалительного процесса в печени при HCV-инфекции.

*Исследования реализованы в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК № 02.740.11.03.11).*

#### Литература

1. Абдуллаев С.М., Целищева Ю.И., Самоходская Л.М. и др. Генетические факторы агрессивного течения хронического гепатита С // Вестн. РАМН. 2007. № 1. С. 8—13.
2. Виноградова С.В. Роль полиморфизма генов цитокинов в развитии заболеваний печени // Сучасна гастроентерология. 2004. Т. 5, № 19. С. 15—20.
3. Ивашкин В.Т., Буверов А.О., Грязин А.Е. Механизмы устойчивости вируса гепатита С к противовирусным препаратам // Мол. медицина. 2004. № 2. С. 18—23.
4. Коротчаева Ю.В., Самоходская Л.М., Сперанский А.И. и др. Прогностическое значение определения ИЛ-6 в сыворотке крови и цитохрома P450 в ткани печени у больных хроническим вирусным гепатитом С // 2008. Т. 18, № 2. С. 42—47.
5. Лейдерман И.Н., Руднов В.А., Клейн А.В., Николаев Э.К. Синдром гиперметаболизма — универсальное звено патогенеза критических состояний // Вестн. интенсив. терапии. 1997. № 3. С. 17—23.
6. Милованова С., Тэгай С., Коротчаева Ю., Козловская Л. Поражение почек, ассоциированное с инфицированием вирусами гепатита В и С // Врач. 2007. № 6. С. 70—74.
7. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Белоконь В.В. и др. Цитокины и противовирусный иммунитет // Успехи физиолог. наук. 2006. Т. 37, № 4. С. 1—11.
8. Фрейдин М.Б., Гончарова И.А., Рудко А.А. и др. Геном-

- ные основы подверженности инфекционным заболеваниям // Молекуляр. медицина. 2006. № 3. С. 39—46.
9. Ambruzova Z., Mrazek F., Raida L. et al. Association of *IL-6* gene polymorphism with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in Czech patients // Intern. J. of Immunogenetics. 2008. № 35. P. 401—403.
  10. Antonelli A., Ferri C., Ferrari S. et al. High interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha serum levels in hepatitis C infection associated or not with mixed cryoglobulinemia // Clin. Rheumatol. 2009. № 28. P. 1179—1185.
  11. Bedossa P., Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group // Hepatology. 1996. V. 24. P. 289—293.
  12. Ben-Ari Z., Mor E., Papo O. et al. Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B virus // Am. J. Gastroenterol. 2003. V. 98, № 1. P. 144—150.
  13. Cecere A., Marotta F., Vangieri B. et al. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection is related to altered cellular immune response and to different cytokine profile // Panminerva Med. 2004. № 46. P. 171—187.
  14. Decker K. Mechanisms and mediators in hepatic necrosis // Gastroenterol. Jpn. 1993. № 28. P. 20—25.
  15. Manginas A., Tsiavou A., Chaidaroglou A. et al. Inflammatory cytokine gene variants in coronary artery disease patients in Greece // Coronary Artery Disease. 2008. V. 19, № 8. P. 575—582.
  16. Neuman M., Sha K., Esguerra R. et al. Inflammation and repair in viral hepatitis C // Digestive Diseases and Sciences. 2008. № 53. P. 1468—1487.
  17. Rudofsky G., Schlotterer A., Reismann P. et al. The –174G/C *IL-6* gene promoter polymorphism and diabetic microvascular complications // Horm. Metab. Res. 2009. V. 41, № 4. P. 308—313.
  18. Thornton A., Ham J., Kunkel S. Kupffer cell-derived cytokines induce the synthesis of a leukocyte chemotactic peptide, interleukin-8, in human hepatoma and primary hepatocyte cultures // Hepatology. 1991. № 14. P. 1112—1122.

Поступила в редакцию 19.02.2010 г.

Утверждена к печати 13.05.2010 г.

#### Сведения об авторах

**Н.А. Семёнова** — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**Н.В. Рязанцева** — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

**В.В. Новицкий** — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**В.А. Бычков** — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**О.Е. Чечина** — канд. мед. наук, руководитель научно-образовательного центра молекулярной медицины СибГМУ (г. Томск).

#### Для корреспонденции

**Семёнова Надежда Андреевна**, тел. 8-906-947-63-88; e-mail: nadfix@mail.ru.