УДК 616.36-002.2-085.37

Сахарова Д.А., Марковский А.В., Витковский Ю.А.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ С-159Т ГЕНА РЕЦЕПТОРА CD14 У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита

Резюме. *Целью исследования было изучение генетического полиморфизма CD14 (C-159T) у больных хроническим вирусным гепатитом С в Забайкальском крае. Установлено, что среди здоровых лиц частота встречаемости аллели С гена CD14 (C-159T) составляла 0,705, а аллели Т – 0,295; у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С аллель С встречалась с частотой 0,520, аллель Т – 0,480. Выявлено увеличение распространенности мутантной гомозиготы (Т/Т) с ростом скорости прогрессирования фиброза печени у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С. Было определено, что наличие генотипа Т/Т мутации CD14 (C-159T) у пациентов с ХВГС взаимосвязано со скоростью прогрессирования фиброза печени: при быстром прогрессировании генотип Т/Т встречается в 2,1 раза чаще, чем при медленном прогрессировании.*

Ключевые слова: *генетический полиморфизм, хронический вирусный гепатит С, мутация гена рецептора CD14 (C-159T).*

Sakharova D.A., Markovsky A.V., Witkowsky Yu.A.

GENETIC POLYMORPHISM C-159T CD14 RECEPTOR GENE IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS C

Summary. *Aim was to study the genetic polymorphysms of CD14 (C-159T) in patients with chronic viral hepatitis C in Transbaikalian region. It was established that frequencies 0,705 for allele C and 0,295 for allele T in healthy, but 0,520 for allele C and 0,480 for allele T – in patients with chronic hepatitis C were observed. The higher prevalence of the mutant homozygote (T/T) with the growth rate of progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C were revealed. It was found that the presence of the genotype T/T mutations CD14 (C-159T) in patients with infection correlated with the rate of progression of hepatic fibrosis: with the rapid progression genotype T/T occurs in 2,1 times more often than with slow progression.*

Keywords: *genetic polymorphysm, chronic viral hepatitis C, the mutation of the receptor CD14 (C-159T).*

Введение. Одной из актуальных проблем современной медицины является пандемия вирусного гепатита С: по данным Всемирной организации здравоохранения, этим вирусом инфицированы в мире около 3 % населения. Аналогичные результаты наблюдаются и на территории Российской Федерации, где доля пораженных им людей достигает почти 3 % [2]. При этом для хронического вирусного гепатита С (ХВГС) характерно прогрессирующее течение, которое через несколько десятков лет может завершиться циррозом печени (до 30 %) и первичной гепатоклеточной карциномой (от 5 до 15 %) [7; 15].

Следует отметить, что естественное течение данной инфекции подвержено значительным межиндивидуальным вариациям: у части больных имеет место медленный темп прогрессирования фиброза, у других – формирование цирроза печени происходит быстро (уже через 10-15 лет после инфицирования) [13]. Данный факт предположительно обусловлен «индивидуальным ответом» генотипа человека на воздействие инфекционного агента, определяя, тем самым, особенности течения и исходов заболеваний [4]. В целом, патогенез гепатита С остаётся во многом неясным, до сих пор не существует однозначного ответа на вопрос, как присутствие вируса в организме влияет на развитие патологического процесса в гепатоцеллюлярной ткани.

Поэтому в последние годы особое внимание уделяется изучению генетических факторов при ХВГС, способных модифицировать скорость фиброгенеза, на которую решающее значение, по мнению авторов, оказывает степень воспалительной реакции на этиологический агент [3; 5; 20], в том числе опосредованная высокой концентрацией провоспалительных цитокинов [1]. Одним из активно изучаемых полиморфизмов генов является полиморфизм рецептора CD14 C-159T, который был описан M. Baldini и соавт. в 1999 году [6]. Его оценивали при многих заболеваниях, имеющих воспалительный компонент, в том числе и при болезнях печени.

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

В одном из исследований генотипирование пациентов с ХВГС не выявило существенных различий по этому полиморфизму со здоровыми, хотя было отмечено, что у ТТ-гомозигот по CD14 C-159T чаще встречаются лимфоидные агрегаты в печени, но которые не коррелируют с выраженностью фиброза [8]. В другой работе установлено, что ТТ-гомозиготы встречались чаще при ХВГС, а ТТ-генотип наоборот способствовал развитию фиброза [11].

В этой связи обсуждается возможность влияния продуктов жизнедеятельности бактерий, в первую очередь, эндотоксинов (липополисахариды) в усилении воспалительных реакций в печени [14], их роль описана и у больных хроническим вирусным гепатитом С [9; 11]. Происхождение эндотоксемии может быть связано с нарушениями фагоцитарной функции и снижением Т-клеточного иммунитета при ХВГС [18], а также в результате повышенного выхода эндотоксинов из просвета кишечника ввиду измененной кишечной проницаемости [17]. Циркулирующие эндотоксины обладают высоким сродством к CD14 рецептору [10], при этом растворимая фракция CD14 (sCD14) играет ключевую роль в качестве промежуточного продукта в нейтрализации липополисахаридов в физиологических условиях.

Полиморфизм CD14 может влиять на механизмы воспаления в печени в двух противоположных направлениях путем регуляции экспрессии либо мебраносвязанной формы, либо растворимой формы рецептора CD14. Так, высокий уровень экспрессии мембраносвязанного CD14 (mCD14 на зрелых моноцитах, макрофагах и гепатоцитах [21]) предрасполагает печеночные клетки к усиленному цитокиновому ответу на эндотоксины и вызывает усиление воспалительных реакций [16; 191]. С другой стороны, полиморфизм CD14 играет значительную роль в регулировании уровня растворимого sCD14, увеличение которого может уменьшить воспалительную реакцию моноцитов на эндотоксины, что наблюдается при генотипе ТТ [12]. В тоже время у больных с ХВГС степень печеночного фиброза или цирроза печени была выше при высоком уровне sCD14 [18].

Таким образом, данные о влиянии полиморфизма CD14 на развитие и прогрессирование хронического вирусного гепатита С немногочисленны, а иногда противоречивы. Эти обстоятельства требуют продолжения исследований в этом направлении.

Цель исследования: изучение частоты генетического полиморфизма CD14 (C-159T) у больных хроническим вирусным гепатитом С в Забайкальском регионе.

Материалы и методы. Было проведено обследование 74 человек, проходивших стационарное лечение в ГУЗ «Краевая клиническая инфекционная больница» г. Читы за период с 2012 по 2014 гг. по поводу хронического вирусного гепатита С (ХВГС). Возраст пациентов составил от 16 до 58 лет, средний возраст был равен 36,9 ± 1,1 лет. Мужчин было 53, женщин – 21.

Диагноз хронического вирусного гепатита С устанавливали на основании данных инструментального исследования (сцинтиграфическое, ультразвуковое исследование печени, эластометрия печени), серологического и генетического (обнаружения РНК HCV методом полимеразной цепной реакции – ПЦР) методов.

Длительность заболевания до 5 лет выявлена у 63,5 %, свыше 5 лет – у 36,5 %. Оценка стадии фиброза проводилась согласно системе METAVIR: F 0-F 1 была диагностирована у 41,9 % (31); F 2 – у 41,9 % (31); F 3-F 4 – у 16,2 % (12). Степень активности заболевания учитывали по выраженности отклонений показателей цитолиза от нормы. Кроме того, среди пациентов были выделены лица с медленным (20; 27,0 %), средним (47; 63,5 %) и быстрым (7; 9,5 %) прогрессированием фиброза печени, исходя из анализа длительности заболевания и соответствующей ей стадии фиброза. Быстрым прогрессированием считали развитие 3-4 стадии фиброза по METAVIR за 5-7 лет болезни, медленным – наличие 0-1 стадии фиброза после 10 лет заболевания.

Критерии исключения из исследования – наличие тяжёлой соматической патологии, наличие токсического и аутоиммунного гепатита, коинфекции с другими вирусными гепатитами и ВИЧ.

Группу контроля составили 66 здоровых человек, сопоставимых с группой исследованных по полу и возрасту.

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

По национальной принадлежности все объекты исследования были русскими, родившимися и проживающими на территории Забайкальского края. В работе соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации и Правилами клинической практики в Российской Федерации. Исследование одобрено в локальном этическом комитете ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России 11.03.2012 (протокол № 35). От всех обследованных получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Для анализа полиморфизма гена CD14 (C159T) был использован метод аллель-специфической полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией. Исследования проводились в НИИ молекулярной медицины Читинской государственной медицинской академии. Выделение ДНК осуществлялось из цельной крови пациентов с ХВГС и здоровых добровольцев при помощи набора «ДНК-экспресс кровь» (ООО НПФ «Литех», РФ) согласно инструкции производителя. Постановка аллель-специфической ПЦР осуществлялась с помощью наборов «Мутация антигена дифференцировки моноцитов С-159Т» (ООО НПФ «Литех», РФ) согласно инструкции производителя.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием пакета анализа Microsoft Excel и Statistica 6.0. Она включала описание выборки, нахождение средней арифметической, среднеквадратического отклонения и ошибки средней арифметической, определялись частоты встречаемости признаков, группировка данных. Для сравнения распределений частот генотипов и аллелей использовался критерий хи-квадрат (χ^2), статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для оценки соответствия распределений наблюдаемых генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга использовался on-line-калькулятор (http://gen-exp.ru/calculator_or.php).

Результаты исследования. В ходе исследования обнаружены все искомые мутации в гомо- и гетерозиготном состоянии, которые соответствовали равновесию Харди-Вайнберга, что дает нам возможность сравнивать носительство этих мутаций в исследуемых группах.

Распространенность генотипов мутации CD14 (C-159T) в контрольной группе была следующей: нормальная гомозигота (C/C) – 48,5 %, гетерозигота (C/T) – 43,9 %, мутантная гомозигота (T/T) – 7,6 %. В исследуемой группе распространенность генотипов мутации CD14 (C-159T) составила: нормальная гомозигота (C/C) – 32,4 %, гетерозигота (C/T) – 39,2 %, мутантная гомозигота (T/T) – 28,4 %, статистически значимо отличаясь от контрольной группы ($\chi^2 = 10,57$, $p = 0,005$).

Установлено, что среди здоровых лиц частота встречаемости аллели С гена CD14 (C-159T) составляла 0,705, а аллели Т – 0,295; у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С аллель С встречалась с частотой 0,520, аллель Т – 0,480 ($\chi^2 = 9,93$; $p = 0,002$) (табл. 1).

Таблица 1

Частота генотипов и аллелей мутации CD14 (C-159T) в исследуемой и контрольной группах

Генотипы и аллели	Пациенты с ХВГС n = 74	Контроль n = 66	χ^2	p	OR (95% CI)
Генотип C/C	0,324	0,485	10,57 (df=2)	0,005	0,51 (0,26-1,01)
Генотип C/T	0,392	0,439			0,82 (0,42-1,61)
Генотип T/T	0,284	0,076			4,83 (1,7-13,71)
Аллель C	0,520	0,705	9,93 (df=1)	0,002	0,45 (0,28-0,75)
Аллель T	0,480	0,295			2,20 (1,34-3,60)

Примечание: n – количество обследованных, χ^2 – хи-квадрат, OR – odds ratio (отношение шансов), 95% CI – 95 % доверительный интервал OR, p – уровень значимости различий между группами.

Распространенность генотипов и аллелей мутации CD14 (C-159T) у пациентов с ХВГС в зависимости от стадии фиброза печени представлена в таблице 2. Как видно, стадия фиброза не сопряжена с частотой встречаемости T/T-гомозигот.

Таблица 2

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

Распространенность генотипов и аллелей мутации CD14 (C-159T) в исследуемой группе в зависимости от стадии фиброза печени

Генотипы и аллели	Стадии фиброза печени						χ^2; p
	0-1		2		3-4		
	абс.	доля	абс.	доля	абс.	доля	
Генотип C/C	7	0,226	13	0,419	4	0,333	1 – χ^2=5,02; p=0,08
Генотип C/T	14	0,452	10	0,323	5	0,417	2 – χ^2=0,57; p=0,75
Генотип T/T	10	0,322	8	0,258	3	0,250	3 – χ^2=0,38; p=0,83
Аллель C	14	0,452	18	0,581	7	0,542	1 – χ^2=2,07; p=0,15
Аллель T	17	0,548	13	0,419	5	0,458	2 – χ^2=0,56; p=0,45
							3 – χ^2=0,11; p=0,74

Примечание: n – количество обследованных, χ^2 – хи-квадрат, p – уровень значимости различий между группами, 1 – различия между 0-1 и 2 стадиями, 2 – различия между 0-1 и 3-4 стадиями, 3 – различия между 2 и 3-4 стадиями.

В тоже время установлено увеличение распространенности мутантной гомозиготы (T/T) с ростом скорости прогрессирования фиброза печени у пациентов с хроническим вирусным гепатитом C. Так, среди медленных прогрессоров частота генотипа T/T составила 20,0 %; среди средних прогрессоров – 29,8 %; среди быстрых прогрессоров – 42,8 % ($p < 0,001$). При этом встречаемость генотипа C/T уменьшается от группы медленных к группе быстрых прогрессоров (табл. 3).

Таблица 3

Распространенность генотипов и аллелей мутации CD14 (C-159T) в исследуемой группе в зависимости от скорости прогрессирования фиброза печени

Генотипы и аллели	Прогрессирование фиброза печени						χ^2; p
	медленное n=20		среднее n=47		быстрое n=7		
	абс.	доля	абс.	доля	абс.	доля	
Генотип C/C	6	0,300	16	0,340	2	0,286	1 – χ^2=6,98; p=0,03
Генотип C/T	10	0,500	17	0,362	2	0,286	2 – χ^2=6,53; p=0,04
Генотип T/T	4	0,200	14	0,298	3	0,428	3 – χ^2=6,67; p=0,04
Аллель C	11	0,550	24	0,521	3	0,429	1 – χ^2=4,59; p=0,03
Аллель T	9	0,450	23	0,479	4	0,571	2 – χ^2=2,76; p=0,10
							3 – χ^2=7,04; p=0,008

Примечание: n – количество обследованных, χ^2 – хи-квадрат, p – уровень значимости различий между группами, 1 – различия между группами «медленное» и «среднее» прогрессирование, 2 – различия между группами «медленное» и «быстрое» прогрессирование, 3 – различия между группами «среднее» и «быстрое» прогрессирование.

Частота встречаемости аллели C гена CD14 (C-159T) при медленном прогрессировании фиброза печени составляла 0,550, а аллели T – 0,450; при быстром прогрессировании фиброза – 0,429 и 0,571 соответственно (табл. 3).

Согласно полученным результатам, можно предположить, что мутантные гомозиготы (T/T) являются более склонными к повышенной воспалительной реакции. Это способствует более быстрому прогрессированию фиброза в печеночной ткани при ХВГС. Данный факт можно объяснить либо высоким уровнем экспрессии мембраносвязанного mCD14 [16; 19], либо высоким уровнем растворимого sCD14 [18], что предрасполагает печеночные клетки к усиленному ответу на эндотоксины.

Заключение.

Таким образом, в популяции населения Забайкалья обнаружены отличия в частоте генотипов и аллелей мутации CD14 (C-159T) среди здоровых и больных хроническим вирусным гепатитом C: при ХВГС генотип T/T встречается в 3,7 раза чаще, а генотип C/C – в 1,5 раза реже, чем в контрольной группе. Выявлено, что наличие генотипа T/T мутации CD14 (C-159T) у пациентов с ХВГС взаимосвязано со скоростью прогрессирования фиброза пече-

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

ни: при быстром прогрессировании генотип T/T встречается в 2,1 раза чаще, чем при медленном прогрессировании. Это косвенно свидетельствует о высокой активности хронического воспаления при генотипе T/T.

Литература:

1. Емельянова А.Н. Полиморфизм генов цитокинов ИЛ2 (T330G), ИЛ10 (C819T) и ИЛ10 (G1082A) при хроническом вирусном гепатите С / А.Н. Емельянова, Ю.А. Витковский // Молекулярная медицина. – 2013. – № 3. – С. 41-44.
2. Колотвин А.В. Прогностическая значимость генетического полиморфизма патогена и хозяина для оценки эффективности терапии и развития фиброза печени при хроническом гепатите С : диссертация … канд. мед. наук : 03.01.03/ А.В. Колотвин. – Москва, 2014. – 173 с.
3. Семенова Н.А. Роль полиморфизма генов APOE, HFE, SOD2 и IL6 в патогенезе хронического вирусного гепатита С : диссертация … канд. мед. наук / Н.А. Семенова. – Томск, 2010. – 118 с.
4. Хеба Г.А. Структурно-функциональная характеристика генов-модификаторов иммунного ответа при заболеваниях печени различной этиологии : автореферат дисс. … канд. биол. наук / Г.А. Хеба. – Томск, 2011. – 23 с.
5. A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease / M. Muhlbauer [et al.] // Gastroenterology. – 2003. – № 125. – P. 1085-1093.
6. A Polymorphism in the 5’ Flanking Region of the CD14 Gene Is Associated with Circulating Soluble CD14 Levels and with Total Serum Immunoglobulin E / M. Baldini [et al.]// American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. – 1999. – V. 20, № 5. – P. 976-983.
7. Alter M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection // World Journal of Gastroenterology. – 2007. – V. 13, № 17. – P. 2436-2441.
8. Askar E. Endotoxin receptor CD14 gene variants and histological features in chronic HCV infection / E. Askar, G. Ramadori, S. Mihm // World Journal of Gastroenterology. – 2009. – № 15(31). – P. 3884-3890.
9. Biological and clinical significance of endotoxemia in the course of hepatitis C virus infection / L. Caradonna [et al.] // Current Pharmaceutical Design. – 2002. – № 8. – P. 995-1005.
10. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein / S.D. Wright [et al.] // Science. – 1990. – № 249. – P. 1431-1433.
11. Different effects of a CD14 gene polymorphism on disease outcome in patients with alcoholic liver disease and chronic hepatitis C infection / C. Meiler [et al.] // World Journal of Gastroenterology. – 2005. – V. 11, № 38. – P. 6031-6037.
12. Effect of the CD14 promoter polymorphism on liver function tests and its association with alcohol and obesity / A.P. Poullis [et al.] // European Journal of Gastroenterology and Hepatology. – 2003. – V. 15. – P. 1317-1322.
13. Friedman S.L. Liver fibrosis from bench to bedside // Journal of Hepatology. – 2003. – V. 38, № 1. – P. 38-53.
14. Fukui H. Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay / H. Fukui, B. Brauner, J.C. Bode // Journal of Hepatology. – 1991. – V. 12. – P. 162-169.
15. Natural history of initially mild chronic hepatitis C / A. Alberti [et al.] // Digestive and Liver Disease. – 2004. – V. 36, № 10. – P. 646-654.
16. Reduced early alcohol-induced liver injury in CD14-deficient mice / M. Yin [et al.] // Journal of Immunology. – 2001. – № 166. – P. 4737-4742.
17. Schwabe R.F. Toll-like receptor signaling in the liver / R.F. Schwabe, E. Seki, D.A. Brenner // Gastroenterology. – 2006. – № 130. – P. 1886-1900.
18. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings / Jirillo E. [et al.] // Journal of Endotoxin Research. – 2002. – № 8. – P. 319-327.

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)

19. Toll-Like receptor 4 mediateset al. Toll-Like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells / Y.H. Paik [et al.] // Hepatology. – 2003. – № 37. – P. 1043-1055.
20. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection / L.J. Yee [et al.] // Genes and Immunity. – 2000. – V. 1. – P. 386-390.
21. Upregulation of mouse CD14 expression in Kupffer cells by lipopolysaccharide / K. Matsuura [et al.] // Journal of Experimental Medicine. – 1994. – № 179. – P. 1671-1676.

Print to PDF without this message by purchasing novaPDF (http://www.novapdf.com/)