

ференциальная диагностика довольно трудна. При проведении аутопсии прицельному гистологическому исследованию подвергаются органы-мишени: легкие, печень, лимфоидная ткань, с последующим иммуногистохимическим исследованием, что позволяет достоверно установить морфологический вариант течения лимфогранулематоза. В этой связи необходимость проведения гистологического исследования биоптатов лимфатических узлов приобретает особую актуальность. Имея различные клинические «маски», а порой и их сочетания, связанное с метастатическим поражением различных органов, болезнь может не распознаваться в течение длительного времени, что требует пристального внимания к данной па-

тологии практикующих врачей различных специальностей.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Райт, Д. Морфологическая диагностика патологии лимфатических узлов / Д. Райт, Б. Эддис. — М.: Медицинская литература, 2008. — 176 с.
2. Краевский, Н. А. Диагностика опухолей человека / Н. А. Краевский, А. В. Смольяников, Д. С. Саркисов; под ред. Н. А. Краевского. — М.: Медицина, 1993. — Т. 2. — 688 с.
3. Rosai, J. Surgical pathology / J. Rosai, L. Ackerman. — London, 2011. — 2746 p.
4. Koss, Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases / Koss. — London: Lippincott Williams and Wilkins, 2005. — Vol. 2. — 1856 p.
5. Головин, Д. И. Атлас опухолей человека / Д. И. Головин. — Л.: Медицина, 1975. — 319 с.
6. Головин, Д. И. Ошибки и трудности гистологической диагностики опухолей / Д. И. Головин. — М.: Медицина, 1982. — 304 с.

Поступила 04.04.2017

УДК 616.36-004+616.149-008.341.1]:575.174.015.3

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ IL-4, TNF- $\alpha$ У ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ И ПОРТАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

А. Г. Скуратов, А. Н. Лызилов, Е. В. Воронаев, О. В. Осипкина

Гомельский государственный медицинский университет

**Цель:** оценить ассоциацию полиморфизма маркеров генов интерлейкина-4 (IL-4) и фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ) с тяжестью патологического процесса у пациентов с циррозом печени.

**Материалы и методы.** Материал для исследований — ДНК, выделенная из лейкоцитов крови пациентов. Для выявления данных SNP выбран метод ПЦР с последующим рестрикционным анализом, электрофоретической детекцией методом горизонтального гель-электрофореза и амплификацией с визуализацией полученных результатов.

**Результаты.** Проведенный молекулярно-генетический анализ полиморфизма генов IL-4 и TNF- $\alpha$  позволил предположить о связи частоты полиморфных генотипов и аллелей исследуемых генов с тяжестью цирроза печени и портальной гипертензии, что может быть использовано для диагностики и прогнозирования течения заболевания.

**Ключевые слова:** цирроз печени, молекулярно-генетический анализ, IL-4, TNF- $\alpha$ .

### THE MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF IL-4, TNF- $\alpha$ GENES IN PATIENTS WITH LIVER CIRROSIS AND PORTAL HYPERTENSION

A. G. Skuratov, A. N. Lyzikov, E. V. Voropayev, O. V. Osipkina

Gomel State Medical University

**Objective:** to assess the association of polymorphism of the markers of interleukin-4 (IL-4) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in patients with liver cirrhosis with severe pathological process.

**Material and methods.** The research material was DNA isolated from blood leukocytes of the patients. To identify SNP data, the PCR method was chosen with subsequent restriction analysis and electrophoretic detection by horizontal gel electrophoresis and amplification with visualization of the obtained results.

**Results.** The performed molecular and genetic analysis of IL-4 and TNF- $\alpha$  gene polymorphisms made it possible to assume a relation between the frequency of polymorphic genotypes and alleles of the investigated genes and the severity of liver cirrhosis and portal hypertension, which can be used to diagnose and predict the severe course of the disease.

**Key words:** liver cirrhosis, molecular and genetic analysis, IL-4, TNF- $\alpha$ .

#### Введение

Проблемы диагностики и лечения цирроза печени (ЦП) и портальной гипертензии продолжают оставаться актуальными в медико-социальном плане во всем мире в связи с широкой распространенностью заболеваний, не-

достаточной эффективностью современных методов лечения, отсутствием специфической профилактики и высокой частотой неблагоприятных исходов [2, 3].

Актуальным направлением медицинской науки является поиск маркеров прогрессиру-

вания хронического гепатита (ХГ) с дальнейшим формированием ЦП, портальной гипертензии и гепатоцеллюлярной карциномы [6, 7]. Четкого представления о причинах различной скорости формирования фиброза печени у пациентов ХГ в настоящее время не имеется. На формирование этого процесса, вероятно, оказывают влияние не только этиологические факторы (алкоголь, вирусы), но и особенности генотипа пациента [4, 1]. Однако данные, полученные при исследовании генетических детерминант прогрессирования ХГ, зачастую противоречивы и во многом зависят от этнических особенностей пациентов. Как известно, фиброз печени развивается в результате чрезмерного накопления внеклеточных матриксных протеинов, а наиболее активными продуцентами коллагена являются активированные звездчатые клетки, портальные фибробласты и миофибробласты из костного мозга. При этом цитокины участвуют не только в формировании иммунного ответа, но и в модуляции активности ферментов, участвующих в процессе преобразования коллагена в печени [1, 5].

Активность цитокиновой системы определяется многими факторами, в том числе, генетическими. А полиморфизм одиночных нуклеотидов в генах различных цитокинов и их рецепторов является молекулярной основой наследственных факторов. Локализация его в регуляторной части гена оказывает влияние на уровень его экспрессии, что приводит к изменению количества продуцируемого белка. Актуальным является не только исследование полиморфизма различных генов цитокинов у пациентов, но и анализ межгенных взаимодействий и их влияние на прогрессирование цирроза печени [1, 10].

Ген IL-4 принимает участие в формировании иммунного ответа, во взаимодействии клеточных и гуморальных факторов иммунных и воспалительных реакций (оказывает противовоспалительное действие), тормозит экспрессию тканевого фактора, вызывая гипокоагуляцию и усиление секреции активатора плазминогена, и подавляет действие IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF $\alpha$  на эндотелиальные клетки и макрофаги. IL-4 также усиливает выработку IgE, что может провоцировать аллергические реакции и воспаление. В то же время IL-4 повышает активность макрофагов, способствует миграции нейтрофилов в очаг воспаления и усиливает выработку колониестимулирующих факторов.

Экспрессия цитокинов регулируется в промоторном регионе гена на транскрипционном уровне. Был выявлен функциональный полиморфизм промоторного региона гена IL-4 в позиции -59 °C→T и показана ассоциация высокой продукции белка с T-аллельным вариантом гена. Также показана связь полимор-

физма с развитием некоторых заболеваний (бронхиальная астма, муковисцидоз, инфаркт миокарда, эндометриоз, болезнь Крона, рак молочной железы) [8]. При наличии подобного гена пациенты обладают повышенной склонностью к активации иммунной системы при хирургических вмешательствах, инфекциях, механическом воздействии на ткань, имеется предрасположенность к невынашиванию беременности, чаще развиваются гнойно-септические осложнения. При -590T полиморфизме повышен уровень продукции IL-4, что, в частности, приводит к угнетению клеточного иммунитета и повышению уровня IgE. Показано, что полиморфизм (-59 °C / T; rs2243250 C > T) в гене IL-4 может играть важную роль в развитии различных заболеваний печени, однако данные противоречивы [5, 10].

TNF- $\alpha$  является многофункциональным цитокином с выраженной плейотропностью, стимулирует Th-1 клеточный иммунный ответ, фагоцитарную и цитотоксическую активность клеток, регулирует процессы иммунного воспаления. Повышение уровня цитокина TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  способствует прогрессированию фиброза печени, контролируя баланс между пролиферацией клеток и апоптозом (F. Farinati, 2006). Одной из функций TNF- $\alpha$  является участие в регуляции апоптоза, в том числе в поврежденных вирусом клетках (J. R. Jonsson et al., 2000). Повышенный уровень TNF- $\alpha$  в сыворотке крови и в паренхиме печени у пациентов отмечается при ХГ (D. R. Nelson et al., 2003). Отмечено, что увеличение продукции TNF- $\alpha$  при хроническом вирусном гепатите С на ранней стадии может опосредовать усиленный апоптоз гепатоцитов с некрозом печени с последующим ослаблением апоптотической гибели клеток и, как следствие, вероятным развитием злокачественных новообразований печени (H. Zylberberg et al., 2009). Показано, что гиперпродукция TNF- $\alpha$  является одним из основных механизмов активации инфекционного процесса при его переходе из скрытого состояния в фазу клинических проявлений и свидетельствует о прогрессировании заболевания.

Ген TNF- $\alpha$  локализуется в 6-й хромосоме (Goyal et al., 2004). Известно несколько SNP этого гена в промоторной области (Zein et al., 2004), наиболее изученным из которых является полиморфизм -308G/A, который влияет на экспрессию TNF- $\alpha$ . Результаты, полученные при исследовании участия полиморфизма гена TNF- $\alpha$  в исходах острого гепатита С, противоречивы, что может быть связано с этническими особенностями пациентов, а также различной величиной выборок. Существует гипотеза о том, что TNF- $\alpha$  может служить прогностическим маркером исходов вирусного гепатита С.

Есть исследования, в которых связывают наличие аллеля А в генотипе с повышенным риском развития рака печени, более высоким риском фиброза печени и более тяжелым повреждением печени [5, 9, 10].

**Цель исследования**

Оценить ассоциацию полиморфизма маркеров генов интерлейкина-4 (IL-4) и фактора некроза опухоли (TNF-α) с тяжестью патологического процесса у пациентов с циррозом печени.

**Материалы и методы**

Объектом исследования были 59 пациентов гастроэнтерологического отделения ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница №3», находившихся на стационарном лечении по поводу цирроза печени, и 40 здоровых лиц группы сравнения. Средний возраст пациентов составил 56,7 года.

Класс тяжести цирроза А по Чайлду-Пью выявлен у 19 (32,2 %) пациентов, класс В — у 20 (33,9 %), класс С — у 20 (33,9 %). Признаки осложнения цирроза печени портальной гипертензией различной степени компенсации были выявлены у подавляющего большинства пациентов (50 человек, 84,7 %). Варикозное расширение вен пищевода диагностировано у 50 пациента, из них: I степени — у 9 (18 %) пациентов, II степени — у 22 (44 %), III степени — у 19 (38 %).

Материал для исследований — ДНК, выделенная из лейкоцитов крови пациентов, с применением коммерческих реагентов для выделения ДНК из клинического материала.

Для проведения молекулярно-генетического анализа выбраны следующие маркеры:

- 1) ген TNF-α — замена G308A (rs1800629 по классификации NCBI);
- 2) ген IL-4 — замена C590T (rs 2243250 по классификации NCBI).

Для выявления данных SNP (single nucleotide polymorphism — единичный однонуклеотидный полиморфизм) выбран метод ПЦР с последующим рестрикционным анализом и электрофоретической детекцией. Для проведения ПЦР, рестрикционного анализа и электрофоретической детекции использовали реагенты фирмы «ThermoScientific» (США). Для детекции продуктов ПЦР и рестрикционных фрагментов использовали горизонтальный гель-электрофорез (агарозный гель 1,7 и 2,5 % соответственно). Амплификацию проводили, используя амплификатор «PalmCycler» фирмы «CorbettResearch» (Австралия), визуализацию полученных результатов — с применением видеосистемы «Bio-Rad» GelDocXR (США), программа «QuantiOne». Структура праймеров («Праймтех», Беларусь) приведена в таблице 1.

Таблица 1 — Структура праймеров, используемых для выявления изучаемых SNP, и размер амплифицируемой зоны, п.н. (пар нуклеотидов)

Изучаемый полиморфизм	Нуклеотидная последовательность праймеров		Амплифицируемая зона
	Прямой	Обратный	
rs1800629 TNF-α	Прямой	5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'	117 п.н.
	Обратный	5'-ACACTCCCCATCCTCCCTGCT-3'	
rs 2243250 IL-4	Прямой	5-TAAACTTGGGAGAACATGGT-3'	194 п.н.
	Обратный	5-TGGGGAAAGATAGAGTAATA-3'	

**Выявление SNP rs1800629 TNF-α**

При выборе программы амплификации использовали амплификатор с функцией градиента температур: температура отжига праймеров от 55 до 65 °С. Для выявления замены G308A гена TNF-α (rs1800629) в исследуемых образцах использовали рестриктазу NcoI. Спектр гомозиготы GG представлен двумя зонами (97 и 20 п.н.), гомозиготного AA — одной зо-

ной (117 п.н.), а гетерозиготного организма AG — тремя зонами (117, 97, 20 п.н.). Фореграмма, иллюстрирующая результат рестрикции, представлена на рисунке 1.

**Выявление SNP rs 2243250 IL-4**

Электрофоретическая детекция продуктов амплификации для выявления фрагмента гена IL-4, содержащего SNP rs 2243250, представлена на рисунке 2.

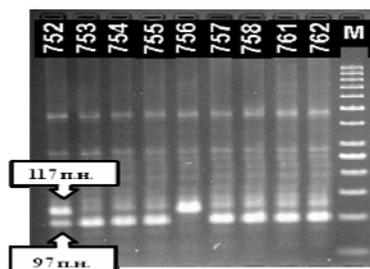


Рисунок 1 — Рестрикционный анализ для выявления замены G308A гена TNF-α (rs1800629)

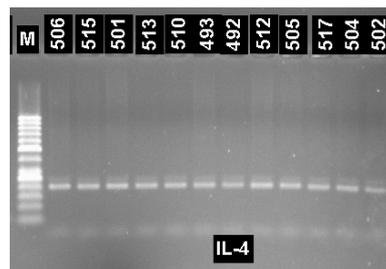


Рисунок 2 — Электрофоретическая детекция продуктов амплификации для выявления фрагмента гена IL-4, содержащего SNP rs 2243250

Для выявления замены C590T гена IL-4 (rs 2243250) в исследуемых образцах использовали рестриктазу AvaII. Спектр гомозиготы CC представлен двумя зонами (177 и 17 п.н.), гомозиготного TT — одной зоной (194 п.н.), а гетерозиготного организма CT — тремя зонами (194, 177, 17 п.н.). Таким образом, были определены генотипы по изучаемым локусам для пациентов из экспериментальной и контрольной групп исследования.

Для сравнения исследуемых групп по частотам аллелей и генотипов были использованы методы непараметрической статистики: для оценки непараметрических не связанных между собой показателей использовали критерий Манна-Уитни, связанных — критерий Вилкоксона. Соответствие наблюдаемых распределений частот генотипов, теоретически ожидаемым по уравнению Харди-Вайнберга, оценивали с использованием критерия  $\chi^2$ . Для оценки ассоциаций рассчитывали относительный риск (OR).

#### Результаты и обсуждение

Молекулярно-генетические исследования показали, что среди обследованных здоровых пациентов группы сравнения (n = 40) гетерози-

готное (C/T) носительство IL-4 (C590T) выявлено у 15 (37,5 %) человек, гомозиготное (T/T) — у 1 (2,5 %) человека (таблица 2). Частота встречаемости полиморфизма TNF $\alpha$  (G308A) среди здоровых людей составила 22,5 % (9 человек), все они были носителями гетерозиготного варианта (G/A) (таблица 3). В группе пациентов с циррозом печени гетерозиготное (C/T) носительство полиморфизма IL-4 (C590T) выявлено у 24 (40,7 %) человек, гомозиготное (T/T) — у 2 (3,4 %) человек (таблица 2). Частота встречаемости полиморфизма TNF $\alpha$  (G308A) среди пациентов с ЦП составила 25,4 % (15 человек); все они являлись носителями гетерозиготного варианта (G/A) (таблица 3).

Статистический анализ данных показал, что наличие полиморфизма генов IL-4 и TNF- $\alpha$  связано с незначительным повышением относительного риска развития цирроза печени, однако статистически значимых различий не получено (p>0,05).

Среди пациентов с первично билиарным циррозом печени (n=4) отсутствовали случаи полиморфизма исследуемых генов.

Таблица 2 — Частота встречаемости генотипов и аллелей IL-4 590 C/T (rs 2243250)

Группа	Частоты генотипов, n (%)			Частоты аллелей, n (%)	
	TT	CT	CC	T	C
Здоровые (n = 40)	1 (2,5 %)	15 (37,5 %)	24 (60 %)	17 (21,3 %)	63 (78,7 %)
Цирроз печени (n = 59)	2 (3,4 %)	24 (40,7 %)	33 (55,9 %)	26 (22,4 %)	90 (77,6 %)

Таблица 3 — Частота встречаемости генотипов и аллелей TNF- $\alpha$  rs1800629 G(-308)A

Группа	Частоты генотипов, n (%)			Частоты аллелей, n (%)	
	AA	AG	GG	A	G
Здоровые (n = 40)	0 (0 %)	9 (22,5 %)	31 (77,5 %)	9 (11,3 %)	71 (89 %)
Цирроз печени (n = 59)	1 (1,7 %)	15 (25,4 %)	43 (72,9 %)	16 (13,7 %)	101 (86,3 %)

При анализе частоты встречаемости генотипов у пациентов с ЦП в зависимости от класса тяжести заболевания по Чайлду-Пью было установлено, что при тяжелом классе цирроза С чаще встречались полиморфные генотипы исследуемых генов (таблица 4).

Имеет место увеличение частоты встречаемости генотипов CT и TT у пациентов с ЦП класса С в сравнении с имеющими класс В (относительный риск RR = 3,25; 95 % ДИ — 1,28–8,27; p < 0,05; чувствительность (Se) — 0,765; специфичность (Sp) — 0,696).

Таблица 4 — Частота встречаемости генотипов и аллелей IL-4 590 C/T (rs 2243250)

Группа	Частоты генотипов IL-4, n (%)			Частоты аллелей, n (%)	
	CC	CT	TT	C	T
Класс тяжести А, n = 19	11 (57,9 %)	8 (42,1 %)	0	30 (78,9 %)	8 (21,1 %)
Класс тяжести В, n = 20	16 (80 %)	4 (20 %)	0	36 (90 %)	4 (10 %)
Класс тяжести С, n = 20	7 (35 %)	11 (55 %)	2 (10 %)	25 (62,5 %)	15 (37,5 %)

Таблица 5 — Частота встречаемости генотипов и аллелей TNF- $\alpha$  rs1800629 G(-308)A

Группа	Частоты генотипов TNF- $\alpha$ , n (%)			Частоты аллелей, n (%)	
	GG	GA	AA	G	A
Класс тяжести А, n = 19	15 (78,9 %)	4 (21,1 %)	0	34 (89,5 %)	4 (10,5 %)
Класс тяжести В, n = 20	15 (75 %)	4 (20 %)	1 (5 %)	34 (85 %)	6 (15 %)
Класс тяжести С, n = 20	13 (65 %)	7 (35 %)	0	33 (82,5 %)	7 (17,5 %)

Выявлено статистически незначимое увеличение частоты встречаемости генотипов GA у пациентов с ЦП класса С в сравнении с имеющими класс А (относительный риск RR = 1,37; 95 % ДИ — 0,75–2,49;  $p > 0,05$ ; чувствительность (Se) — 0,350; специфичность (Sp) — 0,789).

При анализе частоты встречаемости генотипов у пациентов с ЦП и портальной гипертензией в зависимости от степени расширения варикозных вен в пищеводе было установлено, что при 3-й степени ВРВ пищевода чаще встречались полиморфные генотипы IL-4, а для TNF- $\alpha$  различий не выявлено (таблица 6).

Таблица 6 — Частота встречаемости генотипов и аллелей IL-4 590 C/T (rs 2243250)

Группа	Частоты генотипов IL-4, n (%)			Частоты аллелей, n (%)	
	CC	CT	TT	C	T
ВРВ пищевода 2-й степени, n = 22	15 (68,2 %)	7 (31,8 %)	0	37 (84,1 %)	7 (15,9 %)
ВРВ пищевода 3-й степени, n = 19	9 (47,4 %)	8 (42,1 %)	2 (10,5 %)	26 (68,4 %)	12 (31,6 %)

Имеет место относительное увеличение частоты встречаемости генотипов СТ и ТТ у пациентов с ЦП и ВРВ пищевода 3-й степени (относительный риск RR = 1,569; 95 % ДИ — 0,82–3,01;  $p > 0,05$ ; чувствительность (Se) — 0,526; специфичность (Sp) — 0,682).

При декомпенсации ЦП с развитием тяжелой печеночной недостаточности у 2 пациентов выявлено монозиготное (ТТ) носительство полиморфизма IL-4. Следует отметить, что данный вид полиморфизма встречается редко (3,4 %), однако ассоциировался с тяжелым течением цирроза печени (класс С) и декомпенсацией портальной гипертензии (ВРВ пищевода 3-й ст., асцит, спленомегалия, энцефалопатия, тяжелая печеночная недостаточность).

Также было выявлено, что среди пациентов с первичным билируриным циррозом печени (n = 4) отсутствовали случаи полиморфизма исследуемых генов.

#### Заключение

При анализе частоты встречаемости генотипов у пациентов с ЦП в зависимости от класса тяжести заболевания по Чайлду-Пью было установлено, что при тяжелом классе цирроза С чаще встречались полиморфные генотипы исследуемых генов.

При анализе частоты встречаемости генотипов у пациентов с ЦП и портальной гипертензией в зависимости от степени расширения варикозных вен в пищеводе было установлено, что при 3-й степени ВРВ пищевода чаще встречались полиморфные генотипы IL-4, а для TNF- $\alpha$  различий не выявлено. Монозиготное (ТТ) носительство полиморфизма IL-4 ассоциировалось с тяжелым течением цирроза печени (класс С) и декомпенсацией портальной гипертензии.

Таким образом, проведенный молекулярно-генетический анализ полиморфизма генов

IL-4 и TNF- $\alpha$  позволил предположить существование связи частоты полиморфных генотипов и аллелей исследуемых генов и тяжести ЦП и портальной гипертензии, что может быть использовано для диагностики и прогнозирования тяжелого течения заболевания. Вероятно, недостаточная по объему выборка в ряде случаев не позволила получить более убедительные статистически значимые результаты.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Полиморфизм генов — модификаторов иммунного ответа при заболеваниях печени различной этиологии / И. А. Гончарова [и др.] // Медицинская генетика. — 2010. — № 12. — С. 20–24.
2. Ивашкин, В. Т. Осложнения портальной гипертензии при циррозе печени / В. Т. Ивашкин // Российский физиологический журнал. — 2009. — № 10. — С. 74–76.
3. Косаговская, И. И. Медико-социальные аспекты вирусных гепатитов с парентеральным механизмом передачи / И. И. Косаговская, Е. В. Волчкова // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2013. — № 1. — С. 28–39.
4. Кучерявый, Ю. А. Хронический гепатит, цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома — звенья одной цепи / Ю. А. Кучерявый, Н. Ю. Стукова, М. Л. Ахтаева // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. — 2012. — № 5. — С. 130–133.
5. Анализ влияния генетических факторов вируса гепатита С и полиморфизма генов инфицированных людей на развитие фиброза печени / Л. И. Николаева [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2012. — № 5. — С. 7–13.
6. Полиморфизм гена ИЛ-28В как предиктор ответа на противовирусную терапию хронического гепатита С / Т. В. Симанкова [и др.] // Клиническая фармакология и терапия. — 2012. — № 21. — С. 1–6.
7. Уровень интерлейкина-6 как показатель тяжести цирроза печени и портальной гипертензии / А. Г. Скуратов [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. — 2016. — № 4 (50). — С. 110–114.
8. Полиморфизм промоторного региона генов IL-4, IL-6 и IL-10 у пациенток с раком молочной железы / А. В. Шевченко [и др.] // Медицинская иммунология. — 2009. — Т. 11, № 1 — С. 21–28.
9. Tumor necrosis factor-alpha 308.2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma / J. E. Jeng [et al.] // Neoplasia. — 2007. — Vol. 9(11). — P. 987–992.
10. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection / Q. J. Gao [et al.] // World J. Gastroenterol. — 2009. — Vol. 15(44). — P. 5610–5619.

Поступила 22.05.2017