

DOI: 10.15690/vramn548

Л.М. Самоходская<sup>1</sup>, Е.Е. Старостина<sup>1</sup>, Е.Б. Яровая<sup>1</sup>, Т.Н. Краснова<sup>1,2</sup>,  
Н.А. Мухин<sup>1,2</sup>, В.А. Ткачук<sup>1</sup>, В.А. Садовничий<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России,  
Москва, Российская Федерация

# Математическая модель прогноза скорости фиброза печени у больных с хроническим гепатитом С на основе комбинаций геномных маркеров

**Обоснование.** В настоящее время большое внимание уделяется поиску генетических факторов, объясняющих течение хронического гепатита С (ХГС). **Цель исследования:** оценить прогностическую значимость носительства комбинаций аллельных вариантов генов *IL 1b*, *IL 6*, *IL 10*, *TNF α*, *HFE*, *TGF b*, *ATRI*, *NOS3*, *CYBA*, *AGT*, *MTHFR*, *FII*, *FV*, *FVII*, *FXIII*, *ITGA2*, *ITGB3*, *FBG*, *PAI* на прогрессирование фиброза печени при ХГС. **Материалы и методы:** 118 пациентов с ХГС разделены на группы с быстрым и медленным (скорость фиброза  $\geq 0,13$  и  $< 0,13$  ед. фиброза/год;  $n = 64$  и  $n = 54$ , соответственно) фиброзом. Выполнено определение полиморфизма. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программ Statistica 10. **Результаты.** У больных с быстрым фиброзом в сравнении с группой с медленным чаще встречались аллель А ( $p = 0,012$ ) и мутантный генотип АА ( $p = 0,024$ ) гена *AGT G-6T*, также в данной группе чаще выявляли аллель Т ( $p = 0,013$ ) и генотип МТ+ТТ гена *AGT 235 M/T* ( $p = 0,005$ ). Больные с генотипом ТТ гена *CYBA 242 C/T* имели более высокую скорость фиброза по сравнению с больными с генотипом СС+СТ ( $p = 0,02$ ). В ходе анализа выявлено протективное влияние гомозиготы ТТ гена *ITGA2 807 C/T* на темпы фиброза ( $p = 0,03$ ). Наблюдались тенденции к различию по встречаемости аллелей и генотипов полиморфных маркеров *TGFb +915 G/C*, *FXIII 103 G/T*, *PAI -675 5G/4G* между двумя группами. Для остальных генов достоверных отличий не обнаружено. В дальнейшем построена математическая модель, учитывающая протективное и профиброгенное влияние генов, в также влияние генотипа вируса. Выявлена корреляция между суммой баллов в этой модели и темпом прогрессирования фиброза в печени ( $R = 0,39$ ,  $p = 0,000$ ). **Заключение:** предложенная математическая модель может прогнозировать течение болезни.

651

**Ключевые слова:** хронический гепатит С, скорость фиброза печени, полиморфизм генов, геномные маркеры.

(Для цитирования: Самоходская Л.М., Старостина Е.Е., Яровая Е.Б., Краснова Т.Н., Мухин Н.А., Ткачук В.А., Садовничий В.А. Математическая модель прогноза скорости фиброза печени у больных с хроническим гепатитом С на основе комбинаций геномных маркеров. *Вестник РАМН*. 2015; 70 (6): 651–661. Doi: 10.15690/vramn548)

L.M. Samokhodskaja<sup>1</sup>, E.E. Starostina<sup>1</sup>, E.B. Yarovaya<sup>1</sup>, T.N. Krasnova<sup>1,2</sup>,  
N.A. Mukhin<sup>1,2</sup>, V.A. Tkachuk<sup>1</sup>, V.A. Sadovnichy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Sechenov First Moscow state medical university, Moscow, Russian Federation

## Mathematic Model for Prediction of Liver Fibrosis Progression Rate in Patients with Chronic Hepatitis C Based on Combination of Genomic Markers

**Aim of study.** To evaluate clinical significance of different combinations of gene polymorphisms *IL-1b*, *IL-6*, *IL-10*, *TNF*, *HFE*, *TGF-b*, *ATRI*, *NOS3894*, *CYBA*, *AGT*, *MTHFR*, *FII*, *FV*, *FVII*, *FXIII*, *ITGA2*, *ITGB3*, *FBG*, *PAI* and their prognostic value for prediction of liver fibrosis progression rate in patients with chronic hepatitis C (CHC). **Subjects and methods:** 118 patients with CHC were divided into «fast» and «slow» (fibrosis rate progression  $\geq 0,13$  and  $< 0,13$  fibrosis units/yr;  $n = 64$  and  $n = 54$ ) fibrosis groups. Gene polymorphisms were determined. Statistical analysis was performed using Statistica 10. **Results.** A allele ( $p = 0,012$ ) and genotype AA ( $p = 0,024$ ) of *AGT G-6T* gene, as well as T allele ( $p = 0,013$ ) and MT+TT genotypes ( $p = 0,005$ ) of *AGT 235 M/T* gene were significantly more common in «fast fibrosers» than in «slow fibrosers». Patients with genotype TT of *CYBA 242 C/T* had a higher fibrosis progression rate than patients with CC+CT genotype ( $p = 0,02$ ). Our analysis showed a protective effect of TT genotype of *ITGA2 807 C/T* on fibrosis progression rate ( $p = 0,03$ ). There was a trend ( $p < 0,15$ ) to higher fibrosis progression rate in patients with mutant alleles and genotypes of *TGFb +915 G/C*, *FXIII 103 G/T*, *PAI -675 5G/4G* genes. Other gene polymorphisms were not associated with enhanced liver fibrosis. To build a mathematical model for prediction of liver fibrosis progression rate we performed coding with scores for genotypes and virus genotype. Total score correlated with the fibrosis progression rate ( $R = 0,39$ ,  $p = 0,000$ ). **Conclusion:** Determination of genetic profile of the patient and virus genotype allows to predict the course of CHC.

**Key words:** chronic hepatitis C, liver fibrosis progression rate, gene polymorphism, genomic markers.

(For citation: Samokhodskaja L.M., Starostina E.E., Yarovaya E.B., Krasnova T.N., Mukhin N.A., Tkachuk V.A., Sadovnichy V.A. Mathematic Model for Prediction of Liver Fibrosis Progression Rate in Patients with Chronic Hepatitis C Based on Combination of Genomic Markers. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 70 (6): 651–661. Doi: 10.15690/vramn548)

## Обоснование

Известно, что примерно у 20% больных хроническим вирусным гепатитом С (ХГС) цирроз печени (ЦП) развивается в течение 20 лет, у 80% формирование рубцовых изменений в органе занимает более длительный период времени. Поиск причин столь выраженных различий в течении ХГС привел к установлению классических факторов, способствующих развитию заболевания, среди которых выделяют:

- факторы вируса (генотип и квазивиды вируса, уровень вирусемии);
- факторы хозяина (возраст и длительность инфицирования, мужской пол, коинфекция HBV и/или HIV, метаболические факторы, генетические факторы);
- факторы внешней среды (злоупотребление алкоголем, воздействие токсических веществ, иммуносупрессия, курение).

В последние годы особое внимание уделяют изучению генетических факторов при хронической инфекции вирусом гепатита С (Hepatitis C Virus, HCV), которые, с одной стороны, могут определять индивидуальные особенности течения заболевания, а с другой — служить маркером для оценки прогноза болезни и ответа на терапию. Наиболее широко исследуемыми генетическими факторами хозяина являются однонуклеотидные замены в последовательности генов (SNP, аллельный полиморфизм), приводящие к изменению активности или концентрации продукта соответствующего гена.

В настоящее время проводится большое число работ по изучению взаимосвязи аллельных вариантов генов-кандидатов с течением ХГС, при этом наиболее обсуждаемые из них — это гены цитокинов и гемохроматоза, эндотелиальной дисфункции, ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, свертывающей системы крови, участвующие в регуляции множества процессов в организме. Вместе с тем в литературе нет единого мнения об ассоциации генетического полиморфизма вышеупомянутых генов с тяжестью течения ХГС, а также с самим течением и исходом заболевания. Также очень малочисленны данные по исследованию комбинации аллельных вариантов вышеупомянутых генов у больных ХГС.

**Цель исследования:** оценить клиническую и прогностическую значимость носительства различных комбинаций аллельных вариантов генов *IL 1b -511 C/T*, *IL 6 -174 G/C*, *IL 10 -1082 G/A*, *TNF α -238 G/A*, *HFE H63D* и *C282Y*, *TGF b +915 G/C*, *ATRI 1166 A/C*, *NOS3894 G/T*, *CYBA 242 C/T*, *AGT G-6T* и *235M/T*, *MTHFR 677 C/T*, *FII 20210 G/A*, *FV 1691G/A*, *FVII 10976 G/A*, *FXIII 103 G/T*, *ITGA2 807 C/T*, *ITGB3 1565 T/C*, *FBG -455 G/A*, *PAI -675 5G/4G* на прогрессирование фиброза печени у больных ХГС.

## Методы

### Дизайн исследования

Одномоментное наблюдательное исследование ХГС и ЦП в его исходе.

### Критерии соответствия

Критериями включения служили наличие ХГС или цирроз печени в его исходе, принадлежность к европеоидной расе, а также подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения больных являлись употребление алкоголя (>20 мл/сут для женщин и >40 мл/сут для мужчин), наличие дополнительных этиологических факторов заболевания печени

(коинфекция ХГВ, ВИЧ, болезнь Вильсона–Коновалова, аутоиммунный гепатит, наследственный гемохроматоз), сахарный диабет 1-го и 2-го типа.

Диагнозы хронического гепатита С и цирроза печени были установлены на основании данных анамнеза, клинического обследования, лабораторных и инструментальных результатов, включая вирусологическое исследование (положительные тесты на антитела к вирусу гепатита С и HCV РНК).

### Условия проведения

Исследование выполнено на базах Клиники нефрологии, внутренних и профессиональных болезней Первого МГМУ имени М.И. Сеченова и Научно-исследовательской лаборатории генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

В исследование включались последовательно все больные ХГС, поступающие для клинического или амбулаторного обследования и лечения с ноября 2009 до июня 2014 г.

### Продолжительность исследования

Исследование проводилось в период с ноября 2009 до сентября 2015 г.

### Описание медицинского вмешательства

Всем больным проводилось стандартное клинико-лабораторное обследование. Для определения стадии фиброза больным выполняли биопсию печени по методике Менгини (78 больных) с последующим гистологическим исследованием после окраски гематоксилином-эозином. Морфологическая картина не противоречила изменениям в ткани печени при хроническом гепатите С. У 7 больных была выполнена эластометрия печени с помощью аппарата FibroScan (Echosens, Франция). У 33 больных стадия фиброза расценена как F4 по данным клинико-лабораторного и инструментального анализа без проведения эластометрии и биопсии печени.

### Исходы исследования

Исходом исследования являлось создание математической модели, основанной на комбинации полиморфных маркеров генов, для прогноза скорости прогрессирования фиброза в печени больных хроническим гепатитом С.

### Методы регистрации исходов

Выделение геномной ДНК проводили из ЭДТА-стабилизированной периферической венозной крови согласно протоколу с помощью коммерческого набора QIAamp DNA Blood Mini Kit и автоматической станции QIAcube™ (QIAGEN GmbH, Германия).

Полиморфные аллели генов цитокинов определяли методом полиморфизма длины рестриктных фрагментов, а гена *HFE* — аллельспецифичной полимеразной цепной реакцией в термоциклере Master Cycler (Eppendorf, Германия). Полиморфизм генов *MTHFR 677 C/T*, *FII 20210 G/A*, *FV 1691G/A*, *FVII 10976 G/A*, *FXIII 103 G/T*, *ITGA2 807 C/T*, *ITGB3 1565 T/C*, *FBG -455 G/A*, *PAI -675 5G/4G* определяли с помощью коммерческих наборов ДНК-технология, термоциклера DTrime и программного обеспечения для приборов ДТ (ДНК-технология, Россия).

### Этическая экспертиза

Исследования проводили с согласия обследуемых в соответствии со ст. 32 Основ законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан (утверждены

ВС РФ от 22.07.1993 № 5487-1 в редакции от 30.12.2008). Комитет по этике при ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России заключил, что данное исследование может считаться не противоречащим основам медицинской этики. Дополнительных рекомендаций комиссия не дала (протокол №2 от 02 октября 2009 г.).

**Статистический анализ**

**Принципы расчета размера выборки.** Размер выборки предварительно не рассчитывался.

**Методы статистического анализа данных.** Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов статистических программ Statistica 10. Гипотезу о нормальности распределения исследуемых показателей проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для каждой из непрерывных величин в зависимости от их типа распределения определяли либо среднее (M) и стандартное отклонение (σ), либо медиану и квартили распределения. При сравнении двух групп больных с быстрым и медленным прогрессированием фиброза по основным показателям (в зависимости от типа распределений анализируемых показателей) использовали непарный t-критерий Стьюдента (для равных или неравных дисперсий) или его непарметрический аналог — U-критерий Манна–Уитни. Для сравнения средних значений показателей в нескольких (трех и более) независимых группах применялся дисперсионный анализ (ANOVA). В тех случаях, когда распределение параметра существенно отклонялось от нормального распределения, а также для малочисленных выборок использовался

непарметрический аналог ANOVA — метод Краскела–Уоллиса. Для анализа таблиц сопряженности признаков 2 × 2 применялся двусторонний точный критерий Фишера, для остальных таблиц сопряженности — критерий χ<sup>2</sup> Пирсона. Взаимосвязь переменных изучали при помощи корреляционного анализа. Если не удавалось установить нормальность распределения хотя бы одного из сравниваемых показателей, то в этом случае вместо коэффициента корреляции Пирсона приводился ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Ошибка первого рода (p-значение) округлялась до трех значащих цифр после запятой. Уровень значимости для проверяемых гипотез был принят равным 0,05.

**Результаты**

**Участники исследования**

Среди 118 обследованных были 84 женщины (71,2%) и 34 мужчины (28,8%). Средний возраст больных составил 49,1 ± 13,9 (от 18 до 76) года. У 61 (51,7%) пациента диагностирован ХГС на различных стадиях фиброза по METAVIR: у 37 (31,4%) — F1, у 15 (12,7%) — F2, у 9 (7,6%) — F3. Еще у 57 (48,3%) пациентов был выявлен ЦП в исходе ХГС (F4 по METAVIR). Преобладание женщин обусловлено жесткими критериями исключения (мужчины чаще злоупотребляли алкоголем или имели коинфекцию ВИЧ / вируса гепатита В). Инфицирование происходило в возрасте от 0 (при рождении) до 59 лет: медиана возраста инфицирования — 24 года (18–36 лет), медиана предполагаемой длительности заболевания — 23 года (14–30).

**Таблица 1.** Сравнительные демографические, клинические и лабораторные характеристики групп больных с различной скоростью прогрессирования фиброза

Признак	Фиброз медленный	Фиброз быстрый	p
Пол (n), %			
Мужчины	20,4 (11)	35,9 (23)	0,070 <sup>[1]</sup>
Женщины	79,6 (43)	64,1 (41)	
Возраст, M±σ	47,9±14,9	50,1±13,0	0,398 <sup>[4]</sup>
Возраст инфицирования, M±σ	20,6±12,0	31,2±11,8	0,000 <sup>[4]</sup>
Длительность инфицирования, M±σ	27,2±11,4	19,03±10,19	0,000 <sup>[4]</sup>
Генотип вируса (n), %			
1	76,1 (35)	75,0 (36)	0,064 <sup>[2]</sup>
2	19,6 (9)	8,3 (4)	
3	4,3 (2)	16,7 (8)	
Факторы риска (n), %			
Неизвестен	5,6 (3)	6,6 (4)	0,552 <sup>[2]</sup>
Наркотики в/в	3,7 (2)	9,5 (6)	
Гемотрансфузии	61,1 (33)	46,0 (29)	
Оперативные вмешательства	24,1 (13)	31,8 (20)	
Тату / Пирсинг	1,9 (1)	3,2 (2)	
Медработник	3,7 (2)	1,6 (1)	
Другое	0 (0)	1,59 (1)	
Стадия фиброза (n), %			
F1	57,4 (31)	9,4 (6)	0,000 <sup>[2]</sup>
F2	7,4 (4)	17,2 (11)	
F3	7,4 (4)	7,8 (5)	
F4	27,8 (15)	65,6 (42)	
АЛТ, Ед/л, медиана (квартили)	46,7 (31,0–73,0)	65 (41,5–91,5)	0,041 <sup>[3]</sup>
АСТ, Ед/л, медиана (квартили)	39,9 (29,0–68,0)	59 (41,2–104,5)	0,010 <sup>[3]</sup>
ГЦК (n), %	3,7 (2)	4,7 (3)	1,000 <sup>[1]</sup>
Криоглобулины (n), %	28,0 (14)	31,7 (19)	0,834 <sup>[1]</sup>

*Примечание.* АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспаргатаминотрансфераза, ГЦК — гепатоцеллюлярная карцинома. p-значение вычислялось для двустороннего критерия Фишера [1], критерия χ<sup>2</sup> Пирсона [2], U-критерия Манна–Уитни [3], t-критерия Стьюдента для равных дисперсий [4].

Анализ факторов риска инфицирования гепатитом С показал, что наиболее частой причиной заражения HCV-инфекцией были гемотрансфузии (n =63; 53,4%), оперативные вмешательства (n =33; 28,0%), реже наркомания (n =8; 6,8%), значительно реже татуировки (n =3; 2,5%) и контакт с кровью среди медицинских работников (n =3; 2,5%). У 8 больных (6,7%) не удалось выявить факторов риска инфицирования.

Типирование HCV РНК (определение генотипа вируса) проведено у 94 больных, при этом генотип 1 был доминирующим и определялся у 71 (60,2%) больного, 2-й и 3-й генотип вируса — у 13 (11,0%) и 10 (8,5%) больных, соответственно.

Скорость прогрессирования фиброза оценивали по формуле, предложенной Т. Роупард и соавт. [1]:

$$\text{Скорость прогрессирования фиброза печени (ед. фиброза/год)} = \frac{\text{Стадия фиброза по METAVIR (ед. фиброза)} / \text{длительность инфицирования (год)}}{1}$$

У 64 пациентов (54,2%) расчетная скорость прогрессирования фиброза была  $\geq 0,130$  ед. фиброза/год, медиана составила 0,22 ед. фиброза/год (0,16–0,33). Эти лица были отнесены в группу с быстро прогрессирующим фиброзом. У 54 больных (45,8%) темп прогрессирования не достигал 0,130 ед. фиброза/год, медиана составила 0,07 ед. фиброза/год (0,05–0,10). Эти больные были отнесены в группу с медленным развитием фиброза (табл. 1).

Больные с быстро прогрессирующим течением ХГС были инфицированы в более позднем возрасте, имели более короткий срок инфицирования и более высокую активность трансаминаз (АЛТ и АСТ), чем у пациентов с медленно прогрессирующим течением заболевания, причем выявленные различия были статистически достоверными (см. табл. 1). Частота выявления определенных генотипов вируса в группах с быстрым и медленным фиброзом имела тенденцию к различию. В то же время нами не получено отличий между группами при сравнении возраста, обнаружении гепатоцеллюлярной карциномы и

**Таблица 2.** Распределение аллелей и генотипов исследуемых генов у больных хроническим гепатитом С с различной скоростью прогрессирования фиброза печени

Ген	Аллель / Генотип	Фиброз медленный (n), %	Фиброз быстрый (n), %	p
TGFB +915 G/C	GG	88,9 (48)	78,1 (50)	0,144 <sup>[2]</sup>
	GC	11,1 (6)	21,9 (14)	
	CC	0,0 (0)	0,0 (0)	
CYBA 242 C/T	CC	46,3 (25)	46,9 (30)	0,197 <sup>[2]</sup>
	CT	50 (27)	40,4 (26)	
	TT	3,7 (2)	12,5 (8)	0,107 <sup>[1]</sup>
	CC+CT	96,3 (52)	87,5 (56)	
AGT G-6T	G	65,7 (71)	49,2 (63)	0,012 <sup>[1]</sup>
	A	34,3 (37)	50,8 (65)	0,041 <sup>[2]</sup>
	GG	42,6 (23)	26,6 (17)	
	GA	46,3 (25)	45,3 (29)	
	AA	11,1 (6)	28,1 (18)	0,024 <sup>[1]</sup>
	GG+GA	88,9 (48)	71,3 (46)	
	GA+AA	57,4 (31)	73,4 (47)	
AGT 235M/T	M	61,1 (66)	44,5 (57)	0,013 <sup>[1]</sup>
	T	38,9 (42)	55,5 (71)	0,010 <sup>[2]</sup>
	MM	44,4 (24)	18,7 (12)	
	MT	33,3 (18)	51,6 (33)	
	TT	22,2 (12)	29,7 (19)	0,005 <sup>[1]</sup>
	MT+TT	55,6 (30)	81,3 (52)	
FXIII 103 G/T	GG	53,7 (29)	37,5 (24)	0,202 <sup>[2]</sup>
	GT	35,2 (19)	45,3 (29)	
	TT	11,1 (6)	17,2 (11)	0,096 <sup>[1]</sup>
	GT+TT	46,3 (25)	62,5 (40)	
ITGA2 807 C/T	CC	35,2 (19)	35,9 (23)	0,145 <sup>[2]</sup>
	CT	38,9 (21)	51,6 (33)	
	TT	25,9 (14)	12,5 (8)	0,095 <sup>[1]</sup>
	CC+CT	74,1 (40)	87,5 (56)	
PAI -675 5G/4G	5G5G	31,5 (17)	17,2 (11)	0,164 <sup>[2]</sup>
	5G4G	42,6 (23)	56,2 (36)	
	4G4G	25,9 (14)	26,6 (17)	
	5G4G+4G4G	68,5 (37)	82,8 (53)	0,084 <sup>[1]</sup>

Примечание. p-значение вычислялось для двустороннего критерия Фишера [1], критерия  $\chi^2$  Пирсона [2].

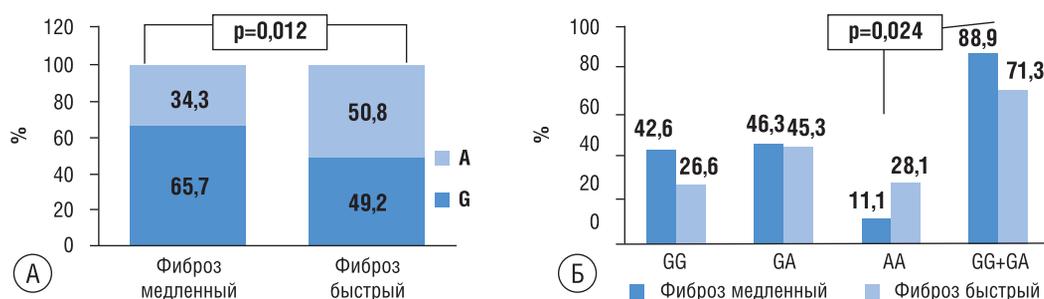


Рис. 1. Распределение аллелей (А) и генотипов (Б) полиморфизма *AGT* по локусу G-6T

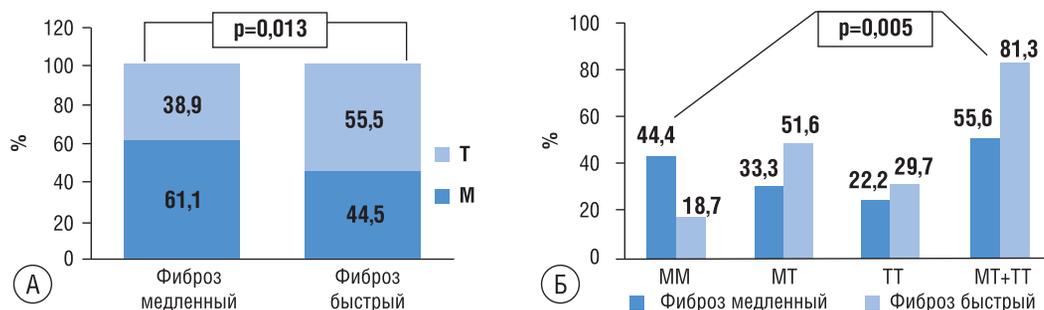


Рис. 2. Распределение аллелей (А) и генотипов (Б) полиморфизма *AGT* по локусу M235T

криоглобулинов. Более половины больных группы с быстрым фиброзом (65,6%) имели ЦП (см. табл. 1).

**Основные результаты исследования**

**Анализ взаимосвязи между прогрессированием фиброза печени и носительством вариантов аллелей исследованных генов у больных ХГС (табл. 2).**

У больных с быстрым темпом фиброза в сравнении с группой медленного фиброза статистически значимо чаще встречался аллель А гена *AGT* по локусу G-6T по сравнению с аллелем G (50,8 против 34,3%,  $p = 0,012$ ) и гомозиготный мутантный генотип AA в отличие от генотипов GG+GA (28,1 против 11,1%,  $p = 0,024$ ; рис. 1).

Аллели М и Т гена *AGT 235 M/T* у больных с медленным прогрессированием фиброза встречались в 61,1 и 38,9% случаев, у больных с быстрым прогрессированием фиброза — в 44,5 и 55,5%, соответственно ( $p = 0,010$ ; рис. 2). Кроме того, распространенность дикого типа также различалась между группами, при этом генотип MM чаще встречался в группе больных с медленным фиброзом по сравнению с группой быстрого развития (44,4 против 18,7%), а гетерозиготный вариант MT — чаще в группе с быстрым прогрессированием фиброза печени (51,6 против 33,3%). Выявленные различия были статистически достоверными ( $p = 0,010$ ). При объединении MT- и TT-генотипов в одну группу различия становились более выраженными: в группе медленного фиброза генотипы MT+TT определялись в 55,6% случаев, а в группе больных с быстрым фиброзом — в 81,3% ( $p = 0,005$ ).

Анализ таблиц сопряженности показал наличие связи в наследовании полиморфных маркеров гена *AGT* по локусам G-6T и M235T ( $p < 0,001$ ), т.е. при наличии дикого типа по локусу G-6T велика вероятность выявления полиморфного маркера MM по локусу M235T.

Статистически достоверных отличий в распространенности полиморфных маркеров генов цитокинов *IL 1b -511 C/T*, *IL 10 -1082 G/A*, *TNF α -238 G/A*, *IL 6 -174 G/C*, генов гемохроматоза *C282Y* и *H63D*, генов PAAC и эндотелиальной дисфункции (*ATRI 1166 A/C*, *NOS3 894 G/T* и *MTHFR 677 C/T*), тромбоцитарного рецептора *ITGB3*

1565 T/C, а также генов белков, участвующих в регуляции процессов гемостаза (*FII 20210 G/A*, *FV 1691 G/A*, *FVII 10976 G/A*, *FBG -455 G/A*, *PAI 1 -675 4G/5G*), в группах пациентов с разным прогрессированием фиброза не выявлено (данные не представлены).

Таблица 3. Скорость фиброза у больных с полиморфными маркерами исследуемых генов

Ген	Аллель / Генотип	ед. фиброза/год, медиана (квартили)	p
<i>TGFb+915 G/C</i>	GG	0,13 (0,07–0,22)	0,409 <sup>[1]</sup>
	GC	0,16 (0,10–0,21)	
<i>CYBA 242 C/T</i>	CC	0,14 (0,08–0,20)	0,059 <sup>[2]</sup>
	CT	0,12 (0,07–0,25)	
	TT	0,22 (0,13–0,33)	0,018 <sup>[1]</sup>
	CT+TT	0,13 (0,08–0,27)	
<i>ITGA2 807 C/T</i>	CC	0,14 (0,10–0,25)	0,084 <sup>[2]</sup>
	CT	0,15 (0,09–0,22)	
	TT	0,09 (0,06–0,17)	
	CC+CT	0,15 (0,10–0,22)	0,028 <sup>[1]</sup>
	CT+TT	0,15 (0,07–0,21)	0,273 <sup>[1]</sup>
<i>FXIII 103 G/T</i>	GG	0,12 (0,07–0,17)	0,204 <sup>[2]</sup>
	GT	0,15 (0,10–0,22)	
	TT	0,21 (0,09–0,29)	
	GG+GT	0,13 (0,08–0,21)	0,255 <sup>[1]</sup>
	GT+TT	0,16 (0,09–0,23)	0,090 <sup>[1]</sup>
<i>PAI -675 5G/4G</i>	5G5G	0,11 (0,07–0,20)	0,285 <sup>[2]</sup>
	5G4G	0,15 (0,10–0,22)	
	4G4G	0,14 (0,06–0,22)	
	5G5G+5G4G	0,14 (0,09–0,22)	0,642 <sup>[1]</sup>
	5G4G+4G4G	0,15 (0,09–0,22)	0,204 <sup>[1]</sup>

Примечание. p-значение вычислялось для U-критерия Манна–Уитни [1], критерия Краскела–Уоллиса [2].

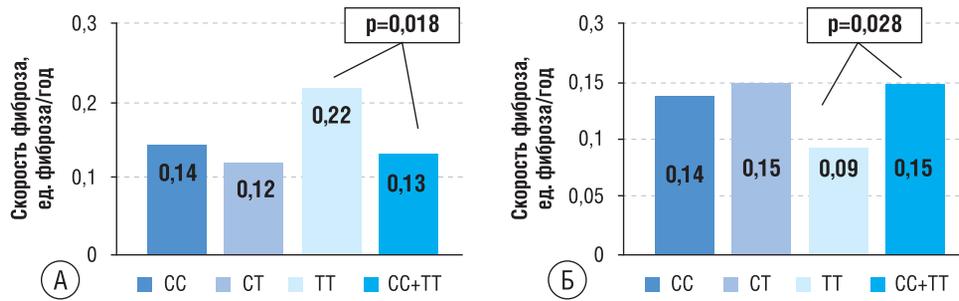


Рис. 3. Скорость фиброза у больных с полиморфными маркерами генов *CYBA 242 C/T* (А) и *ITGA2 807 C/T* (Б)

Отмечена тенденция ( $p < 0,15$ ) к различию групп с быстрым и медленным прогрессированием фиброза по встречаемости аллелей и генотипов полиморфных маркеров *TGFb +915 G/C*, *CYBA 242 C/T*, *FXIII 103 G/T*, *ITGA2 807 C/T*, *PAI -675 5G/4G* между группами с быстрым и медленным прогрессированием фиброза. В дальнейшем проведен анализ взаимосвязи этих генов со скоростью прогрессирования фиброза (абсолютные значения, выраженные в ед. фиброза/год, табл. 3). Отмечено, что больные с генотипом *TT* гена *CYBA 242 C/T* имели более высокую скорость фиброза по сравнению с больными с генотипом *CC+CT* (0,22 против 0,13 ед. фиброза/год,  $p = 0,02$ ; рис. 3А). В ходе анализа обнаружено протективное влияние мутантного генотипа *TT* гена *ITGA2 807 C/T* на темпы фиброза: так, больные с данным полиморфным вариантом *TT* имели более медленную скорость фиброза (0,09 ед. фиброза/год) по сравнению с пациентами объединенной группы *CC+CT* (0,15 ед. фиброза/год,  $p = 0,03$ ; рис. 3Б). Для остальных полиморфизмов значимых различий не получено.

**Использование полиморфных маркеров исследованных генов для определения прогноза у больных ХГС**

Чтобы более определенно предсказать вероятное течение заболевания и возможный исход, мы оценивали влияние комбинаций аллелей исследуемых генов у больных ХГС. В анализ были включены 7 полиморфных маркеров, для которых была доказана статистическая значимость (*AGT G-6T* и *AGT 235 M/T*) или имелась тенденция к ней (*+915 G/C TGFb*, *CYBA 242 C/T*, *FXIII 103 G/T*, *ITGA2 807 C/T*, *PAI -675 5G/4G*). Нами произведено кодирование с присвоением одного балла (+1) генотипам с одним профибротическим аллелем, двух баллов (+2) — с двумя профибротическими аллелями (*AGT 6A* и *AGT 235 T*, *TGFb*

*+915 C*, *CYBA 242 T*, *FXIII 103 T*, *PAI -675 4G*). В случае выявления среди исследованных полиморфизмов 1 или 2 «протективных» аллелей (*ITGA2 807 C*) им присваивались -1/-2 балла, соответственно. В дальнейшем производилось суммирование всех «протективных» и «профибротических» генотипов, т.е. определялся генетический профиль каждого больного (табл. 4).

При корреляционном анализе выявлена взаимосвязь между суммой баллов аллелей и скоростью фиброза, при этом коэффициент корреляции Спирмена ( $r$ ) составил 0,32, ( $p < 0,001$ ). Другими словами, чем больше пациент имел «профибротических» и меньше «протективных» аллелей полиморфизмов, включенных в модель, тем быстрее шли процессы фиброза в печени.

В дальнейшем больные по суммарному баллу были разделены по квартилям на три группы:

- больные с суммарным баллом «1 и ниже» ( $n = 23$ );
- больные с суммарным баллом от «2 до 4» ( $n = 57$ );
- больные с суммарным баллом «5 и более» ( $n = 38$ ).

В каждой группе определена медиана скорости фиброза в печени (см. табл. 3). Из рис. 4 видно, что сформированные группы статистически значимо различаются по скорости фиброза ( $p = 0,016$ ). Методом множественных ранговых сравнений выявлен более высокий темп процессов фиброзирования в группе 3 по сравнению с группами 1 ( $p = 0,002$ ) и 2 ( $p = 0,021$ ). Статистически значимых различий между группами 1 и 2 не выявлено (см. рис. 4).

Учитывая литературные данные о «профибротическом» влиянии 3-го генотипа вируса гепатита С, а также полученную нами тенденцию к статистической значимости во встречаемости различных генотипов вируса у пациентов с медленным и быстрым развитием фиброза, мы включили в нашу модель дополнительный балл (0 — для второго гено-

Таблица 4. Балльная оценка генетического профиля у больных с медленным и быстрым прогрессированием фиброза

Группа	1			2			3				
Сумма баллов	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Фиброз медленный</i>											
n	1	8	8	6	10	11	5	4	1	0	0
%	1,85	14,81	14,81	11,11	18,52	20,37	9,26	7,41	1,85	0,00	0,00
<i>Фиброз быстрый</i>											
n	0	1	5	8	11	11	12	11	1	3	1
%	0,00	1,56	7,81	12,50	17,19	17,19	18,75	17,19	1,56	4,69	1,56
<i>Общие показатели</i>											
n	1	9	13	14	21	22	17	15	2	3	1
%	0,85	7,63	11,02	11,86	17,8	18,64	14,41	12,71	1,69	2,54	0,85
<i>Скорость фиброза, ед. фиброза/год</i>											
Медиана (квартили)	0,10 (0,07–0,15)			0,13 (0,07–0,2)			0,19 (0,1–0,33)				
p	0,016										

Примечание. p-значение вычислялось для критерия Краскела–Уоллиса при сравнении групп 1, 2, 3.

Таблица 5. Балльная оценка генетического профиля у больных ХГС с учетом влияния генотипа вируса

Группа	I			II			III				
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Суммарный балл	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n	2	8	10	10	15	14	16	13	1	4	1
<i>Скорость фиброза, ед. фиброза/год</i>											
n	20			39			35				
Медиана (квартили)	0,09 (0,06–0,11)			0,14 (0,07–0,22)			0,2 (0,1–0,33)				
p	0,001										

Примечание. p — значение вычислялось для критерия Краскела–Уоллиса при сравнении групп I, II, III.

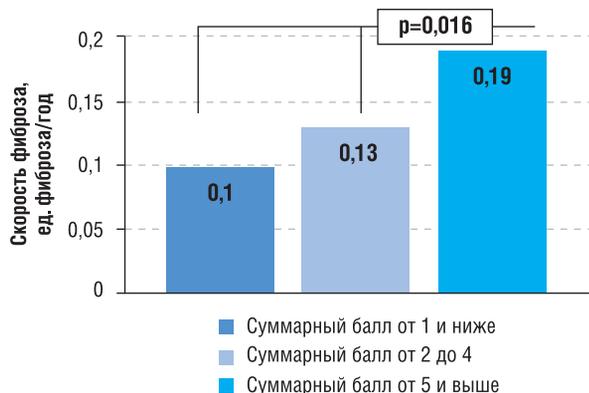


Рис. 4. Скорость фиброза у больных с суммарных баллом от 1 и ниже (группа 1), от 2 до 4 (группа 2), от 5 и более (группа 3)

типа вируса, 1 — для первого, 3 — для третьего). Медиана скорости фиброза для больных с разным суммарным баллом с учетом влияния генотипа вируса представлена в табл. 5.

Суммарный балл, учитывающий генотип вируса, коррелировал с темпами прогрессирования фиброза в печени ( $r=0,39$ ,  $p < 0,001$ ).

Далее также по суммарному баллу больные были разделены по квартилям на три группы:

- больные с суммарным баллом «2 и ниже» (I;  $n=20$ );
- больные с суммарным баллом от «3 до 5» (II;  $n=39$ );
- больные с суммарным баллом «6 и более» (III;  $n=35$ ).

В группах I, II, III вместе с увеличением суммарного балла отмечалось нарастание скорости фиброза ( $p=0,0005$ ). Однако методом множественных ранговых сравнений статистически значимые различия были доказаны только для I и III групп ( $p < 0,001$ ), группы I и II, II и III между собой не отличались.

### Нежелательные явления

Учет нежелательных явлений не проводился.

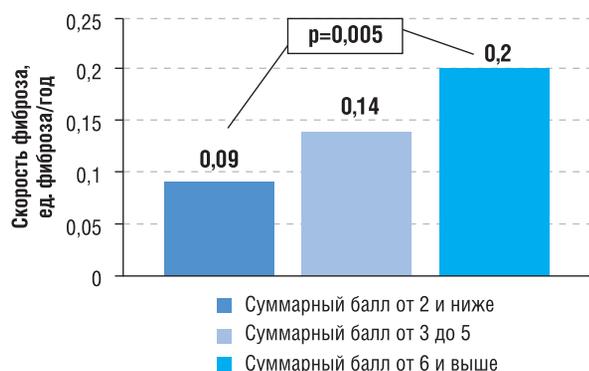


Рис. 5. Скорость фиброза у больных с суммарных баллом от 2 и ниже (группа I), от 3 до 5 (группа II), от 6 и более (группа III) с учетом влияния генотипа вируса

### Обсуждение

В литературе нет единого мнения о влиянии полиморфизма исследуемых нами генов на течение ХГС. Кроме того, результаты многих работ нередко противоречат друг другу, что связано с недостаточным количеством исследований, изучающих одни и те же полиморфизмы, а также с обследованием различных популяций. Выводы многих наблюдений сложно сопоставимы друг с другом в связи с различным способом деления больных на группы: так, в одних работах авторы сравнивают между собой инфицированных и здоровых пациентов или группы с ХГС и ЦП, в других — с разными стадиями фиброза, а в третьих делят пациентов на группы с быстрым и медленным прогрессированием фиброза. Единого взгляда среди ученых на формирование групп сравнения не выработано, поскольку гены на разных стадиях болезни могут иметь непохожее проявление (инфицирование, переход в хроническую форму, прогрессирование фиброза печени или трансформация в цирроз, развитие осложнений и гепатоцеллюлярной карциномы). Особую сложность представляет изучение влияния на течение ХГС редко встречаемых мутаций, таких как *TNF α -238 G/A*, *HFE C282Y*, *TGFβ +915 G/C*, *FII 20210 G/A*, *FV 1691G/A*, что требует включения в исследования большого количества пациентов. Клиническая значимость комбинаций аллельных вариантов генов у больных ХГС на течение и прогноз болезни изучается лишь в немногих работах, еще в меньшем количестве исследований учитывается вклад клинических данных.

В нашем исследовании особый интерес представляют цитокины, участвующие в таких процессах, как воспаление, регенерация гепатоцитов и фиброгенез, типичными представителями которых являются *IL 1b*, *TNF α*, *IL 6*, *IL 10* и *TGF b1*. Поскольку считается, что до 50% индивидуальных различий в продукции цитокинов обусловлено наличием полиморфизма, закономерно было ожидать, что полиморфизмы, связанные с изменением продукции названных цитокинов, могут модифицировать естественное течение ХГС и служить маркером заболевания и его прогноза [2–5]. Предыдущие исследования нашей группы показали, что аллели генов *IL 1b -511 T*, *IL 6 -174 C*, *TGF b1 +915 C* ассоциированы с прогрессирующим вариантом течения ХГС и являются «профибротическими», а генотипы генов *IL 1b -511 CC* и *IL 6 -174 GG* связаны с медленным развитием фиброза [2]. Однако в этой работе деление больных на группы проводилось по другой методике: первую группу составили больные, у которых при давности инфицирования не менее 10 лет по данным биопсии печени была выявлена I стадия фиброза (F1 по Knodell), а вторую группу — пациенты с выраженным фиброзом или ЦП независимо от давности инфицирования.

В настоящем исследовании при делении больных на группы с быстрым и медленным фиброзом, согласно

методике, предложенной Т. Roynard и соавт. [1], нами не выявлено статистически значимого влияния полиморфных генетических маркеров генов цитокинов на темпы прогрессирования фиброза в печени больных ХГС. Однако имелась тенденция к статистической значимости при изучении полиморфизма гена *TGF b1 +915 G/C*: так, гетерозиготы GC чаще встречались в группе больных с быстро прогрессирующей болезнью печени (21,9 против 11,1%;  $p = 0,144$ ), в связи с чем данный маркер был в последующем включен в построение генетической модели. Мутантные гомозиготы CC в нашей выборке пациентов не выявлялись. Возможно, при увеличении количества пациентов различия были бы более выраженными.

Наши данные относительно полиморфизма гена *TNF α -238 G/A* согласуются с целым рядом других исследований, показавших отсутствие его влияния на течение ХГС [3, 4, 6, 7]. Однако в работе L.J. Yee и соавт. было показано, что аллель гена *TNF α -238A* встречался в 2 раза чаще у больных с циррозом печени, чем у больных с менее выраженным фиброзом [8]. В более поздней работе итальянских авторов было доказано, что генотипы полиморфизма генов *TNF α -238 G/A* и *-308 G/A*, ассоциированные с повышенной продукцией этого цитокина, достоверно чаще встречаются у больных с более выраженным фиброзом [9].

658

Влияние полиморфизма гена *IL 1b* непосредственно на скорость фиброза у больных ХГС не изучалось, поэтому сопоставить наши данные с другими исследованиями невозможно. Считается, что *IL 1b* ингибирует эффекты интерферона-альфа [10], вследствие чего предполагается, что высокий уровень *IL 1b* ассоциирован с быстрым прогрессированием фиброза, а также с плохим ответом на интерферонотерапию [11]. В исследовании M.J. Vahr и соавт. достоверно чаще у больных ХГС и циррозом печени в исходе ХГС по сравнению со здоровыми людьми выявлялся генотип гена *IL 1b -511 TT* [12].

В литературе широко обсуждается ассоциация различных полиморфизмов гена *IL 10* с особенностями течения ХГС, учитывая его важную роль в воспалении, фибро- и туморогенезе [13]. В наиболее крупном многоцентровом исследовании S. Knapp и соавт. было показано, что -1082 AA генотип гена *IL 10* чаще выявлялся у больных с быстрым развитием ЦП (до 20 лет) по сравнению с больными с медленно прогрессирующим ЦП (более чем через 30 лет) [14]. H. Namada и соавт. установили, что GC-гаплотип, ассоциированный с высокой продукцией *IL 10*, достоверно чаще выявлялся у больных ХГС с медленным прогрессированием фиброза, чем у больных с быстрым [5]. Однако эти данные не были подтверждены ни в нашем исследовании, ни в работе P.K. Constantini и соавт. [15].

При анализе данных литературы нам не удалось найти работ по изучению влияния полиморфизма гена *IL 6* на прогрессирование фиброза печени и сопоставить их с нашими данными. Но в работе S. Vargret и соавт. установили, что -174 CC генотип гена *IL 6* достоверно чаще выявлялся у больных со спонтанным клиренсом вируса по сравнению с больными, у которых произошла хронизация HCV-инфекции [7].

Одним из наиболее изученных профиброгенных факторов является *TGF b1*. Считается, что при воспалении в ткани печени *TGF b1* активизирует фиброгенез посредством стимуляции синтеза и ингибирования деградации внеклеточного матрикса. Исследования влияния полиморфизма гена *TGF b1* весьма противоречивы в связи с популяционными различиями. В исследовании E.E. Powell и соавт. установлено, что Arg/Arg-гомозиготы по 25-му кодону

гена *TGF b1* статистически достоверно чаще имели более тяжелую стадию фиброза по сравнению с 25 Arg/Pro или 25 Pro/Pro-генотипом [3]. В работе немецких исследователей также установлена связь между полиморфизмом гена *TGF b1* и темпами прогрессирования фиброза. J. Gewaltig и соавт. показали, что носительство большими ХГС вариантного аллеля полиморфизма гена *TGF b1 Arg 25 Pro* приводит почти к трехкратному увеличению скорости прогрессирования фиброза печени [16]. C.G. Tag и соавт. показали, что аллель Pro в 25 кодоне гена *TGF β* в два раза чаще встречается у пациентов с ХГС и более продвинутой стадией фиброза (F3–4 по METAVIR) по сравнению с пациентами с фиброзом F0–2 по METAVIR [17]. В более позднем исследовании японских ученых, обследовавших 206 больных ХГС и 101 человека из контрольной группы, авторами не было выявлено носительства +915 G/C полиморфизма гена *TGF b1* ни в одном случае, что свидетельствует о практически полном отсутствии данного генетического полиморфизма в японской популяции [18]. H. Wang и соавт. установили, что полиморфизм гена *TGF b1 +915 G/C* является фактором риска прогрессирования фиброза у больных европейского происхождения, но не азиатского [19]. Среди наших больных мутации гена *TGF b1 +915 G/C* также встречались редко, и выявить их влияния на прогрессирование фиброза в печени нам так и не удалось.

Известно, что у больных ХГС очень часто наблюдаются биохимические и морфологические признаки перегрузки железом [20], чему дополнительно способствует избыточное всасывание железа в желудочно-кишечном тракте при наличии мутации в гене гемохроматоза (*HFE*). В литературе нет единого мнения в отношении влияния полиморфизма гена *HFE* на течение и прогноз ХГС. A. Erhardt и соавт., обследовав 401 пациента с ХГС, установили, что как полиморфизм C282Y, так и H63D являются независимыми факторами прогрессирования фиброза печени у больных ХГС [21]. В работе A. Geier и соавт. на 166 больных ХГС показано, что более выраженный фиброз и высокая активность печеночного процесса у гетерозигот по гену гемохроматоза встречались в 4,5 раз чаще, чем у больных ХГС с диким вариантом гена *HFE* [22], что находит подтверждение и в работе чешских авторов [23]. В отличие от вышеказанного, в работе французских и ряда других авторов не найдено ассоциации ни одного из исследованных полиморфизмов гена *HFE* (C282Y и H63D) с развитием ЦП [24, 25], что согласуется с нашими результатами.

В патогенезе фиброза печени хорошо известно участие цитокинов с вазоактивными свойствами. Считается, что вазодилаторы (NO, релаксин) проявляют антифибротический эффект, тогда как вазоконстрикторы (норадреналин, ангиотензин II) — профиброгенный. Изучение полиморфизма гена ангиотензиногена в -6-м положении с заменой G на A у больных ХГС показало, что носители -6 AA генотипа чаще имеют более тяжелую стадию фиброза, чем больные с -6 GA- и -6 GG-генотипами [3]. В более позднем и крупном исследовании E.H. Forrest и соавт. с изучением того же полиморфизма гена ангиотензиногена, а также полиморфизма гена *ATRI 1166 A/C* не было установлено взаимосвязей со стадиями фиброза [26]. В нашем же исследовании носительство аллелей M и A гена *AGT* по локусам 235 M/T и G-6A, соответственно, служило неблагоприятным фактором прогрессирования скорости фиброза, генотип MM по локусу 235 M/T в данном случае обладал протективными свойствами, а генотипы GA и AA по локусу G-6A — профиброгенными. Можно предположить, что выявление влияния полиморфиз-

ма гена *AGT* на скорость фиброза в нашей работе обусловлено именно учетом длительности инфицирования при формировании групп больных, тогда как в работах предыдущих авторов оценивалась только стадия фиброза. Нами так же, как другими исследователями, не найдено корреляции между полиморфизмом гена *ATRI 1166 A/C* и прогрессированием болезни печени.

Важную роль в развитии синусоидальной эндотелиальной дисфункции играет внутривнутрипеченочный окислительный стресс, реализованный через фермент NADPH-оксидазу. Субъединица p22-phox, кодируемая геном *CYBA*, необходима для ферментативной активности NADPH-оксидазы, а генетически обусловленное изменение активности или экспрессии этого белка могут влиять на течение многих заболеваний, связанных с окислительным стрессом. В доступной нам литературе мы не встретили работ, посвященных роли полиморфизма гена *CYBA C242T* на течение и прогноз хронических заболеваний печени.

В нашем исследовании показано, что генотип ТТ гена *CYBA 242 C/T* является «профиброгенным». Механизм, лежащий в основе выявленной ассоциации носительства ТТ-генотипа с быстрым прогрессированием фиброза, у больных ХГС неясен. Он может объясняться влиянием на апоптоз или экспрессию генов под влиянием реактивных форм кислорода, либо сцеплением данного полиморфизма с еще не выявленным фактором, но маловероятно, что снижение ферментативной активности NADPH-оксидазы ускоряло развитие фиброза печени и ремоделирование внутривнутрипеченочного сосудистого русла.

Синусоидальная эндотелиальная дисфункция характеризуется снижением биодоступности NO в паренхиме печени, что может быть связано с полиморфизмом гена *NOS3*. Мы также не встретили в литературе работ по исследованию ассоциаций данного полиморфизма с течением и прогнозом ХГС. Нами не обнаружено отличий в распределении аллелей и генотипов полиморфизма *NOS3* в группах больных ХГС с быстрым и медленным прогрессированием фиброза.

Гипергомоцистеинемия — важный независимый фактор эндотелиальной дисфункции, приводящей к развитию тромбов, — происходит при нарушении фермента MTHFR. Полиморфизм *S677T* гена *MTHFR* опосредует образование менее активного варианта фермента и недостаточной утилизации гомоцистеина из кровотока. В исследовании N. Maharshak и соавт. носительство мутаций *MTHFR 677 C/T* и *FV 1691G/A* в данном исследовании не оказывало влияния на скорость процессов фиброобразования в печени [27]. L.E. Adinolfi и соавт. показали, что гипергомоцистеинемия ассоциирована с ТТ-генотипом *MTHFR 677 C/T* ( $r=0,367$ ;  $p=0,001$ ), а стеатоз коррелировал с полиморфизмом *MTHFR 677 C/T*, гомоцистеинемией и фиброзом [28]. В нашем исследовании распределение аллелей и генотипов полиморфизма *677 C/T* гена *MTHFR* в группах больных ХГС с быстрым и медленным прогрессированием фиброза печени не различалось между собой.

Обычно заболевания печени ассоциируют с гипокоагуляцией. Вместе с тем на стадии цирроза печени описаны и гиперкоагуляционные состояния с развитием тромбозов различной локализации. Влияние полиморфизма генов гемостаза на течение ХГС, по данным литературы, также неопределенно. M. Wright и соавт. выявили, что скорость нарастания фиброза значительно выше у пациентов с мутацией Лейдена (*FII 20210 G/A*;  $p=0,004$ ) [29], а больные, гетерозиготные по гену *FV 1691G/A*, быстрее развивают цирроз печени (в сроки менее 30 лет). Похожие

данные были получены и на другой выборке пациентов в работе A. Pouchol-Robert и соавт. [30], в то время как в исследовании C. Goulding и соавт., включавшем только женщин, вышесказанное не подтвердилось [31]. В исследовании K. Dik и соавт. показано, что мутации по гену *FXIII 103 G/T* увеличивали скорость развития фиброза в печени у больных ХГС в 4,7 раза ( $p=0,01$ ) [32]. Кроме того, исследователями было показано, что при сочетании двух мутаций генов (*PAI-675 5G/4G* и *FXIII 103 G/T*) темп прогрессирования фиброза увеличивался еще больше — в 5 раз ( $p=0,02$ ). Полиморфизм других генов (*FV 1691G/A*, *FII 20210 G/A*) системы свертывания не оказывал статистически значимого влияния на стадию фиброза в печени и скорость его развития, что согласуется с нашими данными. Однако мутации данных генов практически не встречались в нашей группе больных. Нами отмечено, что в группе с быстрым прогрессированием фиброза чаще встречался 4G аллель гена *PAI -675 5G/4G* и генотип ТТ гена *FXIII 103 G/T*, в связи с чем сделан вывод об их «профибротический» роли, и они были включены в разрабатываемую генетическую модель. Однако различия имели только тенденцию к статистической значимости.

T. Asselah и соавт. при изучении экспрессии 240 генов в ткани печени больных гепатитом С выявили повышение количества мРНК *ITGA2* в биопсийном материале у пациентов с более продвинутыми стадиями фиброза, что свидетельствует об активации системы интегринов ( $p=0,00024$ ) [33]. Полиморфизм генов тромбоцитарных рецепторов в данной работе не исследован. При оценке влияния полиморфизма генов тромбоцитарных рецепторов на скорость фиброза мы выявили «протективное» влияние мутантной гомозиготы ТТ гена *ITGA2 807 C/T*. В доступной нам литературе нет сведений о роли данного полиморфизма в течении и развитии хронических заболеваний печени. Данный генетический маркер изучен в кардиологии и ассоциирован с предрасположенностью к ишемической болезни сердца и инфаркту миокарда [34]. Возможно, более высокая концентрация рецепторов тромбоцитов, обусловленная этой мутацией, способствует более быстрому ремоделированию ткани печени и «рассасыванию» микротромбов.

Совершенствование технологии проведения ДНК-диагностики привело к переходу от исследования одного полиморфного маркера к десятку или даже сотне в разных генах. Изучение комбинации аллелей, ассоциированных с прогрессированием фиброза печени, значительно повысило надежность и достоверность результатов исследований. Одной из первых попыток изучения комбинации полиморфизмов, имеющих однонаправленный эффект в патогенезе ХГС, была работа E.E. Powell и соавт. [3]. В работе J. Armendariz-Bogunda и соавт. показано, что комбинация полиморфизмов генов *TGFb +915 G/C*, *PAI -675 5G/4G*, *AGT G-6A* увеличивает риск продвинутого фиброза у больных с хроническим гепатитом С [35].

Еще более убедительные данные по целесообразности изучения комбинации полиморфизма нескольких генов получены в работе M.M. Richardson и соавт. [36]. Исследователи, изучив 8 полиморфизмов, установили, что с прогрессированием фиброза были ассоциированы 6, и показали, что с увеличением числа профибротических аллелей у больных ХГС вероятность развития ЦП значительно возрастает.

В работе японских авторов было проанализировано 269 полиморфизмов в 103 генах-кандидатах. Ученые обнаружили, что с самопроизвольным клиренсом HCV-инфекции были ассоциированы 24 полиморфизма в 20 генах, а с постоянно нормальным уровнем АЛТ — 27 по-

лиморфизмов в 15 генах (в том числе полиморфизм гена *IL 1b -511 C/T*) [37].

В более поздней работе американских авторов, проанализировавших 20 573 полиморфизма, было отобрано 39, носительство которых с высокой степенью достоверности предсказывало наличие у больного выраженного фиброза/цирроза печени [38].

В нашей работе мы так же, изучив генетический профиль больных с ХГС по 21 полиморфизму, выявили 7 основных полиморфных маркеров (*AGT G-6T* и *AGT 235 M/T*, *915 G/C TGFb*, *CYBA 242 C/T*, *FXIII 103 G/T*, *ITGA2 807 C/T*, *PAI -675 5G/4G*), связанных с прогрессированием фиброза в печени. В дальнейшем с помощью специальной системы баллов нами была построена генетическая модель, которая может быть использована для определения прогноза ХГС. Включение в модель специального балла для генотипа вируса не привело к нивелированию эффекта генетических факторов, что согласуется с данными литературы [39].

### Заключение

Генетический полиморфизм генов цитокинов, эндотелиальной дисфункции, ренин-ангиотензиновой системы и системы гемостаза является фактором, определяющим индивидуальные особенности прогрессирования фиброза печени у больных ХГС. Установлены аллели, ассоцииро-

ванные с прогрессирующим типом течения ХГС — «профибротические» (*AGT -6A* и *AGT 235T*, *TGF b 915 C*, *CYBA 242T*, *FXIII 103T*, *PAI -6754G*), и, наоборот, «протективные», ассоциированные с медленным прогрессированием фиброза (*ITGA2 807T*). Введен интегральный показатель, характеризующий разность между суммарным накоплением «профибротических» и «протективных» аллелей в комбинации геномных маркеров, выявлена зависимость скорости фиброза от данного интегрального показателя. На основе генетического профиля пациентов с учетом генотипа вируса построена балльная шкала для прогнозирования скорости фиброза. Таким образом, используя предложенную математическую модель, определение генетического профиля больных ХГС и генотипа вируса позволит прогнозировать течение заболевания, определять сроки медицинского вмешательства и начала терапии.

### Источник финансирования

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-50-00029).

### Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

### ЛИТЕРАТУРА

- Poynard T, Ratziv U, Benmanov Y, Di Martino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):47–55. doi: 10.1055/s-2000-9258
- Самоходская ЛМ, Игнатова ТМ, Абдуллаев СМ, Краснова ТН, Некрасова ТП, Мухин НА, Ткачук ВА. Прогностическое значение комбинации аллельных вариантов генов цитокинов и гемохроматоза у больных хроническим гепатитом С. *РЖГК.* 2007;17(2):50–56.
- Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2000;31(4):828–833. doi: 10.1053/he.2000.6253.
- Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *J Hepatol.*36(2):271–277. doi: 10.1016/S0168-8278(01)00243-4.
- Hamada H, Yatsushashi H, Yano K, Arisawa K, Nakao K, Yano M. Interleukin-10 promoter polymorphisms and liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C in Japan. *J Hepatol.* 2003;39(3):457–8. doi: 10.1016/S0168-8278(03)00246-0
- Rosen HR, McHutchison JG, Conrad AJ, Lentz JJ, Marousek G, Rose SL, et al. Tumor necrosis factor genetic polymorphisms and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(3):714–720. doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.05552.x
- Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol.* 2003;71(2):212–218. doi: 10.1002/jmv.10472.
- Yee LJ, Tang J, Herrera J, Kaslow RA, van Leeuwen DJ. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun.* 2000;1(6):386–390. doi: 10.1038/sj.gene.6363696.
- Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T, et al. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection--association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2005;42(4):505–510. doi: 10.1016/j.jhep.2004.11.026.
- Takahara T, Fukuyama Y, Saito S, Ogino T, Miyajima N, Kohase M. IL-1, EGF, and HGF suppress the antiviral activity of interferon in primary monkey hepatic parenchymal cells. *Jpn J Infect Dis.* 1999;52(2):45–8.
- Tian Z, Shen X, Feng H, Gao B. IL-1 beta attenuates IFN-alpha beta-induced antiviral activity and STAT1 activation in the liver: involvement of proteasome-dependent pathway. *J Immunol.* 2000;165(7):3959–3965. doi: 10.4049/jimmunol.165.7.3959.
- Bahr MJ, El Menuawy M, Boeker KHW, Musholt PB, Manns MP, Lichtinghagen R. Cytokine gene polymorphisms and the susceptibility to liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int.* 2003;23(6):420–425. doi: 10.1111/j.1478-3231.2003.00873.x.
- Hennig BJ, Frodsham AJ, Hellier S, Knapp S, Yee LJ, Wright M, et al. Influence of IL-10RA and IL-22 polymorphisms on outcome of hepatitis C virus infection. *Liver Int.* 2007;27(8):1134–1143. doi: 10.1111/j.1478-3231.2007.01518.x.
- Knapp S, Hennig BJ, Frodsham AJ, Zhang L, Hellier S, Wright M, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Immunogenetics.* 2003;55(6):362–369. doi: 10.1007/s00251-003-0594-5.
- Patricia KC, Marta W-S, Michael C, Anna B-K, Ian GM, Mathew EC, et al. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. *Liver.* 2002;22(5):404–412. doi: 10.1034/j.1600-0676.2002.01553.x.
- Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, Biesterfeld S, Gressner AM. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin Chim Acta.* 2002;316(1–2):83–94. doi: 10.1016/s0009-8981(01)00738-0.
- Tag CG, Mengsteab S, Hellerbrand C, Lammert F, Gressner AM, Weiskirchen R. Analysis of the transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) codon 25 gene polymorphism by LightCycler-analysis in patients with chronic hepatitis C infection. *Cytokine.* 2003;24(5):173–181. doi: 10.1016/j.cyto.2003.08.007.
- Suzuki S, Tanaka Y, Orito E, Sugauchi F, Hasegawa I, Sakurai M, et al. Transforming growth factor-beta-1 genetic polymorphism in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18(10):1139–1143. doi: 10.1046/j.1440-1746.2003.03161.x.

19. Wang H. Transforming growth factor- $\beta$ 1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol*. 2005;11(13):1929. doi: 10.3748/wjg.v11.i13.1929.
20. Alberti A, Vario A, Ferrari A, Pistic R. Review article: chronic hepatitis C - natural history and cofactors. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22(s2):74–78. doi: 10.1111/j.1365-2036.2005.02602.x.
21. Erhardt A, Maschner-Olberg A, Mellenthin C, Kappert G, Adams O, Donner A, et al. HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver fibrosis and cirrhosis. *J Hepatol*. 2003;38(3):335–342. doi: 10.1016/s0168-8278(02)00415-4.
22. Geier A, Reugels M, Weiskirchen R, Wasmuth HE, Dietrich CG, Siewert E, et al. Common heterozygous hemochromatosis gene mutations are risk factors for inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int*. 2004;24(4):285–294. doi: 10.1111/j.1478-3231.2004.0928.x.
23. Pácal L, Husa P, Znojil V, Kan ková Ki. HFE C282Y gene variant is a risk factor for the progression to decompensated liver disease in chronic viral hepatitis C subjects in the Czech population. *Hepatol Res*. 2007;37(9):740–747. doi: 10.1111/j.1872-034X.2007.00118.x.
24. Lebray P, Zylberberg H, Hue S, Poulet B, Carnot F, Martin S, et al. Influence of HFE gene polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2004;11(2):175–182. doi: 10.1046/j.1365-2893.2003.00488.x.
25. Dostalíková-Cimbuřová M, Kratka K, Stránský J, Putová I, Cieslarová B, Horák J. Iron Overload and HFE Gene Mutations in Czech Patients with Chronic Liver Diseases. *Dis Markers*. 2012;32(1):65–72. doi: 10.1155/2012/790464.
26. Forrest EH, Thorburn D, Spence E, Oien KA, Inglis G, Smith CA, et al. Polymorphisms of the renin-angiotensin system and the severity of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat*. 2005;12(5):519–524. doi: 10.1111/j.1365-2893.2005.00630.x.
27. Maharshak N. Increased fibrosis progression rates in hepatitis C patients carrying the prothrombin G20210A mutation. *World J Gastroenterol*. 2011;17(45):5007. doi: 10.3748/wjg.v17.i45.5007.
28. Adinolfi LE, Ingrassio D, Cesaro G, Cimmino A, D'Anto M, Capasso R, et al. Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism promote steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*. 2005;41(5):995–1003. doi: 10.1002/hep.20664.
29. Wright M. Factor V Leiden polymorphism and the rate of fibrosis development in chronic hepatitis C virus infection. *Gut*. 2003;52(8):1206–1210. doi: 10.1136/gut.52.8.1206.
30. Poujol-Robert A, Boëlle P-Y, Poupon R, Robert A. Factor V Leiden as a risk factor for cirrhosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2004;39(4):1174–1175. doi: 10.1002/hep.20166.
31. Goulding C, O'Brien C, Egan H, Hegarty JE, McDonald G, O'Farrelly C, et al. The impact of inherited prothrombotic risk factors on individuals chronically infected with hepatitis C virus from a single source. *J Viral Hepat*. 2007;14(4):255–259. doi: 10.1111/j.1365-2893.2006.00790.x.
32. Dik K, de Bruijne J, Takkenberg RB, Roelofs JJ, Tempelmanns MJ, Dijkgraaf MGW, et al. Factor XIII Val34Leu mutation accelerates the development of fibrosis in patients with chronic hepatitis B and C. *Hepatology Research*. 2012;42(7):668–676. doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00963.x.
33. Asselah T, Bièche I, Laurendeau I, Paradis V, Vidaud D, Degott C, et al. Liver Gene Expression Signature of Mild Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. 2005;129(6):2064–2075. doi: 10.1053/j.gastro.2005.09.010.
34. Wu G, Xi Y, Yao L, Su L, Yan Y, Li M, et al. Genetic polymorphism of ITGA2C807T can increase the risk of ischemic stroke. *Int J Neurosci*. 2014;124(11):841–851. doi: 10.3109/00207454.2013.879718.
35. Armendáriz-Borunda J, Rincón AR, Muñoz-Valle JF, Bueno-Topete M, Oregón-Romero E, Islas-Carbajal MC, et al. Fibrogenic Polymorphisms (TGF- $\beta$ , PAI-1, AT) in Mexican Patients With Established Liver Fibrosis. Potential Correlation With Pirfenidone Treatment. *J Investig Med*. 2008;56(7):944–953. doi: 10.2311/JIM.0b013e3181891512.
36. Richardson MM. A combination of genetic polymorphisms increases the risk of progressive disease in chronic hepatitis C. *J Med Genet*. 2005;42(7):e45–e45. doi: 10.1136/jmg.2005.032557.
37. Huang H, Shiffman ML, Cheung RC, Layden TJ, Friedman S, Abar OT, et al. Identification of Two Gene Variants Associated With Risk of Advanced Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1679–1687. doi: 10.1053/j.gastro.2006.02.032.
38. Hissar SS, Kumar M, Tyagi P, Goyal A, Pv S, Agarwal S, et al. Natural history of hepatic fibrosis progression in chronic hepatitis C virus infection in India. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(4):581–587. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05649.x.
39. Bochud P-Y, Cai T, Overbeck K, Bochud M, Dufour J-F, Mühlhaupt B, et al. Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2009;51(4):655–666. doi: 10.1016/j.jhep.2009.05.016.

### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Самоходская Лариса Михайловна**, кандидат медицинских наук, доцент факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5, e-mail: slm@fbm.msu.ru

**Старостина Екатерина Евгеньевна**, аспирант факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский проспект, д. 31, корп. 5, e-mail: starostinaee@gmail.com

**Яровая Елена Борисовна**, доктор физико-математических наук, доцент механико-математического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5, e-mail: yarovaya@mech.math.msu.ru

**Краснова Татьяна Николаевна**, кандидат медицинских наук, доцент факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, доцент кафедры внутренних и профессиональных болезней и пульмонологии Медико-профилактического факультета ГБОУ ВПО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова»

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5, e-mail: krasnovamgu@yandex.ru

**Мухин Николай Алексеевич**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой внутренних болезней факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, директор клиники нефрологии, внутренних и профессиональных болезней имени Е.М. Тареева ГБОУ ВПО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова»

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5, e-mail: moukhin-nephro@yandex.ru

**Ткачук Всеволод Арсеньевич**, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, декан факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5, e-mail: vat@fbm.msu.ru

**Садовничий Виктор Антонович**, доктор физико-математических наук, профессор, академик РАН, ректор МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп. 5, e-mail: info@rector.msu.ru