

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д. И.
Ивановского»

Министерства здравоохранения Российской Федерации
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Факультет фундаментальной медицины

На правах рукописи

КОЛОТВИН АНДРЕЙ ВАСИЛЬЕВИЧ

**Прогностическая значимость генетического полиморфизма
патогена и хозяина для оценки эффективности терапии и
развития фиброза печени при хроническом гепатите С**

Молекулярная биология – 03.01.03

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.б.н. Николаева Л. И.,

к.м.н., доцент Самоходская Л.М.

Москва 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	5
Введение.....	7
Глава 1. Характеристика вируса гепатита С	
1. 1. Вирус гепатита С	16
1. 1. 1. Строение вириона.....	16
1. 1. 2. Организация вирусного генома.....	25
1. 1. 3. Генетическая рекомбинация ВГС.....	30
1. 1. 4. Особенности течения гепатита С.....	31
Глава 2. Характеристика значимых при гепатите генов цитокинов, гена гемохроматоза и ферментов, связанных с эндотелиальной дисфункцией	
2. 1. Интерлейкин – 1 бета (<i>IL-1B</i>).....	34
2. 2. Интерлейкин – 6 (<i>IL-6</i>).....	35
2. 3. Интерлейкин – 10 (<i>IL-10</i>).....	37
2. 4. Интерлейкин – 28Б (<i>IL-28B</i>).....	38
2. 5. Трансформирующий фактор роста бета 1 (<i>TGF-1B</i>).....	43
2. 6. Фактор некроза опухоли альфа (<i>TNF-A</i>).....	45
2. 7. Эндотелиальная NO – синтаза (<i>eNOS</i>).....	48
2. 8. р22phox субъединица NADPH – оксидазы.....	52
2. 9. Ген гемохроматоза (<i>HFE</i>).....	55
2. 10. Заключение по литературному обзору.....	58
Глава 3. Материалы и методы	
3. 1. Пациенты.....	59
3. 2. Вирусологические методы.....	63
3. 3. Молекулярно – генетические методы.....	70
3. 4. Статистическая обработка.....	83
Список реактивов и тест систем используемых в работе.....	85

Глава 4. Результаты собственных исследований

4. 1. Частота встречаемости генотипов и субтипов ВГС в исследуемой когорте пациентов.....	87
4. 2. Частота выявления отдельных аллельных пар по полиморфным локусам анализируемых генов в исследуемой когорте.....	89
4. 2. 1. Частота выявления отдельных аллельных пар в полиморфных локусах генов цитокинов.....	89
4. 2. 2. Частота выявления отдельных аллельных пар в полиморфных локусах генов, связанных с сосудистой дисфункцией.....	90
4. 2. 3. Частота выявления отдельных аллельных пар в полиморфных локусах гена гемохроматоза.....	91
4. 3. Анализ влияния факторов вируса на эффективность ПВТ.....	91
4. 3. 1. Анализ выявления аллельных вариаций генов цитокинов и эффективность противовирусной терапии	93
4. 3. 2. Изучение влияния аллельных вариаций генов, связанных с эндотелиальной дисфункцией, на эффективность противовирусной терапии.....	96
4. 3. 3. Исследование влияния аллельных вариаций гена гемохроматоза на эффективность противовирусной терапии.....	97
4. 4. Влияние генетических факторов вируса на развитие фиброза печени.....	99
4. 4. 1. Анализ влияния полиморфизма генов цитокинов на скорость развития фиброза печени	99
4. 4. 2. Изучение влияния полиморфизма генов, связанных с эндотелиальной дисфункцией на скорость развития фиброза печени...	104

4. 4. 3. Изучение влияния полиморфизма гена гемахроматоза на скорость развития фиброза печени.....	105
4. 5. Анализ сочетанного влияния факторов хозяина и факторов вируса на скорость развития фиброза печени и ответ на противовирусную терапию.....	107
4. 5. 1. Анализ роли полиморфизма исследуемых генов пациентов и факторов вируса в достижении устойчивого вирусологического ответа при терапии.....	107
4. 5. 2. Анализ сочетанного влияния факторов хозяина и факторов вируса на скорость развития фиброза печени.....	113
Глава 5. Обсуждение результатов	
5. 1. Роль факторов вируса на скорость развития фиброза печени и ответ на противовирусную терапию	124
5. 2. Роль факторов хозяина на скорость развития фиброза печени и ответ на противовирусную терапию	129
5. 2. 1. Влияние факторов хозяина на эффективность терапии.....	129
5. 2. 2. Влияние факторов пациента на скорость развития фиброза печени.....	132
5. 3. Роль сочетанного влияния факторов вируса и хозяина на скорость развития фиброза печени и ответ на противовирусную терапию	137
Выводы.....	140
Список литературы.....	142

Список сокращений

УВО – устойчивый вирусологический ответ

ХГС – хронический гепатит С

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

ЭПР - эндоплазматический ретикулум

eNOS - эндотелиальная NO-синтаза

GM-CSF–гранулоцитарно-макрофагальный
колониестимулирующий фактор, granulocytic-macrophage colony-
stimulating factor,

HFE – ген гемохроматоза

HVR – гипервариабельная зона

IL – интерлейкин

INF α – интерферон-альфа

INF- γ – интерферон-гамма

INF- λ – интерферон-ламбда

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

ISGs – интерферон-зависимые гены, interferon stimulated genes

MHC – главный комплекс гистосовместимости, major
histocompatibility complex

nNOS - нейрональная NO-синтаза

NOS – NO-синтаза

NOX – НАДФН оксидаза, NADPH oxidase

SNP – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism)

TGF- β 1 – трансформирующий фактор роста β 1, Transforming growth factor beta

Th – Т-хелперные лимфоциты

TNF- α – фактор некроза опухоли альфа, Tumor necrosis factor-alpha

АлАТ - аланинаминотрансфераза

АПК - антигенпрезентирующая клетка

АФК - активные формы кислорода

ВГС – вирусный гепатит С

ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома

ИБС – ишемическая болезнь сердца

НРЛ – негативный результат лечения

НТО – нетранслируемая область

ОГС – острый гепатит С

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой

ПВТ – противовирусная терапия

СПЖ – синдром перегрузки железом

Введение.

Вирусный гепатит С (ГС) представляет серьезную проблему для здравоохранения нашей страны в связи с его распространенностью в разных возрастных группах, отсутствием вакцинопрофилактики и высоким риском развития хронических заболеваний печени. В мире ГС инфицировано около 3% населения [www.CDC.com, 2013]. Ежегодно около 3-4 миллионов людей инфицируется вирусом гепатита С (ВГС) и почти 350 тысяч умирает от хронического гепатита С (ХГС) и его осложнений [WHO, 2011]. В нашей стране доля инфицированных вирусом людей достигает почти 3%, прогнозируется дальнейший рост обнаружения хронически инфицированных лиц до 2015-2020 годов и увеличение смертности от осложнений ХГС [Гайдаренко А. Д., 2009; Мукомолов С.Л. и др. 2012; Hanafiah K.M. et al., 2013].

На территории Российской Федерации, как и в большинстве стран, наблюдается неблагоприятная эпидемиологическая ситуация по вирусному гепатиту С [Мукомолов С. Л. и др., 2012]. Среди ВГС-инфицированных людей преобладают пациенты с хронической формой инфекции. Для ХГС характерно прогрессирующее течение, которое через несколько десятков лет может завершиться циррозом печени (до 30%) и первичной гепатоклеточной карциномы (от 5 до 15%) [Alberti A. et al., 2004; Alter M.J. et al., 2007; Perz J.F. et al., 2006].

Несмотря на интенсивное изучение ВГС-инфекции, до сих пор установлены не все факторы вируса и пациента, влияющие на скорость формирования фиброза печени и эффективность противовирусной терапии (ПВТ). Благодаря проекту «Геном человека», была выявлена важная роль однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), которые влияют на формирование иммунного ответа, интенсивность неспецифических иммунных реакций и формируют предрасположенность к различным заболеваниям. Эти данные

позволяют по новому оценить роль генетического полиморфизма как хозяина, так и патогена [Lander E.S. et al., 2001].

Геном ВГС имеет генетическую неоднородность, то есть полиморфен, что привело к необходимости классифицировать вирус на генотипы и субтипы [Simmonds P. et al., 1996; 2005; Smith D. B. et al., 2014]. В каждом инфицированном пациенте ВГС существует в виде набора генетически близких вариантов, называемых квазивариантами. На такое генетическое разнообразие вируса накладывается ОНП генов инфицированных людей, что приводит к разной скорости формирования фиброза печени и к различной чувствительности к ПВТ.

Состояние научной разработанности проблемы.

Несмотря на значительное число исследований, посвященных поиску взаимосвязи между ОНП генов-кандидатов и темпами развития фиброза печени и ответом на ПВТ, достоверные данные получены для небольшого числа генов. В ряде исследований приводятся противоречивые результаты, что, вероятно, связано с разными критериями включения больных в сравниваемые группы, разными схемами лечения и этнической неоднородностью группы. Кроме этого, надо отметить малочисленность отечественных работ по изучению ОНП генов больных ХГС, имеющих восточнославянское происхождение (русские, украинцы, белорусы). Начиная с 2009 года в международной печати появились публикации, в которых отмечалось, что эффективность терапии связана с этническим происхождением пациента [Yu S. et al., 2009; Elefsiniotis I.S. et al., 2009; Yu M.L. et al., 2009]. Например, пациенты монголоидного происхождения лучше отвечают на противовирусную терапию, чем европеоиды, а коренные жители Африки – хуже всех. Доминирующим этносом на территории

нашей страны являются восточные славяне. В связи с этим в исследование были включены пациенты данного этноса.

Перечисленные причины определяют актуальность проведения диссертационной работы по выявлению аллельных вариантов отдельных генов человека, имеющих полиморфные локусы, в комбинации с полиморфными особенностями генома ВГС, влияющими на эффективность ПВТ и формирование фиброза печени при естественном течении ХГС. Учитывая значение иммунных механизмов, интенсивности окислительного стресса и нарушения обмена железа в прогрессировании ХГС и формирования ответа на ПВТ, в диссертационной работе были изучены ОНП генов, продукты которых участвуют: в иммунных реакциях (*IL-1B*, *IL-6*, *IL-10*, *IL28B*, *TGF-B1*, *TNF-A*) в обмене железа (*HFE*), в эндотелиальной дисфункции (*eNOS*) и окислительном стрессе (*p22phox*) в сочетании с генетическим полиморфизмом ВГС.

Цель исследования:

Определить прогностическую значимость генетического полиморфизма вируса гепатита С и генов цитокинов, гемохроматоза и эндотелиальной дисфункции у пациентов с ХГС для прогноза эффективности противовирусной терапии и скорости развития фиброза печени.

Задачи исследования:

1. Установить прогностическую значимость факторов ВГС (генотип/субтип, репликативная активность и набор генетических вариантов) для оценки эффективности противовирусной терапии и оценки их влияния на скорость развития фиброза печени у пациентов с ХГС этнически однородной группы (восточные славяне).

2. Установить частоту встречаемости аллельных вариантов генов цитокинов: *IL-1B* (–511 C>T), *IL-6* (–174 G>C), *IL-10* (–1082 G>A), *IL-28B* (rs12979860 C>T, rs8099917 T>G), *TNF-A* (–238 G>A), *TGF-B1* (+915 G>C); наследственного гемахроматоза – *HFE* (H63D, C282Y) и генов, вовлеченных в развитие эндотелиальной дисфункции *eNOS* (+894 G>T) и оксидативного стресса *p22phox* (+242C>T) в исследуемой выборке пациентов в зависимости от ответа на противовирусную терапию.

3. Установить частоту встречаемости аллельных вариантов генов цитокинов: *IL-1B* (–511 C>T), *IL-6* (–174 G>C), *IL-10* (–1082 G>A), *IL-28B* (rs12979860 C>T, rs8099917 T>G), *TNF-A* (–238 G>A), *TGF-B1* (+915 G>C); наследственного гемохроматоза – *HFE* (H63D, C282Y) и генов, вовлеченных в развитие эндотелиальной дисфункции *eNOS* (+894 G>T) и оксидативного стресса *p22phox* (+242C>T) в исследуемой выборке пациентов в зависимости от интенсивности развития фиброза печени.

4. Провести многофакторный анализ сочетаний аллельных вариантов генов пациентов и генетических факторов вируса и их ассоциацию с эффективностью терапии и скоростью фиброзирование печени при ХГС в исследуемой выборке пациентов.

Научная новизна:

1. Впервые было изучено сочетанное влияние генетических факторов ВГС и ОНП генов пациента (*IL-1B*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-28B*, *TNF-A*, *TGF-B1*, *HFE*, *eNOS*, *p22phox*) на эффективность противовирусной терапии и развитие фиброза печени у пациентов восточнославянского происхождения.

2. Впервые была выявлена ассоциация аллельных вариантов генов цитокинов: *IL-28B* по локусам rs12979860 C>T, rs8099917 T>G;

TNF-A (—238 G>A) и *IL-1B* (–511 C>T) с эффективностью ПВТ и скоростью развития фиброза печени в данной выборке пациентов.

3. Впервые было показано, что гаплотип С (rs12979860)/Т (rs8099917 T>G) гена *IL-28B* выявляется с высокой частотой у пациентов с ХГС (восточные славяне).

4. Впервые установлены прогностически значимые закономерности сочетания субтипа вируса и аллельных вариантов генов пациентов (*IL-1B*, *IL-28B*, *TNF-A*, *HFE*) на эффективность терапии и скорость развития фиброза печени в данной выборке пациентов.

5. Впервые разработана прогностическая модель с количественной оценкой данных по полиморфным локусам генов пациента и генотипу/субтипу вируса, позволяющая сделать прогноз эффективности терапии и скорости развития фиброза печени у пациентов восточнославянского происхождения.

Практическая значимость

Благодаря установленным в диссертационной работе сочетаниям аллельных вариантов генов пациентов и генетических параметров ВГС создана прогностическая модель, позволяющая рассчитать вероятность достижения УВО при стандартной двойной терапии, оценивая данные анализа ОНП генов цитокинов *IL-1B* (–511 C>T), *IL-28B* (rs12979860 C>T, rs8099917 T>G) и генотипа/субтипа вируса, которым инфицирован больной, по баллам (прогноз по сумме баллов). В соответствии с предложенной моделью с увеличением количества «мутантных» аллелей по данным генам уменьшается вероятность достижения УВО при стандартной двойной терапии пациентов с ХГС, имеющих восточнославянское происхождение.

Установленная в диссертационной работе закономерность относительно роли аллельных вариаций генов *TNF-A* (–238 G>A) и

HFE (H63D, C282Y) и генотипа/субтипа вируса позволит прогнозировать скорость развития фиброза печени у пациентов с ХГС определенного этнического происхождения. С увеличением количества «мутантных» аллелей по данным генам увеличивается вероятность ускоренного фиброгенеза.

Данная модель является определенным этапом в развитии современного персонифицированного подхода к терапии и прогнозу скорости поражения печени у пациентов с ХГС.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Среди изученных генетических факторов ВГС наибольшее влияние на эффективность терапии и развитие фиброза печени оказывает генотип/субтип вируса. Не выявлена зависимость между количеством генетических вариантов по 1-му гипервариабельному региону (1ГВР) белка Е2 и эффективностью стандартной двойной терапии и развитием фиброза печени.

2. Устойчивый вирусологический ответ на терапию достоверно чаще достигается при выявлении у пациентов аллельных пар СС (rs12979860) и ТТ (rs8099917) гена *IL28B* и при отсутствии генотипа ТТ (–511 С/Т) гена *IL-1B*. Обнаружена высокая частота одновременной встречаемости аллельных пар СС (rs12979860) и ТТ (rs8099917) гена *IL28B*, что свидетельствует о существовании гаплотипа С/Т.

3. Быстрое развитие фиброза печени достоверно чаще отмечается при обнаружении у пациента аллельного варианта GA (–238 G>A) гена *TNF-A* и генотипа GC (+915 G>C) гена *TGF-B1*. Появление А-аллеля в локусе –238 G/A гена *TNF-A* и вариантов СY и YU в позиции C282Y гена *HFE* чаще приводит к быстрому развитию фиброза печени.

4. Медленное формирование фиброза печени достоверно чаще отмечается у пациентов с генотипом GG в локусе –238 G/A гена *TNF-A* и генотипом CT в локусе +242 C/T гена *p22phox*

5. При комплексной оценке данных патоген-хозяин показано, что прогностическими факторами высокой вероятности достижения УВО являются инфицирование пациента ВГС генотипа 2 или 3 и наличие у больного аллельных вариантов CC (rs12979860) и TT (rs8099917) гена *IL28B*; отсутствие генотипа TT (–511 C/T) гена *IL-1B*. Высокая вероятность неэффективности терапии наблюдается при инфицировании вирусом генотипа 1 и наличии у пациентов T– (rs12979860) или G–аллеля (rs8099917) гена *IL28B* и генотипа TT (–511 C/T) гена *IL-1B*.

6. Прогностическими факторами низкой скорости развития фиброза печени являются: инфицирование пациента вирусом субтипа 3а, наличие в гене *TNF-A* аллельной пары GG (–238 G/A) и варианта CC (аминокислотная позиция C282Y) в гене *HFE*. Высокая скорость развития фиброза печени ассоциирована с инфицированием вирусом генотипа 1 и наличием в гене *TNF-A* аллельного варианта GA (–238 G/A) и вариантов CY и YY в позиции C282Y гена *HFE*.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном планировании и проведении лабораторных исследований, анализе полученных данных и их статистической обработке. Соискателем самостоятельно проводилось определение генетических параметров пациентов - ОНП анализируемых генов цитокинов, гемохроматоза и эндотелиальной дисфункции. Вирусологические параметры ВГС определялись совместно с канд. биол. наук Самохваловым Е.И., канд. биол. наук Альховским С.В. и докт. биол. наук Николаевой Л.И. Многофакторная статистическая обработка данных проводилась совместно с докт. физ.-мат. наук Яровой Е.Б.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования по влиянию аллельных вариантов полиморфных зон генов пациентов и генетическим параметрам ВГС на формирование УВО при двойной терапии и на развитие фиброза печени используются при чтении лекций врачам на кафедре инфекционных болезней Российской медицинской академии последиplomного образования г. Москвы как пример персонифицированного подхода.

Апробация работы

Результаты работы были доложены на IX Российской конференции «Гепатология сегодня» в г. Москва, 17 марта 2010 г.; на II ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням в г. Москва, 31 марта 2010 г.; на научно-практической конференции «Актуальные проблемы инфекционных заболеваний» в г. Ташкент, 22 октября 2010 г.; на VIII Международной конференции «Медицинская генетика соматических клеток» в г. Звенигород, 9 декабря 2011 г.; на VI ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням в г. Москва, 24 марта 2014 г. Апробация диссертационной работы проведена в ФГБУ «Научно-исследовательском институте им. Д.И. Ивановского» Минздрава России 24 апреля 2014 г. на совместном заседании апробационного совета и отдела молекулярной вирусологии с участием сотрудников кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, 1 статья в журнале, не входящем в перечень журналов, рекомендованных ВАК, и

7 тезисов в сборниках материалов как общероссийских, так международных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, включающих: обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение; выводов и списка литературы, состоящего из 24 отечественных и 243 зарубежных источников. Работа изложена на 173 страницах текста, иллюстрирована 32 таблицами и 34 рисунками.

Работа была частично поддержана грантом ФГБУ «Российский фонд фундаментальных исследований» №04-09-13853.

Глава 1. Характеристика вируса гепатита С (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1. 1. Вирус гепатита С

1. 1. 1. Строение вириона

ВГС впервые был идентифицирован в 1989 году, когда группа исследователей во главе с М. Houghton клонировала и секвенировала геном вируса [Choo Q.L. et al., 1989]. На основании сходства строения генома с уже изученными вирусами, ВГС был включен в семейство Flaviviridae в новый род Hepacivirus [Franki (Farci P.) et al., 1991]. Вирус имеет сферическую форму с диаметром около 55 нм [Yuasa T. et al., 1991; Prince A.M. et al., 1996]. Под его оболочкой располагается нуклеокапсид, который сформирован сердцевинным (core) белком и содержит вирусную РНК. Размеры нуклеокапсиды, как установлено методом электронно-микроскопического анализа, составляют 33-45 нм [Zhao W. et al., 2004]. На рисунке 1 приведена схема строения вириона.

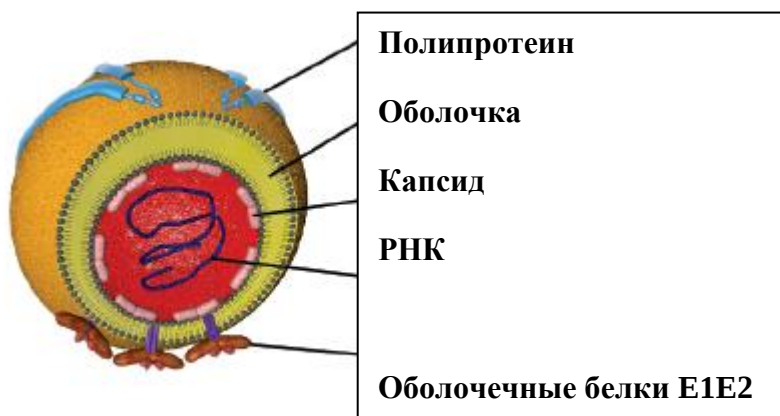


Рисунок 1 – Схематическое изображение вирусной частицы дано в легкой модификации [Feneant L. et al., 2014]

Вирус присутствует в крови в комплексе с липопротеинами и антителами и имеет гетерогенность в плотности частиц, что было обнаружено при центрифугировании в градиенте раствора сахарозы [Huang H. et al., 2007]. Успешное культивирование ВГС на

перевиваемых клеточных культурах впервые было сделано П. Г. Дерябиным и соавторами в 1997 году [Дерябин П. Г. и др., 1997].

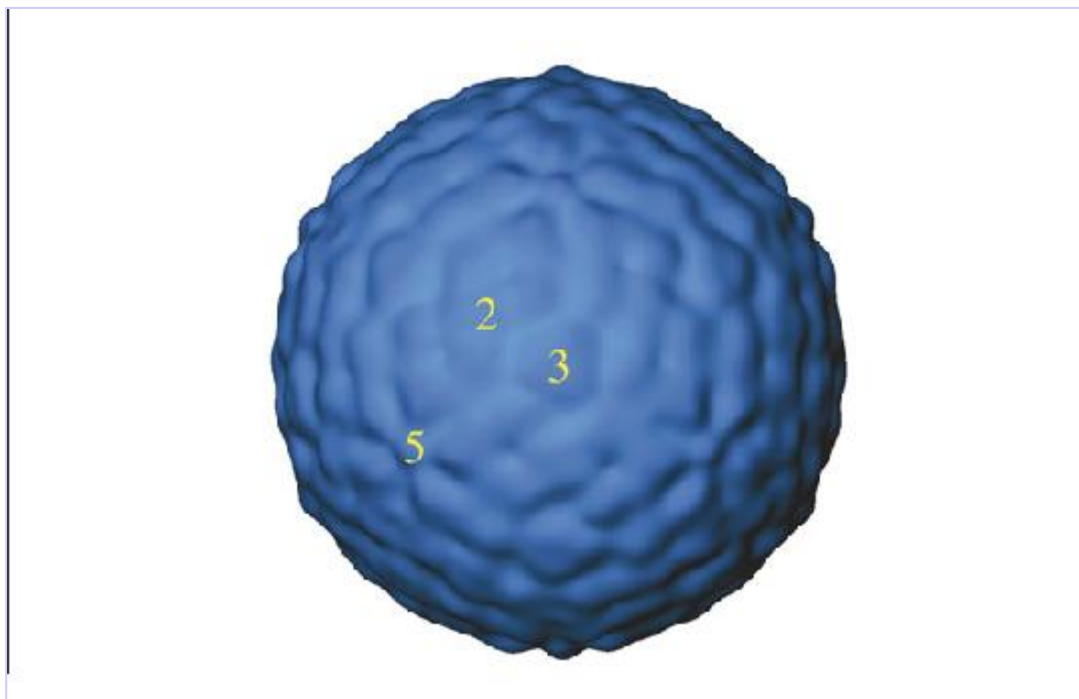


Рисунок 2 – Трехмерное изображение ВГС, выполненное по данным анализа ВПЧ с помощью трансмиссионной микроскопии [X. Yu et al, 2007] Цифрами отмечены оси симметрии.

Морфогенез ВГС происходит на мембранах эндоплазматической сети (ЭПС), в секреторных вакуолях аппарата Гольджи и, частично, в цитоплазме. В 2-х белках, выщепляемых из полипротеина, находится сигнал транслокации в ЭПС. В цистернах ЭПС сигнальные пептидазы выщепляют белки E1 и E2, которые проходят процессинг и формируют гетеродимерный комплекс [Suzuki T., 2012] (Рисунок 3). В цитоплазме клетки осуществляется сборка нуклеокапсида, на который затем «одевается» оболочка, и вирус выпочковывается в цистерны эндоплазматической сети.

Исследуя биоптаты печени людей с хроническим гепатитом С, ученые пришли к выводу, что заключительные этапы морфогенеза вируса происходят в везикулах аппарата Гольджи, где окончательно завершается биосинтез углеводных цепей белков E1 и E2

[Nepomnyashchikh G.I. et al., 2013] (Рисунок 4). Образовавшиеся вирусные частицы покидают клетку, используя ее транспортные секреторные пути аппарата Гольджи. Но возможно выделение вируса при повреждении целостности клеток.

Ряд белков HCV модифицируют сигнальные пути и гены инфицированной клетки, что нарушает регуляцию транскрипции, трансляции и пост-трансляционные модификации. К числу таких вирусных белков относятся: core (нуклеокапсидный), NS3 и NS5A. В жизненном цикле вируса core-белок выполняет роль инициатора сборки нуклеокапсида и формирует его, протеин NS3 – ключевой протеолитический фермент, который выщепляет неструктурные вирусные белки из полипротеина, белок NS5A участвует в формировании репликативного комплекса и некоторых других, мало изученных процессах.

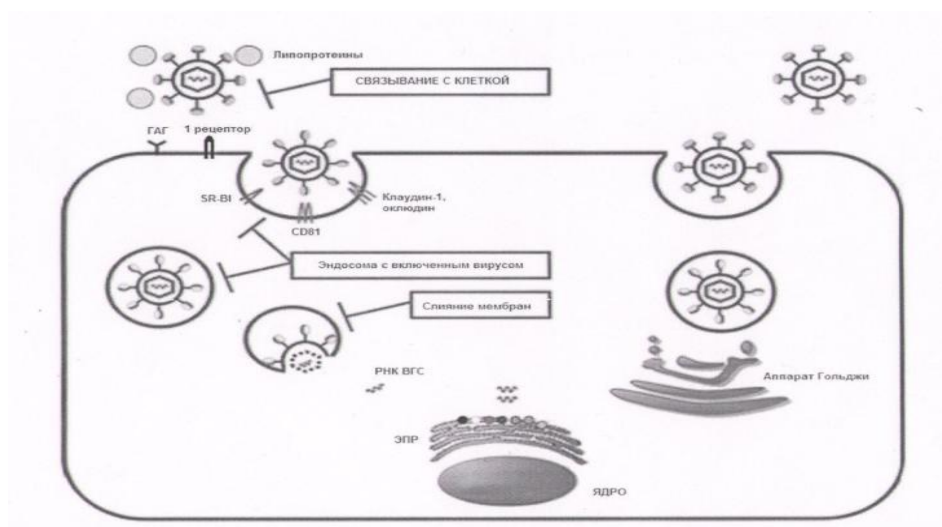


Рисунок 3 – Морфогенез ВГС [Николаева Л. И. и соавт., 2012].

Оболочка вируса.

Оболочка вируса сформирована липидами клетки хозяина и оболочечными белками вируса: E1(192-383) и E2(384-746). Они являются фрагментами полипротеина, расположены за сердцевиной

(core) белком. Оба белка относятся к трансмембранным протеинам и содержат углеводные остатки [Grakoui A. et al., 1993]. Обнаружено, что вирусы подтипа 1a и 3a различаются количеством олигосахаридных цепей в оболочечных белках [Shaw M. L. et al., 2003]. Эти белки выполняют такие важные функции, как взаимодействие с рецепторами, слияние (fusion) оболочки и мембраны эндосом, инициация сборки вирусных частиц и некоторые другие.

Биосинтез белков ВГС осуществляется на рибосомах, ассоциированных с ЭПС. Благодаря сигналу транслокации часть участка полипротеина, соответствующего белкам E1 и E2, попадает в полость цистерн ЭПС. Там клеточные сигнальные пептидазы отщепляют эти протеины друг от друга, а также от сердцевинного белка [Cocquerel L. et al., 1999; Duvet et al., 1998].

Главная функция оболочечных белков – взаимодействие с рецептором и корецептором. На роль рецепторов и корецепторов выдвигаются поверхностные белки гепатоцитов: CD81, клаудин, окклюбин и сапрофитный белок SR-B1 (Рисунок 4.). Установлено, что при контакте ВГС с рецептором образуется комплекс вирус-рецептор, затем он передается корецепторам. Комплекс вирус-корецептор проникает внутрь клетки в виде эндоцитозной вакуоли, содержащей специальный белок клетки – клатрин. На следующем этапе эндоцитозная вакуоль сливается с эндосомой, которая имеет кислые значения среды. Под действием низких pH эндосомы поверхностные гликопротеины ВГС претерпевают конформационные изменения, приводящие к экспонированию и внедрению пептида слияния (fusion peptide) в эндосомальную мембрану. Этот процесс запускает слияние липидного бислоя вируса и мембраны эндосомы, которое завершается выходом РНК ВГС в цитоплазму клетки.

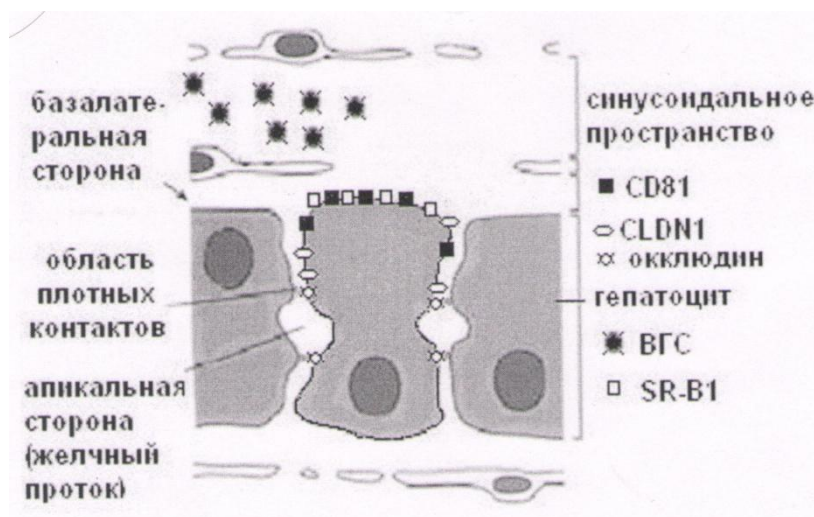


Рисунок 4 – Взаимодействие ВГС с белками-рецепторами и корецепторами гепатитов [Николаева Л. И. и соавт., 2012]

Основная структурная особенность оболочечных белков E1 и E2 – наличие участков полипептидной цепи с переменными аминокислотными последовательностями. Эти участки получили специальное название – гиперпеременные участки и более подробно будут рассмотрены в разделе «Полиморфизм генома вируса».

Нуклеокапсид.

Нуклеокапсид ВГС сформирован нуклеокапсидным белком, который участвует в важных этапах морфогенеза вируса, в сборке вирусной частицы и инициирует упаковку РНК ВГС [Roingeard P. et al., 2004]. Также он принимает участие в остановке сигнала апоптоза, накоплении свободных радикалов кислорода, изменении сигнальных путей, нарушении липидного метаболизма, антивирусной защиты и активности генов-онкосупрессоров [Llovet J. M. et al., 2008].

В процессе биосинтеза вирусных белков первым от полипротеина отщепляется нуклеокапсидный белок с помощью сигнальных пептидаз клетки [Okamoto K. et al., 2004]. В заключительном протеолитическом гидролизе core-белка участвует уникальная сигнальная пептид-

пептидаза SPP, осуществляющая внутримембранное расщепление [McLauchlan J. et al., 2002]. Среди всех вирусных белков core-протеин отличается самым высоким содержанием консервативных зон в первичной структуре [Bukh J. et al., 1994]. По данным электронной микроскопии, сердцевинный белок локализуется в клетке на мембранах ЭПС, в цитоплазме, на липидных везикулах, а также в ядре [Murray C.L. et al., 2007]. Core-протеин может связываться с клеточным белком онкосупрессором p73, что приводит к транслокации вирусного белка в ядро, где он взаимодействует с генами p53 и p21. В результате этих взаимодействий нарушается контроль клеточного цикла и увеличивается вероятность трансформации клетки [Yamanaka T. et al., 2002].

Процессинг нуклеокапсидного протеина сопровождается переходом его формы p23 (193 а.к.о) в p21 (173 а.к.о) и фосфорилированием ОН-групп сериновых остатков [McLauchlan J. et al., 2002]. После завершения процессинга нуклеокапсидный белок имеет хорошо выраженную амфипатическую структуру: гидрофильную N-концевую область (домен D1) и гидрофобный C-концевой участок (домен D2). В гидрофильном домене этого белка содержатся основные консервативные В – эпитопы и фрагмент, ответственный за формирование димера core-белка, а также участок связывания РНК [Boulant S. et al., 2005]. Гидрофобный домен, который обеспечивает ассоциацию с мембранами и липидными включениями цитоплазмы, содержит амфипатические альфа – спирали с выраженными гидрофильными и гидрофобными поверхностями. Core – белок ВГС вовлечен в процесс развития стеатоза печени при хроническом гепатите С [Tsutsumi T., et al., 2002; Hourieux C., et al., 2007; Perlemuter G., et al., 2002]. Известно также, что в инфицированной клетке core-антиген может инициировать следующие процессы: окислительный стресс, накопление радикалов кислорода и канцерогенез [Fujinaga H., et al., 2011].

Неструктурные белки вируса.

Виропорин ВГС, или пептид р7, образует гептамеры, которые формируют катион-специфический канал, значение которого в последнее время интенсивно изучается. Существует гипотеза, что он принимает участие на ранних этапах морфогенеза вируса и приводит к эндоплазматическому стрессу [Jones C.T., et. al., 2007].

Белок NS2 расположен в полипротеине после пептида р7. Это небольшой белок (молекулярная масса около 23 кДа), который не содержит углеводных остатков и связан с мембранами ЭПС [Yamaga A. K., et al., 2002]. Его основная биологическая функция – выщепление сериновой протеазы вируса. Для выполнения этой протеолитической функции белок NS2 формирует комплекс с участком полипротеина, соответствующим белку NS3 [Kolykhalov A. A. et al., 2000]. В результате образуется NS2-NS3 протеаза, которая расщепляет связь между С-концом белка NS2 и N-концом еще не отделенного протеина NS3 [Griffin S. et al., 1993]. После этого комплекс NS2-NS3 распадается, белок NS2 фосфорилируется и подвергается деградации [Frank N. et al., 2005]. Получены экспериментальные данные об участии этого белка в изменении активности клеточных генов и остановке сигнала апоптоза [Kim K. M. et al., 2007].

Белок NS3, цинк-зависимый фермент, занимает в полипротеине участок с аминокислотными остатками 1006-1612. В этом белке выявлено две ферментативные активности: протеазная, локализованная в области аминокислотной последовательности 1026-1207, и хеликазная/нуклеотид-трифосфатазная, расположенная в зоне 1207-1612 [Suzich J. A. et al., 1993; Tai C. -L. et al., 1996]. Полная протеазная активность проявляется после формирования комплекса с полипептидом NS4a, без него она незначительна [Sato S. et al., 1995]. Сериновая протеаза выщепляет из полипротеина ВГС все неструктурные белки, кроме протеина NS2. Аминокислотная последовательность белка NS3 на

большей части консервативна. Этот протеин увеличивает рост клеток и продукцию цитокина *TGF- β 1* [Hassan M. et al., 2007].

Домен сериновой протеазы имеет типичную химотрипсин-подобную структуру. Установлено, что протеаза имеет узкий субстрат-связывающий участок, что долгое время затрудняло получение специфических ингибиторов. Недавно получены очень эффективные ингибиторы протеазы – телапневир и боцепневир, которые уже внедрены в медицинскую практику. С-концевая часть белка NS3 выполняет функции РНК-хеликазы. Она использует энергию гидролиза нуклеозидтрифосфатов и разъединяет двухцепочечные РНК.

Полипептид NS4a (позиции 1658-1711 в полипротеине) выполняет функции кофактора для сериновой протеазы [Lin C. et al., 1995], состоит из 54х аминокислотных остатков, N-концевая часть его гидрофобна и погружена в липидный бислой ЭПС [Tellinghuisen T. L. et al., 2002]. Он обеспечивает примембранное расположение белка NS3. Существует еще одна важная функция сериновой протеазы NS3 в комплексе с полипептидом NS4a – нарушение клеточной противовирусной защиты в процессе чего расщепляется два ключевых клеточных белка TICAM-1 и VISA из сигнального пути двухцепочечной РНК [Li K. et al., 2005; Welsch C., et al., 2007; Levrero M., 2006].

Белок NS4b (позиции 1712-1972 в полипротеине) имеет трансмембранное расположение, зоны с консервативной первичной структурой, и редко встречающуюся модификацию двух цистеиновых остатков в положении 257 и 261 [Yu G. Y. et al., 2006]. У этих аминокислотных остатков вместо свободных SH-групп присутствует их сложный тиозфир с пальмитиновой кислотой. Обнаружено, что белок NS4b может полимеризоваться и для этого процесса нужен модифицированный цистеиновый остаток в положении 261. Полимеризованный белок NS4b формирует специальную мембранно-

ассоциированную платформу (рафты) для репликативного комплекса ВГС [Welsch C. et al., 2007].

Протеин NS4b способен снижать экспрессию эндогенного интерферона 1го типа, ослабляя при этом противовирусную защиту клетки [Welsch C. et al., 2007]. В модельных экспериментах обнаружено, что этот белок обладает трансформирующей способностью [Leviero M., 2006].

Белку NS5a соответствует область полипротеина ВГС с аминокислотными остатками 1973-2419, а протеину NS5b – участок с остатками 2420-3008. Белок NS5a выполняет роль ключевого регулятора репликации [Appel N., et al., 2006]. Этот протеин ассоциирован с мембранами ЭПС при помощи амфипатических альфа-спиральных участков N-концевой области. В пространственной структуре белка NS5a выделяют три хорошо выраженных домена. Этот протеин, также может взаимодействовать с клеточными белками, контролирующими клеточный цикл и апоптоз (как и core-протеин) и липидный метаболизм.

Функциональную активность как ключевого регулятора репликации проявляет димер белка NS5a [Tellinghuisen T. L. et al., 2005]. Обнаружены полимеры белка NS5a, роль которых, как предполагают, заключается в формировании поверхности для транспорта РНК ВГС к репликативному центру. Есть сведения, что протеин NS5a может нарушать в клетке передачу биохимических сигналов, которые обеспечивают защитные противовирусные эффекты [Gale M.J. et al., 1997; Tan S. L. et al., 1999; Majumder M. et al., 2001; Chung K.M. et al., 2000].

Полипептид NS5b обладает активностью РНК-зависимой РНК-полимеразы [Behrens S. E. Et al., 1996]. Синтез РНК инициируется, как при помощи праймера, так и без него. Протеин NS5b обладает характерной структурой, как и все «правосторонние» полимеразы. В домене «ладонь» находится каталитический центр, который окружен доменами «большой палец» и «пальцами» [Lin c. Et al., 1995; Bressanelli

S. Et al., 1999]. Канал для связывания РНК формируется благодаря «пальцам», окружающим активный центр [Quinkert D. et al., 2005]. Протеин NS5b связан с мембранами ЭПС, где формируется репликативный комплекс. Недавно созданы ингибиторы полимеразной активности. Один из них – софосбувир – проходит последнюю стадию клинических испытаний в нашей стране.

1. 1. 2. Организация генома.

Генетический полиморфизм вируса гепатита С.

Геном ВГС представлен одноцепочечной РНК с положительной полярностью, содержащий около 9400–9600 нуклеотидных остатков, и имеющий уникальную открытую рамку считывания, ограниченную с 5'- и 3'-концов нетранслируемыми областями (НТО) [Bukh J. et al., 1995]. Между 5'- и 3'- НТО участками генома вируса располагается один ген, кодирующий полипротеин. В нем выделяют структурные и неструктурные зоны полипептидов вируса [Van der Poel C.L. et al., 1994] (Рисунок 5). Структурные белки (core, E1, E2) представлены нуклеокапсидным протеином и оболочечными гликопротеинами, в то время как неструктурные полипептиды (p7, NS2, NS3, NS4, NS5) в основном, являющиеся ферментами участвующими в репликации вируса, процессинге вирусных белков и инициации сборки вириона [Van der Poel C.L. et al., 1994; Dusheiko G. et al., 1994]. На вирионной РНК ВГС, как на матрице, синтезируется полипротеин (белок-предшественник) который состоит из 3008-3037 аминокислотных остатков [Chamberlain R.W. et al., 1997]. В результате ко- и посттрансляционного протеолитического расщепления полипротеина и процессинга продуктов протеолиза образуются вирусные полипептиды: нуклеокапсидный (core), оболочечные гликопротеины (E1 и E2), виропорин (p7), NS2-протеаза, сериновая протеаза-хеликаза (NS3),

кофактор сериновой протеазы (NS4a), компоненты репликативного комплекса (NS4b и NS5a) и РНК-зависимая РНК-полимераза (NS5b).

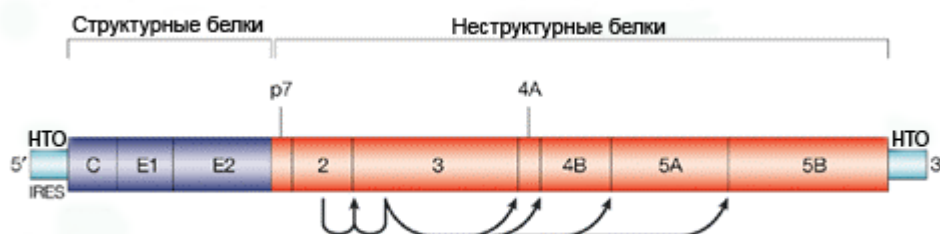


Рисунок 5 – Схема генома вируса гепатита С. Синим показаны области, кодирующие структурные белки вируса – С-белок (core) и гликопротеины оболочки вируса (E1 и E2). Неструктурные белки (NS2-5B) обозначены красным цветом. Стрелками обозначены места расщепления, опосредуемые протеазами NS2–NS3 и NS3. 5' НТО – нетранслируемая область. IRES – участок внутренней посадки рибосомы [схема предоставлена по Bartenschlager R. (2002), с изменениями].

В геноме ВГС наиболее консервативной является 5'– концевая область (92% гомологии), содержащая нетранслируемую область (НТО) и IRES [Bukh J. et al., 1995]. Благодаря этому консервативному участку стало возможным обнаружение вирусной РНК в разных изолятах методом ОТ-ПЦР (обратной транскрипции полимеразной цепной реакции) [Yuki N. et al., 1995]. Нетранслируемая область (341 нуклеотидный остаток) выполняет важные биологические функции. Участок, IRES от (internal ribosome entry site), обеспечивает взаимодействие вирусной РНК с 40S субъединицей рибосомы [Tsukiyama-Kohara K. et al., 1992]. После связывания IRES с 40S субъединицей рибосомы начинается формирование активного трансляционного комплекса и трансляция вирусной РНК [Yu Y. et al., 2005]. Для трансляции необходимы клеточные факторы инициации eIF2 и eIF3. Поскольку активный трансляционный комплекс формируется медленно, начальная скорость трансляции невысока, она возрастает при

взаимодействии плюс-цепи РНК с неканоническими (необычными) активаторными белками клетки [Fukushi S. et al., 2001].

В гепатоцитах обнаружены комплиментарные участкам IRES короткие интерферирующие РНК, которые связываются с ним и останавливают трансляцию генома вируса [Korf M. et al., 2005; Roberts A. P. et al., 2013]. Некоторые клеточные белки, пептиды и витамин B12 могут ингибировать связывание IRES вируса с рибосомой [Pudi R. et al., 2005]. Антивирусный эффект интерферонов альфа-, бета- и гамма также проявляется на уровне IRES-опосредованной трансляции.

Заключительный элемент генома – 3'-концевая НТО – участвует в инициации репликации (сайт инициации находится в минус-цепи РНК), в регуляции трансляции и стабилизации геномной РНК [Bonì S. et al., 2005]. В структуре 3'-концевой НТО выделяют три элемента: короткий участок с вариабельной последовательностью (40 нуклеотидных остатков); полиуридиновый тракт (не менее 36 остатков) и уникальный консервативный регион X (98 нуклеотидов) [Yi M. et al., 2003]. Установлено, что регион X принимает непосредственное участие в формировании репликативного комплекса, регуляции инициации трансляции и репликации [Bonì S. et al., 2005].

Вариабельные зоны в геноме вируса.

Отличительная особенность генома ВГС – разнообразная и иногда значительная генетическая неоднородность во многих зонах генома [Houghton M. et al., 1991]. Наиболее изменчивым является фрагмент генома, кодирующий белок E2, в котором находятся две очень изменчивые области вирусного полипептида: гипервариабельная зона 1 (HVR1) (27 аминокислотных остатков) и HVR2 (7 аминокислотных остатков), которые локализованы в N-концевой части E2 [Weiner A.J. et al., 1991]. Такую вариабельность вируса связывают с отсутствием у РНК-зависимой РНК-полимеразы ВГС, корректирующей 3'-5'-

экзонуклеазной активности [Behrens S. et al., 1996]. Поэтому ошибки, возникающие в процессе репликации вирусной РНК, не устраняются. В инфицированном организме вирус существует в виде набора квазивариантов («квази» с лат. – ложный, мнимый), содержащих слегка измененные, но близкородственные геномы, различающихся по своей нуклеотидной последовательности всего на несколько процентов [Martell M. et al., 1992]. В процессе иммунной защиты у пациента некоторые доминантные вирионы устраняются. Большинство изменений в нуклеотидной последовательности РНК ВГС встречается в так называемых синонимических сайтах, мутации в которых не влияют на биологически важные свойства вируса. Теоретически возможно в течение суток появление 10^{10-11} антигенных вариантов ВГС, которые генетически близки, но иммунологически могут различаться [Bukh J., Miller R.H., Purcell R.H. et al., 1995]. Такое обилие новых антигенных вариантов усложняет распознавание их иммунной системой.

Учитывая генетическое разнообразие ВГС в 1994 году на II Международной конференции по вирусу гепатита С и родственным вирусам было принято соглашение положить в основу классификации вируса область генома, кодирующую белок NS5b [Simmonds P., 1994]. В результате было выделено 6 генотипов и около 80 подтипов ВГС. Различные генотипы вируса гомологичны на 65–70%, подтипы (субтипы) – на 77–80%, а генетические варианты в пределах одного изолята – на 95–97%. В 2014 году предложено выделять 7 генотипов и 67 субтипов [Smith D. B. et al., 2014].

Установлены существенные географические различия в распространении генотипов ВГС. Так, в Японии, на Тайване и Китае преимущественно регистрируются субтипы 1b, 2a и 2b. Субтип 1b даже называют “японским”. В США преобладает 1a — “американский” субтип. На Ближнем Востоке и в Юго-Восточной Азии — 4-й генотип. В Европейских странах преобладают, в основном, 2-й и 3-й генотипы, в

Южной Европе возрастает доля субтипа 1b. На Африканском континенте встречаются все генотипы [Alter M.J. et al., 1999]. В странах Южной Америки чаще всего встречается субтип 1b, где он обнаруживался почти у всех больных с гепатокарциномой, а также в 82% случаев у больных с ХГС [Soza A. et al., 2004]. В Российской Федерации чаще всего регистрируется вирус субтипа 1b, далее с убывающей частотой 3a, 2a и 1a (Рисунок 6).

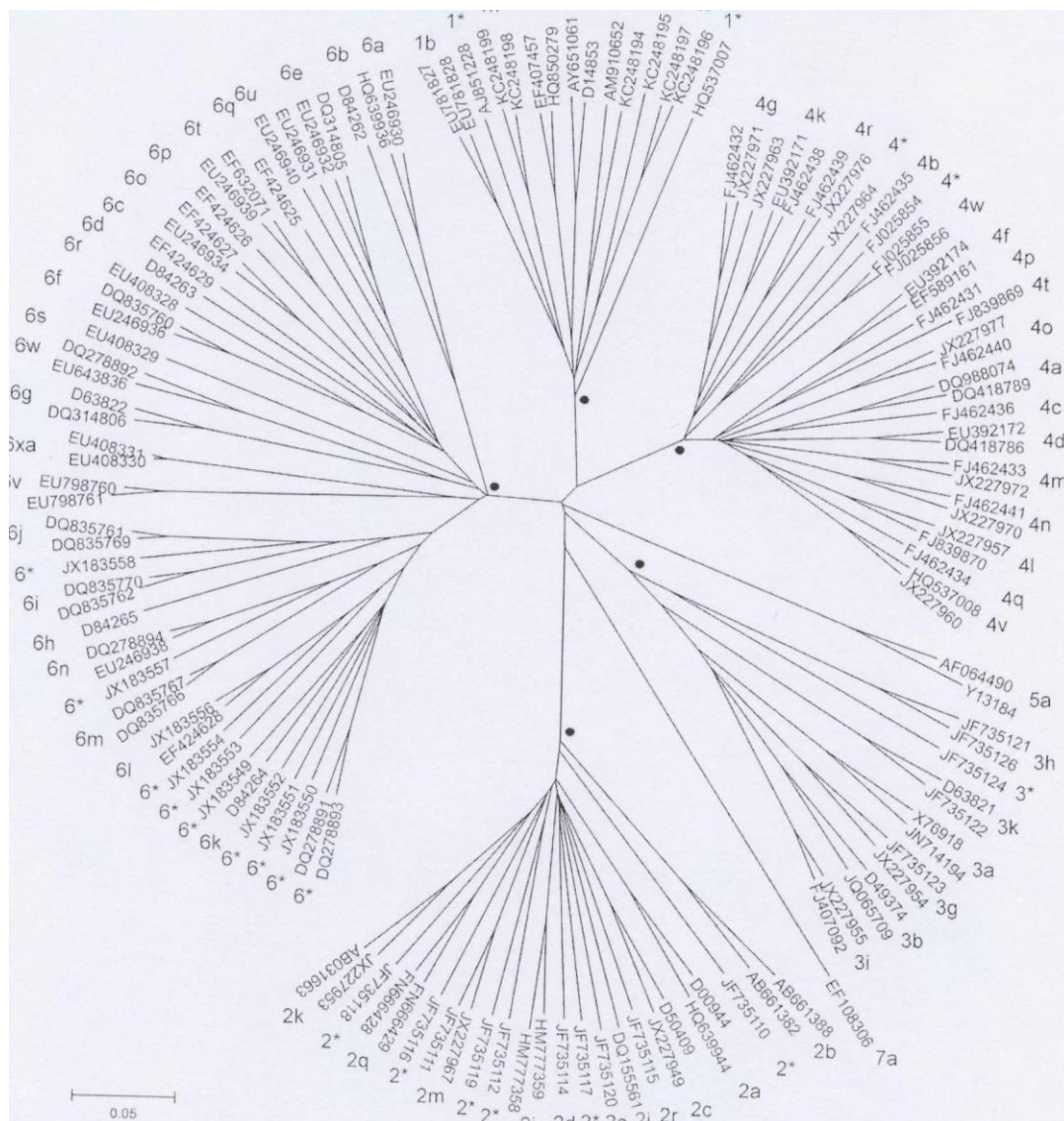


Рисунок 6 – Современная классификация ВГС [Smith D. B. et al., 2014]

Генотип вируса может влиять на течение болезни, эффективность лечения и исход. Показано, что при генотипе 1b наблюдается более высокий уровень виремии, реже достигается УВО при противовирусной

терапии (ПВТ) и чаще развивается рецидив гепатита С после трансплантации печени [Abbass et al., 2008]. Возможно, вирус содержит генетические детерминанты устойчивости к ПВТ [Bochud P.Y. et al., 2009]. Однако до сих пор они четко не локализованы.

1. 1. 3. Генетическая рекомбинация ВГС.

Первый случай межгенотипной рекомбинации 2k/1b вируса гепатита С был отмечен в Санкт-Петербурге, в 2002 году [Kalinina O., 2002]. С тех пор описаны случаи межгенотипной и межсубтипной рекомбинации в Ирландии [Moureau I. et al. 2006], Эстонии [Tallo T. et al., 2007] в Узбекистане [Kurbanov F. et. al., 2008] и на Тайване [Lee Y. M. et al., 2010] и других странах (Таблица 1).

Рекомбинантный вирус 2k/1b встречается чаще среди потребителей инъекционных наркотиков почти в 5,8% случаев, а среди других пациентов – в около 0,8%. [Самохвалов Е. И. и др., 2013]. Также, случаи рекомбинации были показаны в изолятах, выделенных от инфицированных ВГС шимпанзе.

Генетическая вариабельность позволяет РНК ВГС создавать новые более устойчивые варианты вируса. Некоторые из них могут влиять на патогенез и эффективность лечения в разных популяционных группах людей, что подчеркивает важность анализа этих вариантов. В экспериментальном анализе чувствительности рекомбинанта RF1_2k/1b были использованы, так называемые, химерные мыши с иммунодефицитом, несущие активатор плазминогена урокиназного типа, контролируемого альбуминовым промотером (uPA/SCID). Клетки печени этих мышей были частично репопулированы человеческими гепатоцитами. Ранее было показано, что химерные мыши, инфицированные различными изолятами ВГС, могут быть вылечены стандартным или пегилированным интерфероном [Nakagawa S. et. al., 2007]. Была проанализирована восприимчивость этих химерных мышей

к рекомбинантному штамму RF1 ВГС с устойчивыми и восприимчивыми образцами. В этой модели штамм RF1_2k/1b оказался восприимчивым к терапии интерфероном [Kurbanov F. et. al., 2008].

Таблица 1 – Природные рекомбинантные штаммы вируса гепатита С по Morel V. et al., [2011] [Smith D. B. et al., 2014]

Штамм	Происхождение	Сайты рекомбинации	Ссылка в GeneBank
Межгенотипные рекомбинации			
RF2k/1b	Россия	Внутри NS2, в остатке V/I-931	AY587845
D3 RF12i/6p	Вьетнам	Соединение NS2/NS3, между остатками 1022 и 1042	DQ155560
RF2b/1b_1	Россия		
RF2b/1b_2	Россия		
SE-03-07-1689 RF2b/1b_3	Филиппины	Начало NS3, между G-1038 и L-1039	DQ364460
RF2b/1b_4	Россия		
R1, 2/5	Франция	Начало NS3, между остатками 1027 и 1033	AM408911
D177, RF2b/6w	Тайвань	Начало NS3, в остатке 1030	EU643835
RF2b/1a	Россия		
Внутригенотипные рекомбинации			
PE22, RF2_1b/1a	Перу	Внутри NS5B, в остатке Y-2660	AJ582127, AJ582131, AJ582134
HC-J1, 1a/1c	Япония	Два сайта внутри E1-E2 в остатках 356 и 570	D10749
Khajal, 1a/1c	Индия	5 сайтов в центре NS3 в остатках 154, 307, 614, 900, 1147	AY651061
H23, 1b/1a	Уругвай	Внутри нуклеокапсида в остатке 16	EU934902-07

1. 1. 4. Особенности течения ВГС инфекции

Гепатит С – инфекция, вызванная вирусом гепатита С. В клинически выраженных случаях острый гепатит С характеризуется симптомами острого поражения печени, которое чаще всего протекающего с умеренной интоксикацией и в большинстве случаев (до 70 – 85%) заканчивающегося развитием хронического гепатита, который может перейти в цирроз (до 30 – 40%) и первичный рак печени (5 – 15%).

Летальные исходы при остром гепатите С встречаются редко. Однако, по данным Европейского комитета по профилактике вирусных гепатитов, гепатит С, по причине смертности среди больных с хроническим поражением печени занимает второе место, уступая только хроническому алкоголизму [Михайлов М. И., и др., 2004].

Острый гепатит С может протекать в желтушной и безжелтушной формах. Выделяют три основные фазы течения заболевания при ГС: острую, латентную (скрытую хроническую) и реактивную (ярко выраженную хроническую). Начало заболевания гепатитом С постепенное. В продромальном периоде отмечается умеренно выраженная интоксикация, основными симптомами которой могут быть: слабость, анорексия, тошнота, рвота, боли в суставах и др. В большинстве случаев заболевание диагностируется только с момента появления желтухи.

Возможно несколько вариантов завершения острого гепатита С. Первый вариант – выздоровление с полной элиминацией ВГС. Наблюдается у 20-30% пациентов, когда происходит нормализация уровня сывороточных трансаминаз, быстрое исчезновение РНК ВГС, IgM и постепенное – IgG к антигенам ВГС. Последние могут выявляться у части пациентов в течении нескольких лет, но в низком титре.

Второй вариант – развитие хронического гепатита. Он регистрируется у 70-80% переболевшим острым гепатитом. По рекомендации ВОЗ, острый гепатит С ограничивается 6 месяцами. В течение первых 10-15 лет при ХГС нарастает активность патологического процесса и фиброза печени. Показатели активности сывороточных трансаминаз обычно незначительно повышены. Показатели синтетической функции печени (количество общего белка и альбумина) в пределах норма, вплоть до развития цирроза печени. В этот период, продолжительность которого может быть 15-20 лет, пациенты, могут не знать о том, что они инфицированы. При этом

часто РНК ВГС циркулирует в низкой концентрации [Михайлов М. И., и др., 2004].

Хронический гепатит С – медленно текущее заболевание, при котором наблюдаются изменения, как в паренхиме органа (в эпителиальных клетках печени), так и в его интерстиции (мезенхимальных клетках). Наряду с частыми дегенеративными и дистрофическими изменениями при хроническом гепатите наблюдаются элементы воспалительного характера в виде отдельных очагов (очаговый хронический гепатит) или диффузного процесса [Соринсон, 1998]. В современной гепатологии в течении хронического гепатита выделяли следующие стадии: активную (агрессивный гепатит) и скрытую цирротическую (персистирующий гепатит), которые могут переходить одна в другую. В зависимости от скорости поражения органа выделяют три формы течения ХГС: легкая, умеренная и тяжелая. В зарубежной литературе пациентов из этих групп называют медленные, умеренные и быстрые прогрессоры.

В настоящее время установлено, что инфицирование вирусом гепатита С может быть причиной развития гепатоклеточной карциномы. При гепатите С не происходит интеграции РНК ВГС в геном гепатоцита. Считают, что хроническое воспаление и цирроз печени, ассоциированный с ВГС, является пусковым механизмом трансформации гепатоцитов печени. Редко выявляются случаи первичной гепатоклеточной карциномы без цирроза печени.

Глава 2. Характеристика значимых при гепатите генов цитокинов, гемохроматоза и ферментов, связанных с эндотелиальной дисфункцией (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Процессы пролиферации, дифференцировки и функциональная активность всех иммунокомпетентных клеток — находится под контролем цитокинов, которые в основном продуцируют Th1 и Th2. Эти Т-хэлперы влияют на развитие хронического гепатита С, различаются по продуцируемым ими цитокинам и роли в стимулировании развития иммунного ответа по клеточному или гуморальному типу. Нарушение баланса продукции цитокинов Th1/Th2 клетками играет важную роль в иммунопатогенезе ВГС-инфекции.

2. 1. Интерлейкин – 1В (*IL-1B*)

Интерлейкин-1В (*IL-1B*) — провоспалительный цитокин, член семейства интерлейкина 1. Он активирует В- и Т-лимфоциты, стимулирует синтез белков острой фазы, некоторых цитокинов, молекул адгезии и простагландинов [Nutyrova B. et al., 2002]. Кроме того, *IL-1B* стимулирует хемотаксис, фагоцитоз воспалительных клеток, повышает проницаемость сосудистой стенки, является медиатором взаимодействий между иммунной и нервной системами, индуцирует экспрессию коллагенов I и III типа и обладает митогенным действием на фибробласты посредством стимуляции экспрессии PDGF и его рецептора на поверхности последних [Azouz A., 2004]. В клетках печени провоспалительные цитокины *IL-1A* и *-1B* экспрессируется в основном резидентными тканевыми макрофагами (клетками Купфера) и Т-клетками. Было показано, что уровень *IL-1B* в плазме крови значительно повышен при ВГС по сравнению с другими заболеваниями печени [Farinati F., 2006].

Ген *IL-1B* расположен на хромосоме 2q14. Наиболее изученным полиморфизмом гена *IL-1B* является однонуклеотидная замена С на Т в положении –511 промоторного региона гена, приводящая к увеличению секреции *IL-1B* [Di Giovine F.S. et al., 1991]. Частота встречаемости полиморфизма –511С/Т не отличается у больных вирусным гепатитом С европеоидного происхождения с разными результатами лечения [Abbas Z. et al., 2005]. Также не выявлено корреляции между распространенностью полиморфизма гена *IL-1B* (в положениях –511 и +3954) и спонтанной элиминацией ВГС в Англии [Minton E. J. et al., 2005]. Отечественными исследованиями было показано, что аллель –511Т гена *IL-1B* чаще ассоциирован с более тяжелой степенью фиброза печени у больных ХГС [Самоходская Л.М. и соавт., 2007]. При исследовании больных ХГС в Японии было выявлено, что генотип –511ТТ гена *IL-1B* является важным фактором риска развития ГЦК [Tanaka Y. et al., 2003]. Однако при сравнении представителей европеоидной и монголоидной расы зависимости между однонуклеотидными заменами в положении –511С/Т гена *IL-1B* и частотой развития ГЦК в исходе ХГС не установлено [Yu Yang et al., 2011]. Влияние данного полиморфизма на течение ХГС и противовирусную терапию у пациентов восточнославянского происхождения изучено не достаточно полно [Абдуллаев С., 2008].

2. 2. Интерлейкин – 6 (*IL-6*)

Интерлейкин-6 (*IL-6*) провоспалительный цитокин, секретируется различными клетками и играет важную роль в регуляции иммунной системы, гематопоеза, и острой фазы воспаления, а также в противовирусной защите организма, является эссенциальным фактором для регенерации печени [Zekri A.R., 2005]. В ряде работ показано, что *IL-6* стимулирует экспрессию матриксной металлопротеиназы-13 (ММР-13) и снижает экспрессию ингибитора матриксных протеиназ-1 (TIMP-

1), тем самым *IL-6* способствует деградации внеклеточного матрикса [Fishman D. Et al., 1998; Jin X. et al., 2006].

Уровень *IL-6* в сыворотке крови у здоровых людей низкий, но значительно повышается при многих патологических состояниях, например, при травмах, воспалении и неоплазии. Уровень *IL-6* значительно повышен у больных с асимптоматическим течением гепатита С [Zekri A.R., 2005].

Ген *IL-6* локализован на хромосоме 7p21. С конца 1990-х годов было найдено несколько ОНП в промоторе этого гена [Taga T., Kishimoto T., 1997]. Наличие аллельных вариантов в промотерной области гена *IL-6* приводит к различным уровням транскрипции данного гена. Установлено, что полиморфизм промоторной части гена *IL-6* (–174 G/C) влияет на уровень этого цитокина в крови [Fishman D., 1998]. Люди с аллельными вариантами GG и GC имеют более высокое сывороточное содержание этого цитокина, чем лица с генотипом CC [Cecere A. et al., 2004]. Распространенность аллели G различается у разных этнических групп: у представителей европеоидной расы данная аллель встречается гораздо реже по сравнению с представителями других рас [Meenagh et al. 2002]. Так, у европейцев частота встречаемости аллели GG составляет 0,54 – 0,62; у африканцев, коренных американцев, жителей Сингапура – 0,87 – 1,00.

Были найдены ассоциации полиморфизма –174C/G гена *IL-6* и стадией фиброза печени при ВГС у коренных жителей Италии [Cussigh A. et al., 2011]. Аллель G полиморфизма –174C/G гена *IL-6* чаще ассоциировался с развитием быстрого фиброза печени у больных ХГС [Bedossa P. et al., 1996]. Примечательно, что среди населения Италии носительство аллеля –174G гена *IL-6* и высокая степень фиброза чаще встречается у мужчин [Cussigh A. et al., 2011].

Данные отечественных исследований противоречивы. В одном исследовании было показано, генотипы гена *IL-6* –174GC и –174CC

достоверно чаще обнаруживаются при быстро прогрессирующем, чем при благоприятном течении заболевания [Самоходская и др., 2007; Абдуллаев С., 2008]. Но в другом исследовании, проведенном в Томской области, среди пациентов с высокой степенью активности воспалительного процесса достоверно преобладали носители генотипа – 174GG. Носительство генотипов -174CG и -174CC гена *IL-6* чаще встречалось у пациентов с минимальной и умеренной степенью воспалительного процесса. Однако при оценке значения полиморфизма —174C/G в промоторной области гена *IL-6* в развитии фиброза были получены недостоверные различия частот встречаемости вариантных аллелей и генотипов гена у больных ВГС-инфекцией с различной степенью фиброза печени [Семенова Н.А и соавт., 2010]. Таким образом, не существует однозначных данных о влиянии полиморфизма в промоторной области –174 G>C гена *IL-6* на патогенез хронической ВГС-инфекции и на эффективность ПВТ.

2. 3. Интерлейкин – 10 (*IL-10*)

IL-10 играет ключевую роль в патогенезе инфекционных и воспалительных процессов. *IL-10* обладает противовоспалительным эффектом, снижает экспрессию молекул МНС класса I и II и продукцию цитокинов Th1 [Wilson L.E.et al., 2006]. Кроме того, он понижает экспрессию коллагена 1 типа и коллагеназы. Этот цитокин оказывает ингибирующее действие на Т-клеточный ответ при вирусных инфекциях [Brooks D.G. et al., 2006].

Ген *IL-10* локализован в хромосоме 1q31-q32. Полиморфизм –1082 G/A в промоторе гена *IL-10* ассоциирован с разным уровнем продукции цитокина [Pestka S. et al., 2009]. Наличие у пациентов аллели –1082 А гена *IL-10* приводит к снижению продукции этого цитокина. Для пациентов с ХГС, имеющих европеоидное происхождение, было

установлено, что аллель –1082А ассоциирована с развитием устойчивого вирусологического ответа (УВО) [Yee L.J. et al., 2001].

Высокая вирусная нагрузка и хронизация инфекции чаще наблюдается у больных с высоким уровнем *IL-10* и истощением популяции вирус-специфических CD8⁺ Т-клеток. Низкий уровень секреции *IL-10* моноцитами ассоциируется с элиминацией вирусной инфекции. И наоборот, нуклеотидные замены, приводящие к высокому уровню секреции *IL-10* моноцитами, чаще встречаются у пациентов с хронической вирусной инфекцией [Persico M. et al., 2006]. Корреляций между уровнем секреции *IL-10* и исходом ВГС обнаружено не было [Chen T.Y. et al., 2007] или были найдены только у некоторых этнических групп (например, у афроамериканцев, но не у представителей европеоидной расы) [Oleksyk T.K et al., 2005]. В исследовании D.R. Nelson и соавт. установлено, что после введения препарата *IL-10* больным ХГС с выраженным фиброзом или даже с циррозом печени, уменьшаются воспалительная активность и степень фиброза [Nelson D.R., et al., 2003]. Ранее на небольшой группе лиц восточнославянского происхождения были выполнены исследования по анализу роли этого полиморфизма в развитии фиброза печени при ХГС и эффективности ПВТ [Абдуллаев С., 2008].

2. 4. Интерлейкин – IL-28В

IL28A, *IL-28B* и *IL-29*, также называемые интерферон-лямбда (INF-λ) 2,3 и 1 соответственно, относятся к семейству цитокинов 2 класса и представляют собой недавно открытую группу противовирусных цитокинов. INF-λ и индуцирует противовирусные, антипролиферативные, противоопухолевые и иммунные эффекты.

Белки семейства INF-λ обладают меньшей противовирусной активностью по сравнению с INF-α *in vitro* [Sheppard P. et al., 2003]. Было показано, что INF-λ3 ингибирует ВГС в зависимости от дозы и

времени воздействия, увеличивает экспрессию генов стимулированных интерфероном (ISGs, interferon stimulated genes), и повышает противовирусную активность INF- α [Marcello T. et al., 2006].

Ген *IL-28B* локализован в хромосоме 19q13. Рядом с ним обнаружены полиморфные локусы, которые представлены на рисунке 7.....

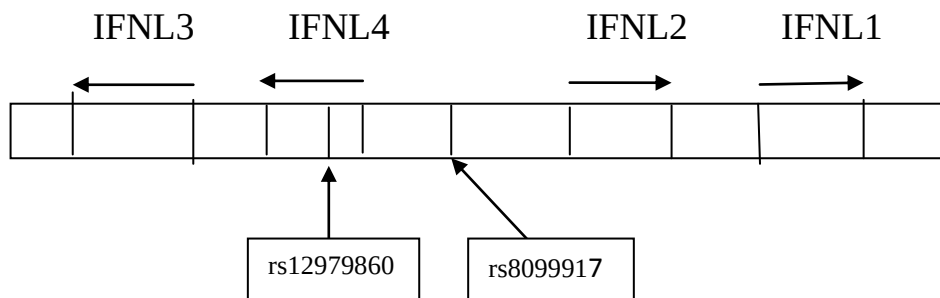


Рисунок 7. Схема расположения ОНП гена *IL-28B*

Интерферон- α (IFNs) связывается с рецептором на поверхности клеток, известным как IFN- α рецептор (Рисунок 8). Этот рецептор состоит из двух субъединиц: IFN α R1 и IFN α R2, которые взаимодействуют с тирозин-киназами 2 (ТYK2) и янус-киназами 1 (JAK1) соответственно. Активация JAK приводит к фосфорилированию STAT1 и STAT2 (signal transducer and activator of transcription 1 and 2), что приводит к формированию комплекса STAT1– STAT2–IRF9 (интерферон-регулирующий фактор 9), известного как комплекс ISGF3 (IFN-stimulated gene (ISG) factor 3, интерферон-зависимый фактор активации генов 3). Этот комплекс транслоцируется в ядро, связывается с участками ДНК (IFN-stimulated response elements (ISREs)) и инициирует транскрипцию генов.

Интерферон- λ стимулирует антивирусный путь JAK-STAT за счет связывания с рецептором, отличным от рецептора IFN- α . Некоторыми исследованиями было показано, что белки интерферон- λ важны для элиминации ВГС. Все обнаруженные полиморфные локусы рядом с геном *IL-28B*, не влияют на функцию обозначенных ранее генов, и

поэтому вопрос о механизмах влияния этих локусов на элиминацию ВГС остается открытым [Asselah T.J. et al., 2010].

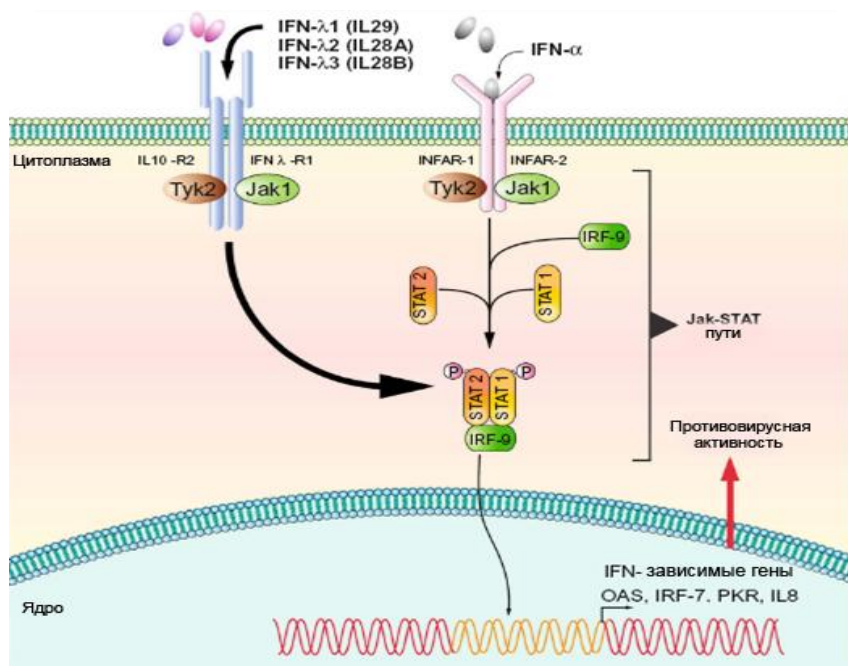


Рисунок 8 – Механизм действия интерферонов. Объяснение в тексте. [Asselah T. J Hepatol. 2010] с незначительными изменениями].

В 2009 г. были опубликованы данные полногеномного исследования ассоциаций (GWAS), в ходе которого была выявлена четкая связь между генетическими вариациями области гена *IL-28B* и результатами комбинированной терапии ВГС пегинтерфероном и рибавирином, а также развитием персистентной формы инфекции и спонтанной элиминации вируса при остром гепатите С [Tanaka Y. et al., 2009]. Ge D. с коллегами проанализировали 1137 больных ВГС генотипа 1, проходивших длительный курс лечения пегилированным интерфероном-α2а или α2b в сочетании с рибавирином. Пациенты, которые достигали УВО (РНК ВГС в крови не выявлялась 24 недели после окончания ПВТ) сравнивались с больными не ответившими на противовирусную терапию [Ge D. I. et al., 2009; Suppiah V. et al., 2009].

Было обнаружено, что полиморфизм rs12979860 C>T в 19 хромосоме ассоциирован с УВО. На расстоянии 3kb от rs12079860

располагается ген *IL-28B*, один из генов кодирующих интерферон λ (INF $\lambda 3$). Генотип CC в локусе rs12979860, может быть маркером благоприятного исхода лечения острого гепатита С. Аллель С почти в два раза реже встречается среди коренных жителей Африки по сравнению с коренными жителями Азии [Thomas D.L. et al., 2009], Европы и Латинской Америки [Thompson A.J. et al., 2010]. Поскольку известно, что пациенты африканского происхождения реже достигают УВО при лечении ВГС, то полиморфизм гена *IL28B* по крайней мере частично могут объяснять разницу в эффективности ПБТ среди афроамериканцев и представителями европеоидной расы [Ge D. et al., 2009].

В ходе GWAS была выявлена прогностическая значимость полиморфизмов rs12979860 при ВГС 1-ого генотипа, в дальнейшем проводилась проверка прогностической ценности генотипов rs12979860 при генотипах вируса 2 и 3. Оказалось, что генотип CC rs12979860 ассоциирован с УВО у пациентов европеоидной расы, инфицированных вирусом генотипа 3 [Mangia A., 2011].

Исследованиями Y.Tanaka среди пациентов Японии, V.Supriah и A.Rauch среди жителей Европы был выявлен другой полиморфизм (rs8099917 T>G), также локализованного около гена *IL28B*, однако эти исследования отличаются от GWAS меньшим масштабом [Tanaka Y. et al., 2009; Supriah V. et al., 2011; Rauch A. et al., 2010]. Tanaka, Supriah и Rauch выявили строгую корреляцию между УВО и генотипом TT rs8099917. В исследовании Rauch и соавт. было показано, что минорная аллель G rs8099917 ассоциирована как с более быстрым развитием фиброза, так и с неудачей при терапии, особенно у пациентов с ВГС 1 и 4 генотипов по сравнению с генотипами вируса 2 и 3. По данным D.H. Sinn в Корее у пациентов с гепатитом С мажорный аллель T rs8099917 ассоциирован с УВО у пациентов с вирусом 1 генотипа, однако такой взаимосвязи не было выявлено для 2 генотипа. В тоже время, авторы

статьи отмечают, что благоприятный аллель T rs8099917 встречается значительно чаще аллели G этого гена среди населения Кореи [Sinn D.H. et al., 2011].

Возможно, что это может быть связано с влиянием полиморфных изменений на уровень экспрессии *IL-28B*. Но результаты исследований о влиянии данных полиморфизмов на экспрессию *IL-28B* противоречивы. В одних работах не выявлена взаимосвязь между полиморфизмом rs12979860 и экспрессией *IL-28B* мононуклеарами периферической крови и клетками печени [Ge D. et al., 2009; Honda M. et al., 2010]. Однако V. Suppiah выявил повышенный уровень *IL-28* среди носителей минорного аллеля G rs8099917 [Suppiah V. et al., 2011]. Генотип TT rs8099917, связанный с благоприятным прогнозом, приводит к пониженному уровню экспрессии интерферон-стимулированных генов (ISG) в печени, а высокий уровень экспрессии ISG перед началом лечения ассоциирован со слабым ответом на лечение пегилированным интерфероном и рибавирином [Honda M. et al., 2010]. Интересен тот факт, что лица с УВО и с негативным результатом лечения (НРЛ) различаются по экспрессионному профилю этих генов до начала лечения [Asselah T. et al., 2008]. Базальный уровень экспрессии INF-зависимых генов был выше у пациентов с НРЛ по сравнению с больными с УВО.

Возможно, что генотип *IL-28B* является маркером экспрессии ISG в печени, но механизм такой взаимосвязи не установлен.

По литературным данным эти две точечные нуклеотидные замены гена *IL-28B* служат маркерами спонтанной элиминации вируса и эффективности лечения. Однако их роль в развитии фиброза печени и влияние на эффективность ПВТ у пациентов восточнославянского происхождения практически не исследована.

2. 5. Трансформирующий фактор роста бета 1 (*TGF-B1*)

Трансформирующий фактор роста бета 1 (*TGF-B1*) является фактором хемотаксиса для нейтрофилов, Т-клеток, моноцитов, фибробластов, участвует в трансформации покоящихся клеток Ито в активированные звездчатые клетки, стимулирует продукцию белков внеклеточного матрикса и ингибирует распад коллагена, подавляя синтез матриксных металлопротеиназ [Taylor A.W., 2009].

Считается, что *TGF-B1* играет ключевую роль в развитии фиброза печени, легких, почек [Parsons C.J et al., 2007]. Внутривенные инъекции препарата *TGF-B1* лабораторным животным приводили к развитию фиброза почек и печени, интраперитонеальное введение вызывало кахексию и генерализованный фиброз. Аналогичные изменения зафиксированы у трансгенных животных с повышенной экспрессией гена *TGF-B1* [Hardie W.D. et al., 2004]. При исследовании методом ОТ-ПЦР биоптатов печени в пробах полученных от больных хроническим гепатитом С была обнаружена экспрессия гена *TGF-B1*, но она отсутствовала в контрольных образцах от здоровых людей. Однако не во всех исследованиях выявлена указанная взаимосвязь [Gewaltig J. et al., 2002]. Было также показано, что после успешного противовирусного лечения степень экспрессии гена *TGF-B1* снижалась параллельно гистологическому улучшению, а у больных с отсутствием эффекта от противовирусной терапии экспрессии гена *TGF-B1* оставалась на прежнем уровне [Kinnman N. et al., 2000].

В норме *TGF-B1* в незначительном количестве секретируется преимущественно клетками Купфера, активированными сателлитными клетками печени, гепатоцитами. При ВГС происходит значительный рост экспрессии *TGF-B1* в сыворотке крови и в паренхиме печени [Wilson et al., 2006]. Core-белок ВГС и его варианты, а также и субгеномные репликоны вируса могут напрямую активировать экспрессию гена *TGF-B1* в гепатоцитах [Schulze-Krebs et al., 2005]. В

тоже время было показано, что концентрация *TGF-B1* обратно коррелирует с активностью репликации вируса (степенью виремии) [Adinolfi et al., 2000]. Механизмы взаимодействия *TGF-B1* и вируса гепатита С до сих пор до конца не ясны.

Ген *TGF-B1* локализован в хромосоме 19q13.1. Аллель +896С гена *TGF-B1* (миссенс мутация в 10 кодоне) способствует ускорению процессинга *TGF-B1*, что приводит к повышению концентрации цитокина в ткани. Полиморфизм +915G/С *TGF-B1* приводит к точечной замене аминокислоты аргинин на пролин в последовательности сигнального пептида, и приводит к изменению секреции *TGF-B1*. Гомозиготный генотип GG полиморфизма +915G/С приводит к более высокой продукции *TGF-B1* по сравнению с гетерозиготным генотипом GC. Powell E. и соавт. обнаружили ассоциацию аллельного варианта CC с прогрессированием фиброза печени [Powell E. et al., 2000].

Интересен тот факт, что нуклеотидные замены в промоторе гена *TGF-B1*, приводящие к снижению экспрессии *TGF-B1*, связаны с элиминацией ВГС [Kimura T. et al., 2006] и степенью вирусной нагрузки [Dai C.Y. et al., 2008; Pereira F.A., 2008]. Однако отечественными исследованиями было показано, что генотипы GC и CC по локусу +915, ассоциированные с низкой продукцией *TGF-B1*, выявлялись достоверно чаще у больных с прогрессирующим течением ХГС [Самоходская Л.М. и соавт., 2007]. Изучение полиморфизма гена *TGF-B1* у коренных жителей Австралии больных ХГС показало, что аллель С ассоциирована с риском прогрессирующего фиброза печени [Powell E.E. et al., 2000]. У лиц восточнославянского происхождения роль данного полиморфизма изучена на небольшой выборке пациентов с ХГС [Абдуллаев С., 2008].

2. 6. Фактор некроза опухоли альфа (*TNF-A*)

Особую роль в формировании противовирусного иммунного ответа играет фактор некроза опухоли альфа (*TNF-A*) [Takizawa T.,

1993]. *TNF-А* - многофункциональный цитокин с выраженной плейотропностью, принимает участие в формировании защитных реакций организма, стимулирует Th-1 клеточный иммунный ответ, фагоцитарную и цитотоксическую активность клеток, регулирует процессы иммунного воспаления. Все это способствует прогрессированию фиброза печени при повышении уровня цитокина *TNF-А* и *IL-1В* контролируют баланс между пролиферацией клеток и апоптозом [Farinati F., 2006].

Одной из важных биологических функций *TNF-А* является его участие в регуляции апоптоза, в том числе в поврежденных вирусом клетках [Jonsson J.R. et al., 2000]. *TNF-А* секретируется различными клетками, например, активированными макрофагами [Vassalli P., 1992], цитотоксическими Т-лимфоцитами в печени [Koziel M.J. et al., 1995].

В литературе имеются многочисленные сообщения, демонстрирующие изменение продукции *TNF-А* при вирусных инфекциях. Повышенный уровень *TNF-А* в плазме крови обнаружен при обострении таких хронических инфекций, как вирусные гепатиты, ВИЧ, герпес Igo типа, Эпштейна-Барр, грипп, полиомиелит, клещевой энцефалит и др. [Ивашкин В.Т. и соавт., 2001; Собчак Д.М. и соавт., 2004]. При ХГС отмечается повышенный уровень *TNF-А* в сыворотке крови и в паренхиме печени у больных [Nelson D.R. et al., 2003]. ВГС стимулирует секрецию *TNF-А* гепатоцитами человека [Gonzalez-Amago R. et al., 1994]. В частности, известно, что увеличение продукции *TNF-А* при хроническом вирусном гепатите С на ранней стадии инфекционного процесса может опосредовать усиленный апоптоз гепатоцитов, обуславливающий разрушение печеночной ткани, с последующим ослаблением апоптотической гибели клеток и, как следствие, возможным развитием злокачественных новообразований [Zylberberg H. Et al., 1999]. Считается, что гиперпродукция этого цитокина 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-A* локализуется в 6 хромосоме в регионе класса III главного комплекса гистосовместимости между HLA-B и HLA-DR [Goyal et al., 2004]. Известно несколько SNP этого гена, локализованных в основном в промоторной области [Zein et al., 2004], наиболее изученным из которых является полиморфизм –308G/A промоторной области гена *TNF-A*. Полиморфизм гена *TNF* в позициях –308, –238, –863 промоторной области влияет на экспрессию *TNF-A* и участвует в патогенезе многих инфекционных заболеваний. Так, например, аллель –863A гена *TNF-A* ассоциируется с болезнью Крона [Negoro K. et al., 1999] и человеческим Т-лимфотропным вирусом I типа [Seki N. et al., 1999].

Результаты исследований участия полиморфного гена *TNF-A* в исходах острого гепатита С противоречивы, что может быть связано с разной этнической принадлежностью пациентов, а также различной величиной выборок. Есть гипотеза, согласно которой *TNF-A* может служить прогностическим маркером исходов ВГС. Известно, что частота встречаемости самопроизвольного клиренса ВГС различна среди представителей европеоидной расы и африканцев. У лиц негроидной расы аллель –863A гена *TNF-A* ассоциирован с клиренсом ВГС; кроме того, гаплотип дикого типа –863C/–308G коррелирует с персистированием вирусной инфекции, хотя таких взаимосвязей не было выявлено среди представителей европеоидной расы [Thio C.L. et al., 2004]. Аллель –863A промотора гена *TNF-A* также ассоциирован с клиренсом вируса у больных ВГС среди населения Сицилии [Lio D. et al., 2003]. Участие полиморфизмов –308 и –238 гена *TNF-A* в элиминации ВГС у лиц европеоидной расы не установлено [Constantini P.K. et al., 2002].

По данным мета-анализа, проведенного Chen Y. и Pei J. на основе результатов 12 исследований за период 2004-2007 гг., не было обнаружено значимой ассоциации между полиморфизмом –308G/A гена *TNF-A* и степенью тяжести, вирусной нагрузкой и частотой самопроизвольной элиминации ВГС среди всех лиц разных этнических групп [Chen Y, Pei J., 2009]. Хотя по данным C.Y. Dai et al. *TNF-a* полиморфизм промотера в позиции –308 коррелирует с тяжестью фиброза и вирусной нагрузкой при ХГС [Dai C.Y. et al., 2006].

Среди лиц европеоидной расы аллель –238A чаще встречается у больных ВГС по сравнению с неинфицированными людьми. Генотип –863CC гена *TNF-A* чаще встречается у больных ХГС [Lio D. et al., 2003], тогда как для полиморфизмов –238G/A и –308G/A такой связи обнаружено не было [Yee L.J. et al., 2000]. У коренных жителей Мексики не было найдено различий в распространенности полиморфизма –238G/A и –308G/A гена *TNF-A* среди больных и здоровых [Trujillo-Murillo K. et al., 2010]. Аллель –308A чаще встречается среди жителей Юго-Восточной Азии с циррозом печени в исходе ХГС [Yee LJ et al., 2000]. Распределение частот аллельных вариантов полиморфизма –308 G/A гена *TNF-A* не связано с риском развития и хронизации вирусного гепатита С среди восточных славян, проживающих на территории Западной Сибири [Пигузова Е. А., 2006]. Анализ полиморфных локусов гена *TNF-A* у пациентов европейской популяции не выявил ассоциаций с эффективностью противовирусной терапии и со скоростью формирования фиброза печени при ХГС. [Larrea E. et al., 1996; Dai C.Y. et al., 2006; Schiemann U. et al., 2003]. Роль ОНП –238 G>A гена *TNF-A* у больных восточнославянского происхождения исследована не достаточно полно [Абдуллаев С., 2008].

2. 7. Эндотелиальная NO – синтаза (*eNOS*)

В патогенезе хронического гепатита С и прогрессировании его в цирроз большое значение имеет нарушение внутripеченочной гемодинамики, что может быть связано с повреждением эндотелиальной выстилки синусоидов и дисфункцией эндотелия [Звягинцева Т.Д., 2005; Newby D.E. et al., 2002]. Эндотелиальная дисфункция характеризуется дисбалансом между продукцией вазодилатирующих, ангиопротективных, протромботических, пролиферативных факторов. Оксид азота (NO) – один из маркеров эндотелиальной дисфункции.

NO – короткоживущая молекула, которая является вторичным мессенджером в большинстве клеток организма и влияет на физиологические процессы практически во всех органах и тканях организма. Оксид азота регулирует межклеточные коммуникации, нейротрансмиссию, иммунологическую защиту и важные сосудистые функции (сосудистый тонус, ангиогенез, артериальное ремоделирование, давление крови). В небольших концентрациях он ингибирует экспрессию молекул адгезии, синтез цитокинов и хемокинов, трансмиграцию и адгезию лейкоцитов. В большом количестве NO обладает цитотоксическим и провоспалительным действием, взаимодействуя с другими медиаторами воспаления [Vitturi DA et al., 2012].

В организме человека радикал NO• образуется из аргинина в результате реакции, которая катализируется ферментом, получившим название NO-синтазы (NOS). Синтаза оксида азота катализирует образование NO и L-цитруллина из L-аргинина и O₂ с использованием донора электронов NADPH. Существует несколько изоформ NOS. Нейрональная NO-синтаза (*nNOS*), или тип 1; эндотелиальная NO-синтаза (*eNOS*), или тип 2; индуцибельная форма (*iNOS*), или тип 3. Разные изоформы отличаются друг от друга локализацией в организме и способом активации. Нейрональная и эндотелиальная NOS – это

конститутивные формы синтазы оксида азота, которые обеспечивают синтез NO в физиологических условиях. Индуцибельные формы в физиологических условиях неактивны. Синтез их увеличивается в ответ на действие патогенных стимулов [Ивашкин В.Т. и др., 2004].

Природа взаимосвязей между функцией эндотелия и окружающими тканями изучена недостаточно полно. К настоящему времени сформировалось представление о дисфункции эндотелия, под которой понимают дисбаланс между медиаторами, обеспечивающими в норме оптимальное течение всех эндотелий-зависимых процессов. Патогенетическая роль эндотелиальной дисфункции доказана при ряде наиболее распространенных заболеваний: (серечно-сосудистых, сахарном диабете), но мало изучена при хронических заболеваниях печени [Петрищев Н.Н. 2003]. Из всех факторов, синтезируемых эндотелием, роль модератора основных функций эндотелия принадлежит эндотелиальному фактору релаксации, или оксиду азота.

NO постоянно синтезируется в эндотелии, является нестабильной молекулой, обладает свойствами сильного окислителя, вызывает повреждение клеток и тканей. В некоторых исследованиях показано, что острые процессы в печени вызывают активацию выработки NO в гепатоцитах, а при хронизации заболевания его биосинтез в органе истощается [Helmy A. et al., 2003]. Однако роль NO в патогенезе ХГС изучена недостаточно, отмечена противоречивость трактовки результатов исследований [Ратникова Л.И., 2002]. Показано, что уровень NO может быть увеличен у пациентов с ХГС [Kirkali G. et al., 2000]. Предполагается участие *eNOS* в развитии портальной гипертензии при циррозе печени [Петрищев Н. Н., 2003]. У больных циррозом печени параллельно с нарастанием степени портальной гипертензии отмечается увеличение концентрации метаболитов NO в плазме крови. На стадии сосудистой компенсации наблюдается достоверное увеличение портального притока и повышение напряжения сдвига (shear stress) на

стенку синусоидов. Напряжение сдвига является уникальным и специфическим физиологическим активатором *eNOS*, что способствует повышению концентрации NO и его метаболитов и позволяет преодолеть возрастание сосудистого сопротивления и сохранить внутрипеченочную микроциркуляцию на уровне, необходимом для полноценного функционирования гепатоцитов. В норме в печени присутствует только конститутивная *eNOS*. Низкий уровень продукции NO этим ферментом обеспечивает печеночную перфузию. Однако, при ряде условий (включая эндотоксемию, геморрагический шок, ишемию-реперфузию, регенерацию печени, инфекции) в печени возрастает экспрессия *iNOS*, которая продуцирует стабильно большое количество NO в печени, являясь важным регулятором и эффектором при воспалении и инфекции [Paloma Martin-Sanz et al., 2002]. В результате многочисленных исследований были продемонстрированы как цитопротективный, так и цитотоксический эффекты NO в печени [Duranski M.R. et al., 2005; Albina J.E. et al., 1998]. Наряду с регуляторными функциями, NO при его продукции в высоких концентрациях обнаруживает и цитостатическую/цитотоксическую активность, что обуславливает его роль в качестве одного из основных эффекторов системы клеточного иммунитета. В значительной степени эта функция NO определяется его влиянием на иницирование и протекание апоптоза, что определяет значение NO при хронических заболеваниях печени, в особенности в процессе фиброгенеза [Canbay A et al., 2004].

Имеется ряд сообщений о развитии фиброзных изменений в печени крыс, при ведении ингибиторов NO. Неселективные ингибиторы NOS значительно увеличивали повреждение гепатоцитов, вызываемое *TNF-А* и липополисахаридами, в то время как инфузии фармакологических доз донаторов NO оказывали протективное

действие. Однако введение *iNOS*-селективных ингибиторов не оказывало такого эффекта [Avila M.A. et al., 1997].

Ген эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS*) локализован в хромосоме 7q35-36, содержит 26 экзонов и кодирует белок с молекулярной массой 135 кД, состоящий из 1203 аминокислот [Nadaud S et al., 1994]. Обнаруженные до настоящего времени варианты гена *eNOS* включают многочисленные точечные мутации: G894T, вариабельность tandemных повторов в интроне 4 и CA-повторов, микросателлитных маркеров генов, в интроне 13 [Colombo M.G. et al., 2003]. Наиболее изученными и прогностически значимыми является однонуклеотидная замена G/T в позиции 894 гена *eNOS*, которая приводит к замене GAG на GAT в 7-м экзоне и к замене остатка глутаминовой кислоты на аспарагиновую в аминокислотной последовательности (Glu298Asp) [Hingorani A.D. et al., 1995]. Показано, что этот полиморфизм ассоциирован с развитием эссенциальной гипертензии [Miyamoto Y. et al., 1998] и спазма коронарных артерий [Yoshimura M. et al., 1998]. Генотип 894TT в экзоне гена *eNOS* чаще выявляется у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями [Cam S.F., 2005; Colombo M.G. et al., 2003]. Аллель T полиморфизма 894A/T гена *eNOS* чаще обнаруживается у пациентов тяжелой стадией первичного билиарного цирроза и у больных с портальной гипертензией [Cheng YQ et al., 2008]. Известно, что *eNOS* играет защитную роль при повреждении печени за счет усиления перфузии, ограничения тромбоза и, возможно, миграции полиморфноядерных лейкоцитов. Повышенный уровень оксида азота может стимулировать ангиогенез, образование микротромбов, ишемические нарушения и фиброз печени [McNaughton L., 2002]. Влияние ОНП гена *eNOS* на эффективность ПБТ и скорость развития фиброза печени у пациентов с ХГС восточнославянского происхождения ранее никем не исследовано.

2. 8. p22phox субъединица NADPH – оксидазы

NADPH-оксидаза (NOX) – клеточный мембранный ферментный комплекс, локализующийся на плазматической мембране и в некоторых органеллах. Этот фермент катализирует восстановление молекулярного кислорода до супероксидного радикала, который затем превращается в перекись водорода и другие токсичные формы кислорода. Существует пять изоформ NOX, отличающихся регуляторными субъединицами. Самой изученной изоформой является NOX2, сначала открытая в фагоцитах, но позже обнаруженная и в других клетках. Ее каталитическая субъединица (gp91phox – phagocyte oxidase) имеет шесть трансмембранных доменов, два ассиметричных гемма и участки связывания FAD и NADPH [Bedard K. Krause K.-H., 2007]. Для активации фермента должна произойти сборка всех регуляторных субъединиц. Кроме субъединиц в сборке активного комплекса принимает участие малая GTPаза Rac1, связанная с GTP [Lambeth J.D., 2004].

Одним из ключевых звеньев патогенеза фиброза печени при хроническом гепатите С является окислительный стресс [Choi J. et al., 2006; Boudreau H.E. et al., 2009]. Пероксидное окисление липидов биологических мембран часто сопутствует развитию фиброза печени. Исследования *in vitro* показали, что из десяти белков вируса гепатита С экспрессия нуклеокапсидного белка, а также неструктурных белков NS3 и NS5 ассоциирована с окислительным стрессом [Bataller R. et al., 2004]. ВГС может индуцировать значительно более высокую продукцию реактивных форм кислорода, чем другие гепатотропные вирусы. Окислительный стресс может активировать звездчатые клетки [Neuman M.G. et al., 2008], способствовать их пролиферации, миграции, а также увеличению продукции цитокинов, в том числе, *TGF-β1*, хемокинов и коллагена [Kitade M. et al., 2009]. Звездчатые клетки приобретают

миофибробластоподобный фенотип и становятся основным источником коллагена I типа и TIMP-1 и TIMP -2.

Исследования, проведенные на моделях печеночного фиброза у трансгенных мышей, показали, что гены, опосредующие продукцию АФК, такие, как NADPH-оксидаза, регулируют как воспалительную активность, так и развитие фиброза [Bataller R et al., 2003]. По результатам недавних исследований считается, что АФК, генерируемые NADPH-оксидазой, вовлечены в *TGF-1B* индуцированный фиброз.

Субъединица p22phox (NADH/NADPH фагоцит-оксидаза), кодируемая геном *CYBA*, – это трансмембранный белок, один из компонентов NADPH-оксидазы, возможно, играет наиболее существенную роль в активации NADPH-оксидазы и имеет ключевое значение в генерации пероксид-аниона в фагоцитах [Lambeth J.D., 2004]. Ген *CYBA* состоит из 7-kb геномного сегмента хромосомы 16q24. В международной базе данных HaploTYPE Map Project представлено, по меньшей мере, 9 распространенных однонуклеотидных замен в этом гене.

Существует два распространенных биаллельных варианта гена *CYBA*, кодирующего p22phox: C242T (4-й экзон) и A640G (3'-нетранслируемая область). Полиморфизм *CYBA* C242T, локализованный в 4 экзоне, представляет наибольший интерес, поскольку структурные изменения данного локуса влияют на структуру фермента. Мутация ведет к аминокислотной замене остатка гистидина на тирозин в позиции 72 белкового продукта, в потенциальном гемм-связывающем центре [Dinauer M.C. et al., 1990]. Функциональное значение C242T полиморфизма связано с оксидазной активностью NADH-оксидазы и последующим изменением продукции супероксид-аниона. Экспрессия субъединицы p22phox, ассоциированной с геном *CYBA* (аллель 242T), сопровождается преобладанием оксидазной активности в гладкомышечных и эндотелиальных клетках и со значительным

повышением активности продукции АФК NADPH-оксидазой. Данные о клинической значимости указанного полиморфизма C242T противоречивы [San J. et al., 2008]. В то время как одни авторы отмечают протективный эффект Т-аллеля в отношении развития эндотелиальной дисфункции и ее проявлений [Inoue N. et al., 1998; Schachinger V. et al., 2001], другие, напротив, указывают на ассоциацию этого генетического маркера с риском сердечнососудистых заболеваний [Leopold J.A. et al., 2005; Perianayagam M.C. et al., 2007], а третьи данной взаимосвязи не выявляют [Castejon A.M. et al., 2006].

Мутации гена *CYBA* ассоциированы с аутосомальным рецессивным хроническим гранулематозом, который характеризуется способностью активированных фагоцитов генерировать супероксид, необходимый для бактерицидной активности этих клеток. Выработка перекисного аниона вовлечена в патогенез артериальной гипертензии и атеросклероза [San J. et al., 2008; Cahilly C et al., 2000]; полиморфизмы гена *CYBA*, включая C242T, ассоциированы с ишемической болезнью сердца (ИБС) [Di Castelnuovo A. et al., 2008].

Учитывая, что баланс между продукцией и метаболизмом активных форм кислорода во внутриклеточных компартментах клетки может влиять на сигнальные механизмы, которые вовлечены в прогрессирование фиброза печени. Возможно, что отдельные аллельные варианты, вызывающие даже небольшие изменения в функции р22phox-содержащих NAD(P)H оксидаз, могут влиять на прогрессирование фиброза при ХГС. И этот факт не был исследован, поэтому необходимо изучить роль ОНП C242T в формировании фиброза печени и достижении УВО при терапии ХГС

2. 9. Однонуклеотидный полиморфизм гена гемахроматоза (HFE)

ХГС часто сопровождается развитием синдрома перегрузки железом (СПЖ), что ухудшает течение и терапию гепатита С [Arber N., et al., 2001]. Избыточное накопление железа в печени может способствовать воспалительно-деструктивному повреждению, ускоряя прогрессирование фиброза [Bacon B.R et al., 2001]. Одним из возможных механизмов возникновения синдрома перегрузки железом могут быть наследственные нарушения обмена железа, в частности связанные с полиморфизмом гена, ответственного за развитие первичного гемохроматоза – гена гемохроматоза, *HFE* (от *High Iron Fe*).

При хронической инфекции ВГС перегрузка железом может быть частично обусловлена вирусной инфекцией. У больных ХГС наблюдается значительное возрастание насыщенности трансферрина железом, увеличение концентрации ферритина сыворотки, железа в печени, снижение уровня сывороточного гепсидина, а также другие изменения в экспрессии генов транспорта железа, что приводит к отложению железа или ферритина в тканях и, как следствие, возникновению СПЖ [Fujita N. et al., 2007].

Исследованиями последних лет было установлено, что гепатоцеллюлярная карцинома в исходе ВГС чаще встречается при сочетании ХГС с СПЖ. Хроническое отложение железа в печени в результате гемохроматоза приводит к повреждению тканей и циррозу, и может стать причиной более быстрого развития фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы [Kowdley K.V., 2004; Kato J. et al. 2007].

Перегрузка железом приводит к появлению свободных радикалов в результате реакции Фентона. Высокоактивные гидроксильные радикалы повреждают липиды, белки и ДНК. Мембрана митохондрий очень чувствительна к окислительному стрессу [Bacon B.R. et al., 1983], и дисфункция митохондрий приводит к гибели гепатоцитов. Звездчатые

клетки печени (клетки Ито) в ответ на повреждение кислородными радикалами трансформируются в коллаген-продуцирующие клетки, способствующие развитию фиброза печени [Galli A. et al., 2005] (Рисунок 8). Активные формы кислорода, возникающие в результате избытка железа в ткани, способствуют развитию воспаления и нарушают нормальное функционирование печени. В некоторых случаях окислительный стресс ассоциирован с онкологическими заболеваниями. Активные формы кислорода снижают экспрессию гепсидина в гепатоцитах за счет снижения активности C/EBP α .

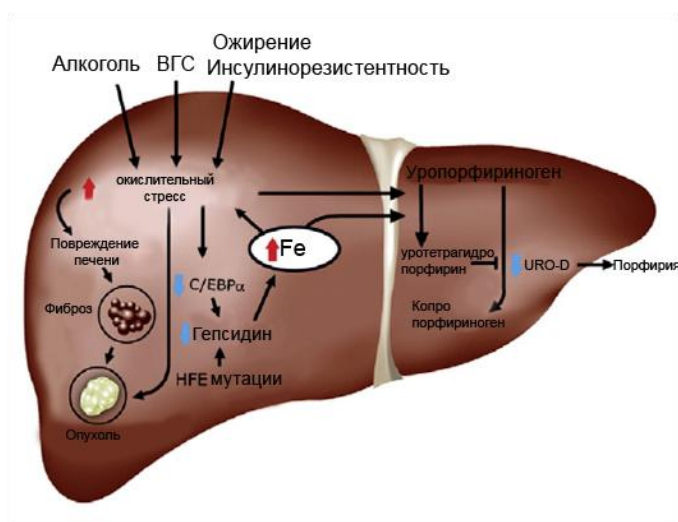


Рисунок 8 – Роль железа в повреждении печени. Окислительный стресс может развиваться при ХГС, алкоголизме, инсулинорезистентности в сочетании с ожирением (метаболический синдром). Повышение уровня железа в печени обостряет окислительный стресс и способствует повреждению ткани и развитию фиброза. URO-D, уropopфopиpиHoгeн дeкapбoкcилaзa. [Wallace D.F. et al., 1997, с незначительными изменениями]

HFE, белок-регулятор обмена железа, напоминающий по структуре главный комплекс гистосовместимости I класса, связывается с рецептором трансферрина, регулирует транспорт железа в макрофаги и влияет на синтез гепсидина, главного регулятора абсорбции железа [Drakesmith H., Prentice A., 2008]. Ген локализован в хромосоме 6p21.3. В нем обнаружены полиморфные локусы, среди которых наиболее значимые +63 и +282. Большинство пациентов с гемохроматозом имеют генотип гена *HFE* в локусе 282 –YY. Самой частой причина развития СПЖ среди населения в Западных странах является наследственный

гемохроматоз, возникающий при гомозиготном YY состоянию гена гемохроматоза в положении 282 (C>Y) [Feder J. N. et al., 1996]. Однако данная мутация более широко распространена среди европейцев и у большинства носителей гетерозиготы не развивается полноценного гемохроматоза. В целом, вклад полиморфизма +282 C/Y в развитие гемохроматоза сильно зависит от популяции, достигая максимально высокого значения в странах Европы, Америки, Австралии и минимального значения в странах Азии, Африки, у коренных жителей Америки и Австралии. В российской популяции среди здоровых людей восточнославянского происхождения гетерозиготные носители гена *HFE* по локусу +282 C/Y составляют около 6,4% [Самоходская Л.М., 2007].

На культурах гепатоцитов *in vitro* было показано, что железо может повышать экспрессию генов вируса гепатита С, возможно, за счет влияния на трансляцию посредством эукариотического инициатора фактора трансляции [Piccioli D. et al., 2005]. В исследованиях с использованием трансгенных мышей, экспрессирующих полипротеин ВГС, было обнаружено, что у таких мышей повышается уровень железа в печени и крови и уменьшается в селезенке [Wallace D.F., 2009]. Повышенное отложение железа приводит к снижению экспрессии гепсидина в печени и повышению экспрессии ферропорина в двенадцатиперстной кишке, печени и селезенке.

Итак, в гене *HFE* наиболее значимыми являются однонуклеотидные полиморфизмы в локусах C282Y и H63D. Присутствие аллели +282C/Y у больных ХГС в большей степени связано с возникновением клинических признаков гемохроматоза, чем присутствие других аллелей гена *HFE*. Роль этих двух ОНП в развитии фиброза печени и достижения УВО при терапии ХГС изучена не достаточно полно у лиц восточнославянского происхождения [Кулагина Е.А., 2006].

1. 5. Заключение

В результате анализа литературных данных были выявлены наиболее значимые факторы хозяина и патогенна, которые могут влиять на эффективность противовирусной терапии и скорость развития фиброза печени.

Среди факторов пациента для исследования представляют наибольший интерес 11 полиморфных локусов генов ответственных за иммунный ответ, связанных с эндотелиальной дисфункцией и с гемахроматозом. Согласно данным зарубежных и отечественных ученых однонуклеотидные замены в данных локусах приводят к изменениям в структуре белка и могут оказывать влияние на эффективность ПВТ и скорость фиброзирования печени. Зная генетический профиль пациентов по этим полиморфным локусам, можно будет разработать наиболее эффективную стратегию лечения и предположить его исход еще до начала терапии.

Также, важную роль в течении инфекции играют факторы патогена. При анализе пациентов восточнославянского происхождения будут исследованы такие факторы как: субтип вируса, которым инфицирован пациент, количество квазивариантов по 1ГВР и вирусологическая нагрузка. Согласно зарубежным и отечественным авторам различные варианты по данным показателям оказывают влияние на эффективность противовирусной терапии и скорость формирования фиброза печени.

Учитывая, что в Российской Федерации преобладают пациенты, инфицированные ВГС субтипов 1b и 3a, то изучение влияния вышеперечисленных ОНП генов на скорость развития фиброза и эффективность терапии при ХГС в сочетании с отдельными субтипами вируса является актуальным.

Глава 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3. 1. Пациенты

В исследование включено 191 пациент с хроническим гепатитом С, наблюдавшихся в Клинической инфекционной больнице №2 и Клинике нефрологии, внутренних и профессиональных заболеваний им. Е.М. Тареева, в период с января 2007 года до января 2012 года. Этиологическая связь поражения печени с инфекцией вируса гепатита С была подтверждена выявлением антител к ВГС и ВГС РНК в сыворотке крови. У всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании. Факторы риска инфицирования больных устанавливались путем опроса по стандартному протоколу каждого из исследовательских центров. Когорта пациентов была поделена на группы, как представлено ниже (Рисунок 8).

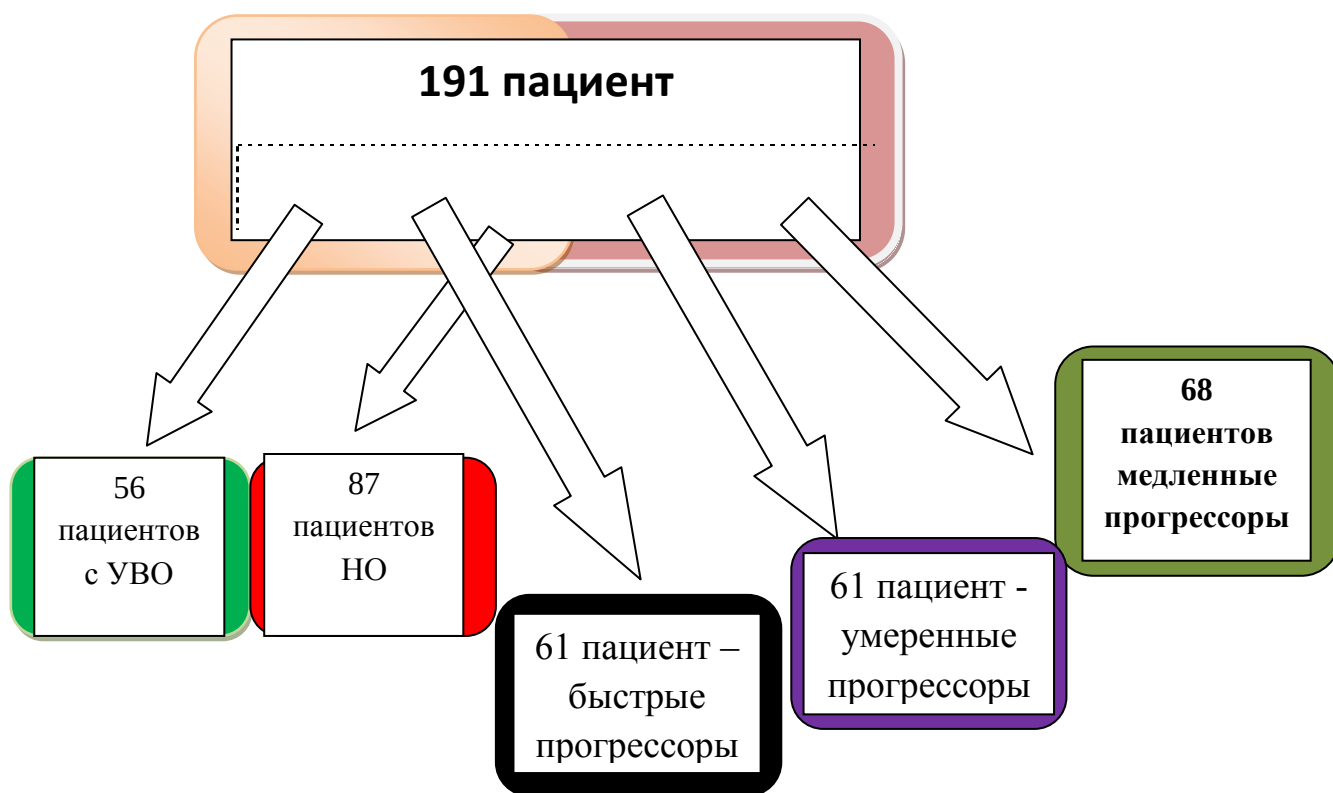


Рисунок 8 – Схема анализируемых групп пациентов

Критериями включения в основную группу (191 человек) были: 1) хронический гепатит С; 2) отсутствие хронических гепатитов В и D, ВИЧ, диабета, онкологических и других хронических инфекционных заболеваний; 3) восточнославянское происхождение. В работе были обследованы пациенты в возрасте от 18 до 58 лет средний возраст $38,8 \pm 1,6$ года, гендерное соотношение: 103 мужчин и 88 женщин.

В зависимости от скорости фиброзирования печени участники исследования были поделены на 3 группы: с медленной скоростью фиброирования (до 0,11 единиц/год), с умеренной скоростью (0,11-0,21 единиц/год) и с быстрой скоростью (выше 0,21 единиц/год). При оценке скорости фиброирования печени учитывали данные пункционной биопсии или фиброэластография печени. Стадию фиброза оценивали по шкале METAVIR. Скорость фиброирования печени определяли, как частное от деления на время от предыдущего анализа или от первого определения маркера инфицирования ВГС.

Расчет скорости фиброза печени

Стадия фиброза печени оценивались по шкале METAVIR (F_0 , F_1 , F_2 , F_3 , F_4). Определение скорости фиброирования печени выполняли по формуле:

Скорость прогрессирования фиброза (V_f) [ед. фиброза/г] = $\frac{F_2 - F_1}{\Delta t}$, где:

F_1 – стадия фиброза печени по шкале METAVIR при первой биопсии,

F_2 – стадия фиброза печени по шкале METAVIR при второй биопсии,

Δt – промежуток времени между повторными биопсиями, годы.

Ниже приведена таблица, описывающая критерии распределения пациентов на группы с разной скоростью развития фиброза печени (Таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика групп больных с разной скоростью фиброзирования печени

Медленная скорость развития фиброза*	Умеренная скорость развития фиброза	Быстрая скорость развития фиброза
Скорость формирования фиброза <0,11 ед/год	Скорость формирования фиброза 0,11-0,21 ед/год	Скорость Формирования фиброза более 0,22 ед/год
АЛТ и АСТ менее двух норм	АЛТ и АСТ менее четырех норм	АЛТ и АСТ более четырех норм
Вирусная нагрузка <5,5x10 ⁵ МЕ/мл	Вирусная нагрузка 5,5x10 ⁵ -10 ⁶ МЕ/мл	Вирусная нагрузка от 10 ⁴ до 10 ⁷ МЕ/мл

* - группа пациентов с медленной скоростью развития фиброза печени была названа – медленные прогрессоры, как принято в зарубежной литературе

В таблице 3 показаны клинико-анамнестические данные в группах с разной скоростью фиброзирования печени.

Таблица 3 – Характеристика групп пациентов с ХГС

Показатели	Группа с медленным развитием ФП (n=69)	Группа с умеренным развитием ФП (n=61)	Группа с быстрым развитием ФП (n=61)
Возраст, годы.	40,8±2,2	42,3±1,9	50,5±1,7
Женщины	59,42%(41)	45,90%(28)	55,74%(34)
Мужчины	40,58%(28)	54,10%(33)	44,26%(27)
Скорость формирования ФП, единиц/год	0,06±0,05	0,17±0,02	0,22±0,01

Из 191 человека с диагнозом хронический гепатит С проведено лечение противовирусными препаратами 143 пациентам. Остальные пациенты имели противопоказания к лечению либо отказались от него.

Группа пациентов, прошедших курс терапии состояла из 143 человек. Больным был проведен 24-х и 48-и недельный курс терапии пегилированным интерфероном-альфа - ИФН- α 2а в комбинации с рибавирином. При выборе длительности лечения учитывали субтип вируса. Пациентов, инфицированных вирусом субтипа 1b и 2k/1b, лечили 48 недель, а 3а и 2а – 24 недели. Через 6 месяцев после окончания терапии были сформированы группы больных с устойчивым вирусологическим ответом (УВО) и не ответившие на противовирусную терапию (НО).

Сравниваемые группы больных имели практически равное соотношение мужчин и женщин (Таблица 4). В исследуемых группах доля мужчин молодого возраста, недавно инфицированных ВГС, была больше, чем доля молодых женщин, группа НО была старше.

Таблица 4 – Анамнестические данные в группах пациентов перед началом терапии

Показатели	Группа УВО (n=56)	Группа НО (n=87)	Уровень значимости, p
Возраст пациента, годы	39,7 $\pm$ 1,4	44,3 $\pm$ 1,8	p<0,05
Мужчины	25 (44,64%)	41 (47,13%)	p>0,05
Женщины	31 (55,36%)	46 (52,87%)	p>0,05

3. 2. Вирусологические методы

Выявление РНК ВГС и антител к вирусным антигенам, генотипирование вируса, определение межгенотипной рекомбинации, вирусной нагрузки, количества квазивариантных форм, а также расчет статистических различий по монофакторным признакам осуществляли

на базе ФГБУ «Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского», Министерства Здравоохранения России.

Обнаружение РНК ВГС с чувствительностью 50 МЕ/мл

Для детекции РНК ВГС из 200 мкл образца сыворотки крови экстрагировали общую фракцию РНК гуанидин-тиоционатным методом. Синтез кДНК и «гнездовой» вариант ОТ-ПЦР проводили с праймерами [Okamoto M. et. al., 1990] на 5'-некодирующий регион геномной РНК ВГС.

Синтез кДНК проводили при использовании праймера 5'-ТАТ СAG GCA GTA CCA CAA GG -3'.

«Гнездовой ПЦР»: в 1-ом раунде ПЦР амплифицировался участок генома длиной 254 нуклеотида с праймерами 5'-СТG TGA GGA ACT ACT GTC TT- 3' и 5'-ТАТ СAG GCA GTA CCA CAA GG -3' (35 циклов при 94 °C – 30 сек/55 °C – 30 сек/72 °C – 90 сек); во втором раунде ПЦР амплифицировался участок генома длиной 207 нуклеотида с праймерами 5'-ТТС ACG CAG AAA GCG TCT AG -3' и 5'-ACC CAA CAC TAC TCG GCT AG -3' (25 циклов при 94 °C – 30 сек/55 °C – 30 сек/72 °C – 60 сек). Анализ и визуализация продуктов реакции проводили электрофорезом в 2% агарозном геле. Чувствительность этого лабораторного метода – 50 МЕ/мл.

Выполнено совместно с к.б.н. Самохваловым Е. И., к.б.н. Альховским С. В.

Определение РНК ВГС с высокой чувствительностью (15 МЕ/мл)

Выделение РНК ВГС из сывороток крови пациентов проводили с помощью набора реагентов для выделения РНК ВГС «РеалБест» РНК ВГС, качественный вариант» (ЗАО «Вектор-Бест», РФ) по приведенной ниже схеме. К 1 мл сыворотки крови пациентов добавляли 1 мл

концентрирующего раствора, центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин и удаляли надосадочную жидкость. Далее к осадкам добавляли 700 мкл лизирующего раствора, содержащий сорбент с парамагнитными частицами и выдерживали на термошейкере при 56 °C в течение 10 мин с частотой вращения 1300 об/мин. После этого в каждую пробирку добавляли по 750 мкл осадителя нуклеиновых кислот, перемешивали на вортексе и центрифугировали при 13000 об/мин 5 мин. Пробирки устанавливали в магнитный штатив и удаляли надосадочную жидкость. Затем производили двухстадийную отмывку осадка, и центрифугирование при 13000 об/мин. Осадки высушивали при комнатной температуре в течение 2-3 мин. К подсушенным осадкам добавляли 200 мкл элюирующего раствора, тщательно ресуспендировали на вортексе, и инкубировали в термошейкере при 56 °C в течение 10 мин с частотой вращения 1300 об/мин, получая на выходе пробы, содержащие РНК ВГС, и готовые к постановке ОТ-ПЦР.

ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили на регистрирующем амплификаторе Rotor-Gene 6000 фирмы Corbett Research, Inc. (Австралия). Амплификация проводилась по следующей схеме:

1 стадия: 45 °C – 30 мин;

2 стадия: 94 °C – 1 мин;

3 стадия 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 20 сек).

Измерение флуоресценции проводили при 60°C по каналам “FAM” и “ROX” для ДНК и двух внутренних контрольных образцов и кДНК ВГС.

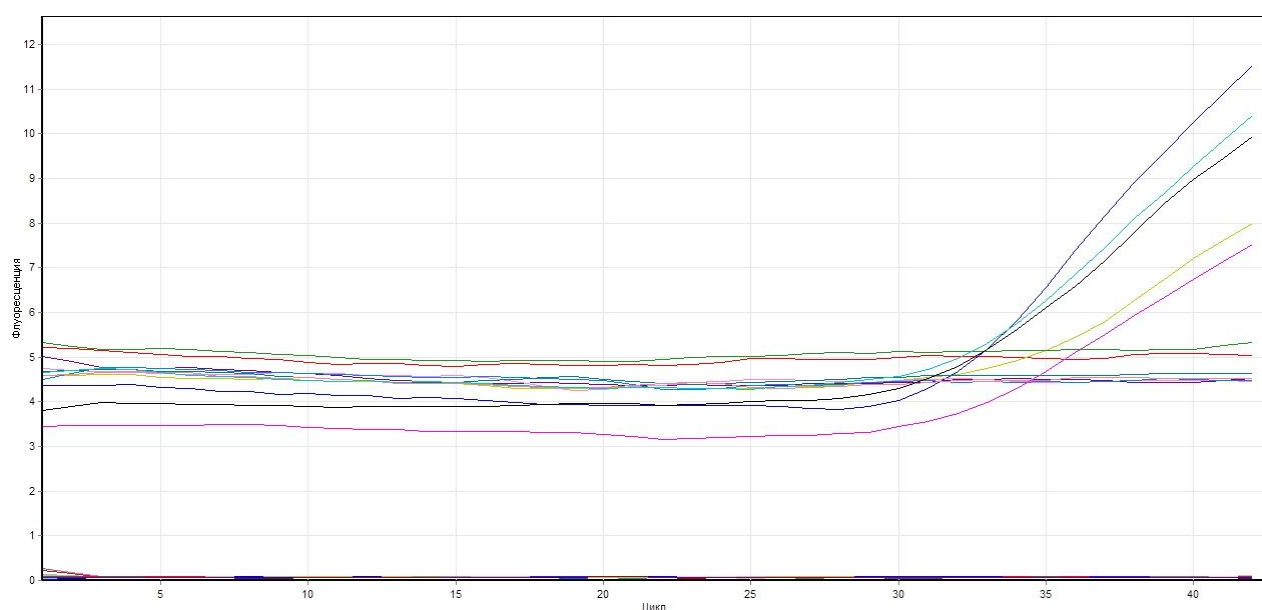


Рисунок 9 – Результат анализа 10 проб: 5 с положительным и 5 с отрицательным контрольными образцами.

Выполнялось совместно с д.б.н. Николаевой Л. И., Гришечкиным А. Е.

Количественный анализ РНК ВГС

Вирусную нагрузку определяли с помощью коммерческой тест-системы «ОТ-гепатоген-С-количественный» («ДНК-технология», Россия) с чувствительностью 300 МЕ/мл. Анализ состоял из следующих этапов: выделение РНК (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции, ПЦР амплификация кДНК ВГС в режиме реального времени.

На стадии выделения РНК в реакционную смесь добавляют внутренний контрольный образец, предназначенный для оценки эффективности всех этапов исследования. ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутренних контрольных образцов, помечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации искомой ДНК и внутренних контрольных образцов.

Для проведения количественной оценки РНК HCV набор реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный включает калибровочные образцы ВГС-РНК в различной концентрации.

Для анализа продуктов используют детектирующий амплификатор Rotor-Gene-3000 фирмы Corbett Research (Австралия).

Для повышения чувствительности и специфичности реакции применяли «горячий» старт, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенной прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в амплификационную смесь происходит после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

Выполнено совместно с к.б.н. Самохваловым Е. И., к.б.н. Альховским С.В.

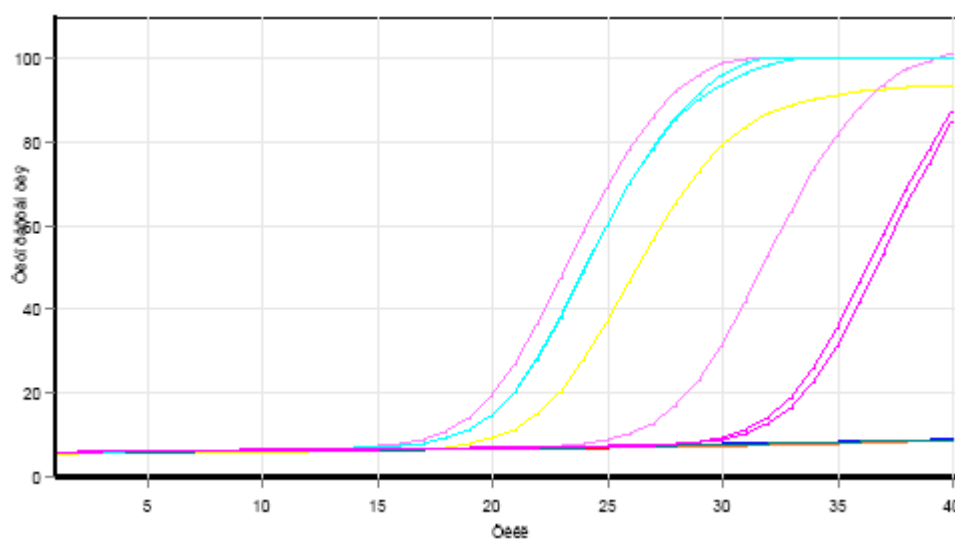


Рисунок 10 – Количественный анализ РНК ВГС

Определение количества квазивариантов по 1ГВР(HVR1)

Анализ конформационного полиморфизма однонитевой ДНК – SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) – заключается в косвенном анализе вторичной структуры одноцепочечной ДНК на основании ее подвижности при гель-электрофорезе. При разделении

двух цепей ДНК каждая из них за счет водородных связей между азотистыми основаниями внутри цепи образует вторичные структуры – «шпильки». Вторичная структура зависит от первичной структуры, т. е. от нуклеотидной последовательности ДНК. Таким образом, при замене одного из нуклеотидов меняется вторичная структура, и как следствие, электрофоретическая подвижность фрагмента. Это позволяет анализировать полиморфизм фрагментов 1 ГВР.

Методика SSCP включает в себя амплификацию целевого фрагмента (последовательности праймеров указаны ниже), разделение продуктов в высокоразрешающем электрофорезе в градиентном полиакриламидном геле. Характеристика геля и фореа: гель полиакриламидный, градиент 7-15%; в лунку наносили 5 мкл смеси; условия фореа: 5 ма, $V=120$ В, в течении 4 часов при температуре $+4$ °С. Для визуализации гель окрашивали в 0,5 мкг/мл растворе бромистого этидия в течении 20 минут. Отмывали дистиллированной водой, наличие фрагментов определяли флуоресценцией при длине волны 340 нм.

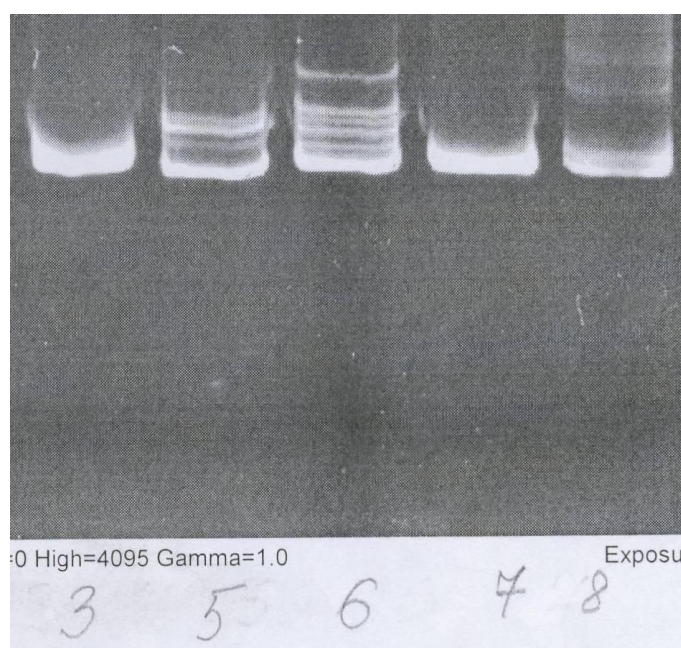


Рисунок 11 – ПАА (полиакриламидный) гель с продуктами ОТ-ПЦР на область 1ГВР из образцов пациентов.

Синтез кДНК для амплификации ГВР1 из РНК ВГС

Последовательности праймеров к 1ГВР: Внешние праймеры F1-TGGCTTGGGATATGATGATGAACT и R1-GCAGTCCTGTTGATGTGCCA; внутренние праймеры F2-GGATATGATGATGAACTGGT и R2-ATGTGCCAGCTGCCGTTGGTGT [Ramachandran G. et al., 2008]

Схема ПЦР:

Первый раунд ПЦР (40 циклов при 94 °C – 30 сек/94 °C – 20 сек/60 °C – 20 сек/72 °C – 60 сек)

Второй раунд ПЦР (25 циклов при 94 °C – 30 сек/94 °C – 20 сек/56 °C – 20 сек/72 °C – 40 сек).

Выполнено совместно с к.б.н. Самохваловым Е. И., д.б.н. Николаевой Л.И., м.н.с. Арутюновой М. А.

Генотипирование вируса

Генотипирование ВГС выполняли методом ОТ-ПЦР с системой генотип-специфических праймеров, позволяющих идентифицировать субтипы 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a и 6a [Т. Оно et al., 1997]. Для этого проводили несколько ПЦР.

В первом раунде, используя указанные ниже праймеры, получали ампликон, содержащий область core с последовательностью с 1-го по 400-ый нуклеотидный остаток. Смысловый праймер: 5`-GGGAGGTCTGTAGACCGTGCACCATG-3` и антисмысловый праймер: 5`-GAG(AC)GG(GT)AT(AG)TACCCATGAG (AG)TCGGC-3`.

Второй раунд ПЦР проводили с двумя наборами генотип-специфических праймеров, которые указаны ниже.

Первый набор антисмысловых праймеров:

Общий праймер S7: 5`-AGACCGTGCACCATGAGCAC-3`

S2a: 5`-AACACTAACCGTCGCCACAA-3`

G1b: 5`-CCTGCCCTCGGGTTGGCTA(AG)-3`

G2a: 5`-CACGTGGCTGGGATCGCTCC-3`

G2b: 5`-GGCCCCAATTAGGACGAGAC-3`

G3b: 5`-CGCTCGGAAGTCTTACGTAC-3` – праймеры на определение соответствующих субтипов вируса.

Второй набор антисмысловых праймеров:

Общий праймер S7: 5`-AGACCGTGCACCATGAGCAC-3`

G1a: 5`-GGATAGGCTGACGTCTACCT-3`

G3a: 5`-GCCCAGGACCGGCCTTCGCT-3`

G4: 5`-CCCGGGAACTTAACGTCCAT-3`

G5a: 5`-GAACCTCGGGGGGAGAGCAA-3`

G6a: 5`-GGTCATTGGGGCCCCAATGT-3` – праймеры на определение соответствующих субтипов вируса.

Условия проведения ПЦР были, как описано Оно Т. и соавторами [Т. Ohno et al., 1997].

Генотип и субтип вируса устанавливали по длине визуализируемого продукта в агарозном геле. Субтипу 1a соответствовал продукт длиной 208 пар оснований (п.о.), субтипу 1b – 234 п.о., 2a – 139 п.о. и 190 п.о., 2b – 337 п.о., 3a – 232 п.о., 3b – 176 п.о., генотипу 4 – 99 п.о., субтипу 5a – 320 п.о., 6a – 336 п.о.

Выполнено совместно с к.б.н Самохваловым Е.И., к.б.н. Альховским С.В.

Определение межгенотипной рекомбинации

Для определения межгенотипной рекомбинации проводили секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли методом Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems», США), согласно рекомендации производителя. Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей производили с применением пакета прикладных программ «DNASTAR» («DNASTAR Inc.», США). Генотипирование и

выявление межгенотипной рекомбинации проводили сравнением полученного сиквенса по базе данных GeneBank NCB1 в системе «Blast» («DNASTAR»), анализируя регион core (254 п.н.) и область NS5B (длина фрагмента 380 п.н., с 8256 по 8636. Сведения о межгенотипных рекомбинантах представлены в таблице 1 (литературный обзор стр. 29).

Праймеры для NS5b: Первая ПЦР (смысловая последовательность) 5`-TAT GAY ACC CGC TGY TTT GAC TC-3` и (антисмысловая последовательность) 5`- GCN GAR TAY CTV GTC ATA GCC TC-3` (35 циклов при 94 °C – 1 минута/94 °C – 30 сек/55 °C – 30 сек/72 °C – 90 сек). Вторая ПЦР 5`-TAT GAY ACC CGC TGY TTT GAC TC-3` и 5`- GCT AGT CAT AGC CTC CGT-3` (25 циклов при 94 °C – 1 минута/94 °C – 30 сек/55 °C – 30 сек/72 °C – 60 сек), где Y=C или T, R= A или G, V=A, C или G, N=A,T,G или G [Laperche S. et. al., 2005].

Выполнено совместно с к.б.н. Самохваловым Е. И., к.б.н. Альховским С. В.

3. 3. Молекулярно - генетические методы

Определение полиморфизма исследуемых генов

Выделение геномной ДНК пациентов, определение аллельных вариантов генов пациентов, обработку данных различными статистическими методами и многофакторный анализ осуществляли на кафедре биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины ФГОУ ВПО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова». Многофакторный анализ проводился совместно с доктором физико-математических наук, сотрудником кафедры теории вероятностей механико-математического факультета МГУ Яровой Еленой Борисовной.

Выделение геномной ДНК

Венозную кровь в объеме 5 мл забирали в пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта (1 объем раствора 0,5 М Na₂-ЭДТА, pH 8,0 + 9 объемов крови). После тщательного перемешивания образцы помещали в морозильную камеру и хранили при –20 °С. Выделение геномной ДНК проводили с помощью набора «ДНК-сорб-Б» производства ЦНИИЭ. Для выделения ДНК в 1,5 мл пробирку (типа Eppendorf) вносили 700 мкл размороженной крови и 700 мкл гемолитика, перемешивали на вортексе и осаждали клетки центрифугированием 3 минуты при 7000 об/мин. Затем из пробирок удаляли 700 мкл надосадочной жидкости. Клеточный осадок ресуспендировали на вортексе или постукивая о дно пробирки, после чего добавляли 750 мкл гемолитика и повторяли осаждение клеток центрифугированием 3 минуты при 7000 об/мин. Удаляли всю надосадочную жидкость. Процедуру повторяли дважды, пока осадок не становился бесцветным либо слабоокрашенным. К клеточному осадку добавляли 300 мкл лизирующего буфера. Осадок ресуспендировали пипетированием, после чего инкубировали 10 минут при 60 °С на термошейкере с постоянным перемешиванием (850 об/мин). Затем производили разделение фаз центрифугированием 5 минут при 10000 об/мин. Верхнюю (водную) фазу (300 мкл) переносили в новую пробирку. К образцам добавляли по 25 мкл ресуспендированного сорбента, перемешивали на вортексе и оставляли на 5 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая; затем осаждали сорбент центрифугированием в течение 30 секунд при 3000 об/мин, удаляли супернатант. Далее добавляли 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, осаждали сорбент центрифугированием в течение 30 секунд при 3000 об/мин., удаляли супернатант. Добавляли в пробы раствор для отмывки 2, перемешивали на вортексе и разделяли фазы центрифугированием в

течение 30 секунд при 10000 об/мин., удаляли супернатант. Повторяли процедуру отмывки раствором 2, удаляли супернатант полностью. Пробирки помещали с открытыми крышками на 7 минут в термостат на 65 °С, для подсушивания сорбента. В пробирки добавляли по 50 мкл ТЕ-буфера (10 mM Трис-HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА) для элюции ДНК, помещали в термошейкер на 5 мин при 65 °С, с перемешиванием после чего ДНК осаждали центрифугированием в течение 1 мин при 10000 об/мин и отбирали супернатант, не затрагивая сорбента. Супернатант содержит ДНК в концентрации около 50 нг/мкл., готовую к постановке ПЦР. Измеряли концентрацию ДНК на спектрофотометре Nanodrop модели Eppendorf. ДНК хранили при –20 °С.

Методы идентификации аллельных вариаций полиморфных локусов генов пациентов

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на термоциклере Master Cycler Gradient фирмы Eppendorf с применением соответствующих праймеров и 10 мкл ПЦР-смеси (производитель «Интерлабсервис»), содержащей 2 mM MgCl₂, ДНК-полимеразу *Taq* и краситель «Крезоловый красный». Визуализацию результатов осуществляли путем электрофореза в 2 % агарозном геле с бромистым этидием при 150 В и 290 мА. Размер фрагментов определяли с помощью стандарта размеров длин фрагментов ДНК фирмы Life Technologies. Полиморфность генов определяли с помощью метода ПДРФ (полиморфизм длин рестриктных фрагментов) и методом ПЦР в режиме «реального времени» на амплификаторе Rotor-Gene-3000 фирмы Corbett Research и на детектирующем амплификаторе ДТ-96 фирмы ДНК-технология.

Таблица 5 – Праймеры и рестриктазы для определения аллельных вариантов

<u>Полиморфизм</u>	<u>Праймеры</u>	<u>Рестриктаза</u>
<i>IL-1B</i> 511 C/T	S 5' – TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC – 3' AS 5' – GTT TAG GAA TCT TCC CAC TT – 3'	Ava-I
<i>IL-6</i> -174 G/C	S 5' – TGA CTT CAG CTT TAC TCT TTG T – 3' AS 5' – CTG ATT GGA AAC CTT ATT AAG – 3'	SfaNI
<i>IL-10</i> -1082 G/A	S 5' – TTC CCC AGG TAG AGC AAC ACT – 3' AS 5' – GAT GGG GTG GAA GAA GTT GAA – 3'	MnII
<i>TGF-β1</i> +915 G/C	S 5' – TTC CCT CGA GGC CCT CCT A – 3' AS 5' – GCC GCA GCT TGG ACA GGA TC – 3'	BglI
<i>eNOS</i> +894 C/T	S 5' – GGC TGG ACC CCA GGA AAC – 3' AS 5' – CCA CCC AGT CAA TCC CTT TG – 3'	MboI
p22phox +242 C/T	S 5' – CTC TGT GTT GTC TTC AGT AAA GG – 3' AS 5' – ACT CAC AGG AGA TGC AGG ACG – 3'	RsaI
<i>TNF-α</i> -238 G/A	S 5' – AGA AGA CCC CCC TCG GAA CC – 3' AS 5' – ATC TGG AGG AAG CGG TAG TG – 3'	MspI

Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для детекции исследуемых полиморфизмов проводили амплификацию определенных участков соответствующих генов. Для определения полиморфных аллелей генов цитокинов, гена эндотелиальной NO-синтазы и гена субъединицы p22-phox NADPH-оксидазы использовали метод полиморфизма длины рестриктных фрагментов (ПДРФ), гена *HFE* – метод ПЦР в режиме «реального времени», а для определения аллельных вариаций гена *IL28B* использовали коммерческую тест-систему фирмы «ДНК-технология».

Определение полиморфизма G894T гена эндотелиальной NO-синтазы проводили методом ПЦР-ПДРФ. После горячего старта и первой денатурации (94 °C, 5 мин) проводили амплификацию из 35 циклов, каждый из которых включал: денатурацию (95 °C, 10 сек), отжиг праймеров (61 °C, 30 сек), элонгацию (72 °C, 45 сек). ПЦР проводили в смеси объемом 25 мкл, включавшей в себя по 10 пмоль каждого праймера, 200 мкМ каждого дНТФ, 1 мкл (около 50 нг) геномной ДНК и

ПЦР смесь фирмы «Интерлабсервис». 8,5 мкл ПЦР-продукта длиной 198 п.н. инкубировали при 37 °С с 0,5 мкл (10 Ед.) рестриктазы *MboI* и 1 мкл 10-кратного буфера для рестрикции. Продукты рестрикции визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия. Присутствие аллеля G выявляли по наличию одного фрагмента: 152 п.н., аллеля Т – по наличию двух фрагментов: 92 и 60 п.н. (Рисунок 12).

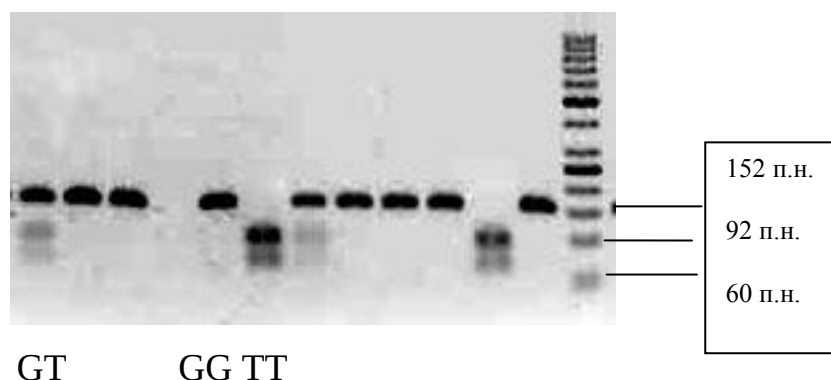


Рисунок 12 – Детекция полиморфизма G894T гена *eNOS* эндотелиальной NO-синтазы с помощью анализа длин рестриктных фрагментов.

Определение полиморфизма C242T субъединицы p22-phox NADPH-оксидазы проводили методом ПЦР-ПДРФ. После горячего старта и первой денатурации (94 °С, 5 мин) проводили амплификацию из 35 циклов, каждый из которых включал: денатурацию (95 °С, 10 сек), отжиг праймеров (61 °С, 30 сек), элонгацию (72 °С, 45 сек). ПЦР проводили в смеси объемом 25 мкл, включавшей в себя по 10 п/моль каждого праймера, 200 мкМ каждого дНТФ, 1 мкл (около 50 нг) геномной ДНК и ПЦР смесь фирмы «Интерлабсервис». 8,5 мкл ПЦР-продукта длиной 198 п.н. инкубировали при 37 °С с 0,5 мкл (10 Ед.) рестриктазы *RsaI* и 1 мкл 10-кратного буфера для рестрикции. Продукты рестрикции визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия. Присутствие аллеля С выявляли по наличию двух фрагментов: 396 и 113 п.н., аллеля Т – по наличию трех фрагментов: 316, 113, 80 п.н. (Рисунок 13).

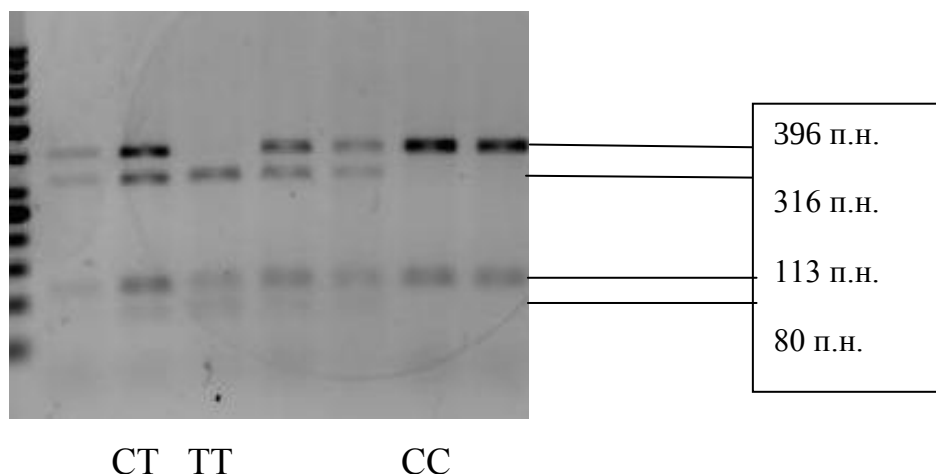


Рисунок 13 – Детекция полиморфизма C242T гена *CYBA* субъединицы p22-phox NADPH-оксидазы с помощью анализа длин рестриктных фрагментов

Определение полиморфизма G-174C гена *IL-6* проводили методом ПЦР-ПДРФ. После горячего старта и первой денатурации (94 °C, 10 мин) проводили амплификацию из 35 циклов, каждый из которых включал: денатурацию (94 °C, 10 сек), отжиг праймеров (55 °C, 35 сек), элонгацию (72 °C, 60 сек). ПЦР проводили в смеси объемом 25 мкл, включавшей в себя по 8 пмоль каждого праймера, 200 мкМ каждого дНТФ, 1 мкл (около 50 нг) геномной ДНК и ПЦР смесь фирмы «Интерлабсервис». 8,5 мкл ПЦР-продукта длиной 198 п.н. инкубировали при 37 °C с 0,5 мкл (3 Ед.) рестриктазы *SfaNI* и 1 мкл 10-кратного буфера для рестрикции. Продукты рестрикции визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия. В случае присутствия аллеля G образовывались фрагменты 140 и 58 п.н. При наличии аллеля C сайт рестрикции отсутствует, фрагмент 198 п.н. (Рисунок 14).

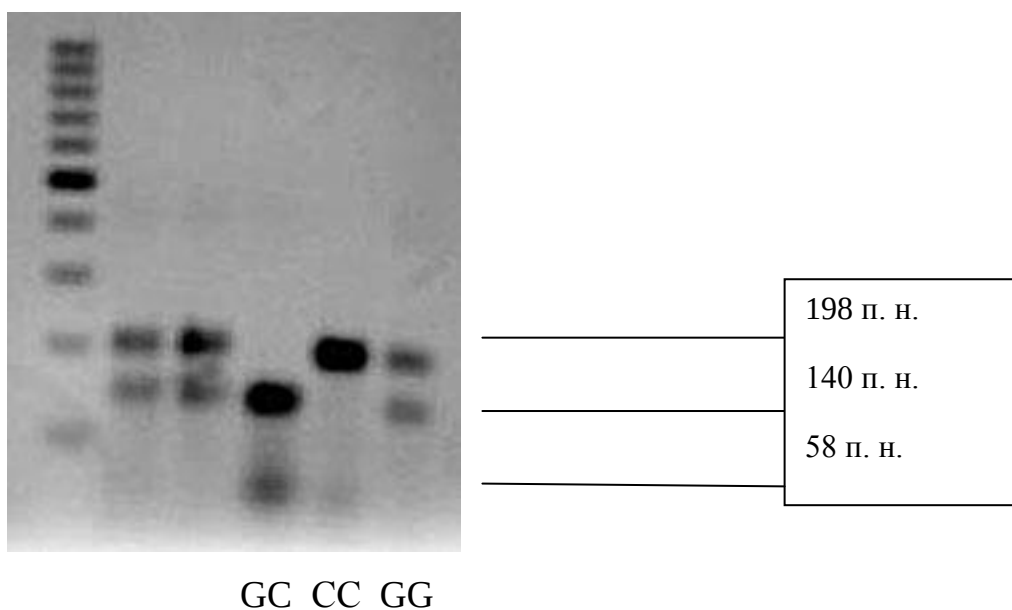


Рисунок 14 – Детекция полиморфизма G-174C гена *IL-6* с помощью анализа длин рестриктивных фрагментов

Определение полиморфизма -511 С/Т гена *IL-1b* проводили методом ПЦР-ПДРФ. После горячего старта и первой денатурации (94 °С, 2 мин) проводили амплификацию из 32 циклов, каждый из которых включал: денатурацию (94 °С, 30 сек), отжиг праймеров (55 °С, 1 мин), элонгацию (74 °С, 1 мин). ПЦР проводили в смеси объемом 25 мкл, включавшей в себя по 10 пмоль каждого праймера, 200 мкМ каждого дНТФ, 1 мкл (около 50 нг) геномной ДНК и ПЦР смесь фирмы «Интерлабсервис». 8,5 мкл ПЦР-продукта длиной 306 п.н. инкубировали при 37 °С с 0,5 мкл (3 Ед.) рестриктазы *Ava-I* и 1 мкл 10-кратного буфера для рестрикции. Продукты рестрикции визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия. В положении –511 промотора гена *IL-1B* С-аллель содержит сайт рестрикции и обнаруживается по наличию двух фрагментов 190 и 116 п.н., Т-аллель сайта рестрикции не содержит, фрагмент – 306 п.н. (Рисунок 15).

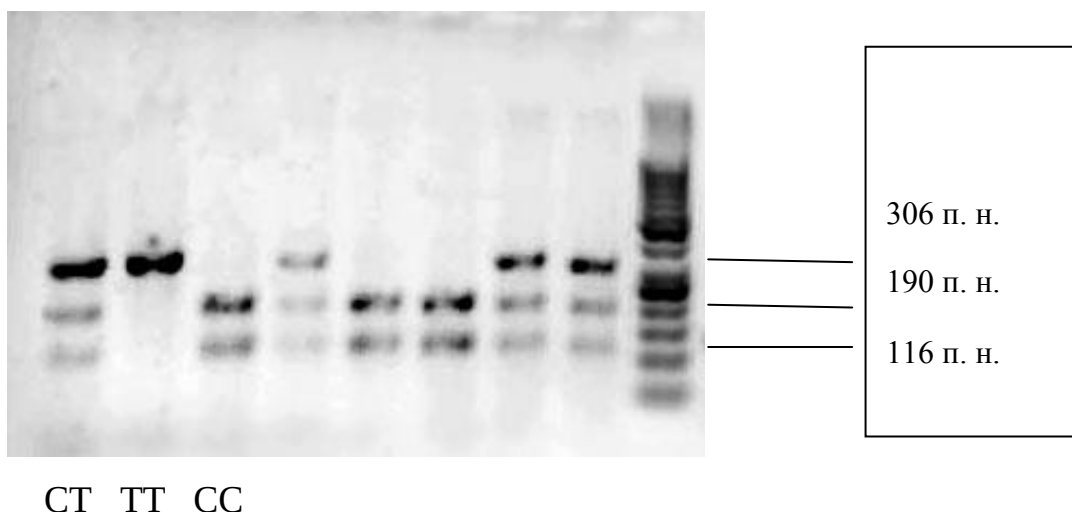


Рисунок 15 – Детекция полиморфизма -511 С/Т гена *IL-1B* с помощью анализа длин рестриктных фрагментов

Определение полиморфизма -1082 G/A гена *IL-10* проводили методом ПЦР-ПДРФ. После горячего старта и первой денатурации (95 °С, 3 мин) проводили амплификацию из 29 циклов, каждый из которых включал: денатурацию (95 °С, 30 сек), отжиг праймеров (64 °С, 20 сек), элонгацию (72 °С, 30 сек); заключительная элонгация (72 °С, 10 мин) - 1 цикл.

ПЦР проводили в смеси объемом 25 мкл, включавшей в себя по 10 пмоль каждого праймера, 200 мкМ каждого дНТФ, 1 мкл (около 50 нг) геномной ДНК и ПЦР смесь фирмы «Интерлабсервис». 8,5 мкл ПЦР-продукта длиной 141 п.н., инкубировали при 37 °С с 0,5 мкл (3 Ед.) рестриктазы MnlI и 1 мкл 10-кратного буфера для рестрикции. Продукты рестрикции визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия. Присутствие А аллеля в -1082 положении гена *IL-10* выявляли по наличию двух фрагментов 92 и 49 пар нуклеотидов, в то время как замена А на G приводила к исчезновению сайта рестрикции MnlI.

Определение полиморфизма -238 G/A гена *TNF* проводили методом ПЦР-ПДРФ. После горячего старта и первой денатурации (94 °С, 4 мин) проводили амплификацию из 33 циклов, каждый из которых

включал: денатурацию (94 °С, 1 мин), отжиг праймеров (59 °С, 1 мин), элонгацию (70 °С, 45 сек); заключительная элонгация (70 °С, 10 мин) - 1 цикл.

ПЦР проводили в смеси объемом 25 мкл, включавшей в себя по 10 пмоль каждого праймера, 200 мкМ каждого дНТФ, 1 мкл (около 50 нг) геномной ДНК и ПЦР смесь фирмы «Интерлабсервис». 8,5 мкл ПЦР-продукта длиной 238 п.н. инкубировали при 37 °С с 0,5 мкл (3 Ед.) рестриктазы *MspI* и 1 мкл 10-кратного буфера для рестрикции. Продукты рестрикции визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия. В случае наличия замены G на A в -238 положении гена *TNF-А* появляется сайт рестрикции для рестриктазы *MspI*, в результате чего на фореze выявляются 2 фрагмента – 132 и 20 п.н. (Рисунок 16).

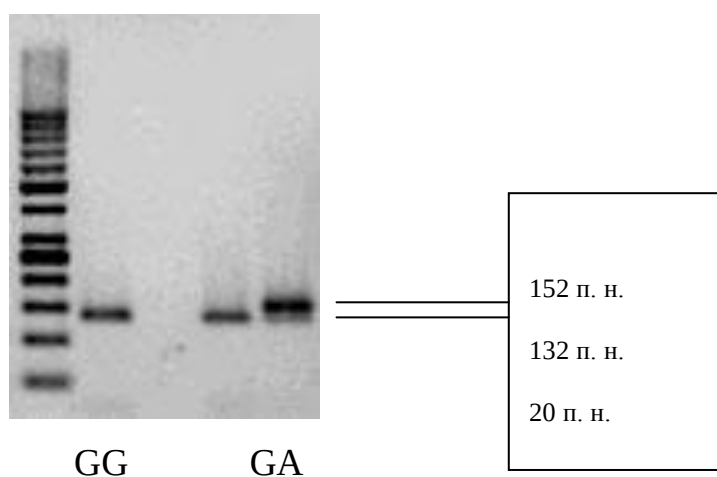


Рисунок 16 – Детекция полиморфизма -238 G/A гена *TNF-А* с помощью анализа длин рестриктных фрагментов

Определение полиморфизма +915 G/C гена *TGF-b1* проводили методом ПЦР-ПДРФ. После горячего старта и первой денатурации (94°С, 5 мин) проводили амплификацию из 35 циклов, каждый из которых включал: денатурацию (94 °С, 15 сек), отжиг праймеров (62°С, 35 сек), элонгацию(72 °С, 20 сек); заключительная элонгация (72°С, 2 мин) - 1 цикл.

ПЦР проводили в смеси объемом 25 мкл, включавшей в себя по 10 п/моль каждого праймера, 200 мкМ каждого дНТФ, 1 мкл (около 50 нг) геномной ДНК и ПЦР смесь фирмы «Интерлабсервис». 8,5 мкл ПЦР-продукта длиной 490 п.н. инкубировали при 37⁰С с 0,5 мкл (3 Ед.) рестриктазы Bgl1 и 1 мкл 10-кратного буфера для рестрикции. Продукты рестрикции визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия. Наличие вариантного аллеля в +915 положении гена TGF- β 1 определяли по появлению дополнительного тяжелого фрагмента, устойчивого к рестрикции – 294 п.н.

Определение полиморфизма гена HFE проводили методом ПЦР в режиме «реального времени» на детектирующем амплификаторе Rotor-Gene-3000 фирмы Corbett Research. После денатурации (94⁰С, 5 мин) проводили амплификацию из 60 циклов, каждый из которых включал: денатурацию (94⁰С, 30 сек), отжиг праймеров и элонгацию (62⁰С, 30 сек). ПЦР проводили в объеме 25 мкл в растворе следующего состава: по 10 пкмоль каждого праймера и по 5 пмоль каждого зонда, раствор дНТФ (5 мкМ каждого, концентрация 0,2 мМ, 2,5 мкл 2 мМ), *Taq*-полимераза 3 Ед (0,6 мкл раствора с содержанием 5U полимеразы в 1 мкл), пятикратный буфер для *Taq*-полимеразы 5 мкл, раствор ДНК (50нг/мкл) 1 мкл, деионизированная вода до 25 мкл. Вид окон программы при отображении исходных кривых флюоресценции образцов с различными генотипами изображен на рисунках ниже.

Таблица 6 – Соответствие наличия экспоненциального роста флуоресценции в канале прибора наличию аллеля в образце

Канал	Аллель
FAM/SYBR	63H (wt)
JOE	63D (mut)
ROX	282C (wt)
Cy5	282Y (mut)

Таблица 7 – Праймеры и зонды для детекции ОНП гена гемохроматоза HFE

Праймеры и зонды	Последовательности
Праймер (прямой) для +63 Н/D	ctt ggt ctt tcc ttg ttt gaa g
Праймер (обратный) для +63 Н/D	aca tct ggc ttg aaa ttc tac t
Зонд для +63 Н (немутантный тип)	FAM – act tct atg atc atg aga gtc gc – BHQ1
Зонд для +63 D (мутантный тип)	R6G – act tct atg atg atg aga gtc gc – BHQ1
Праймер (прямой) для +282 С/Y	ctg gat aac ctt ggc tgt ac
Праймер (обратный) для +282 С/Y	tca gtc aca tac ccc aga t
Зонд для +282 С (немутантный тип)	ROX – ata tac gtg cca ggt gga – BHQ2
Зонд для +282 Y (мутантный тип)	Cy 5 – aga tat acg tac cag gtg gag – BHQ3

Экспоненциальный рост количества продукта в канале FAM/SYBR, и его отсутствие в канале JOE детектируется, как генотип НН; рост в обоих каналах детектируется, как НD и только в канале JOE – как DD (Рисунок 17).

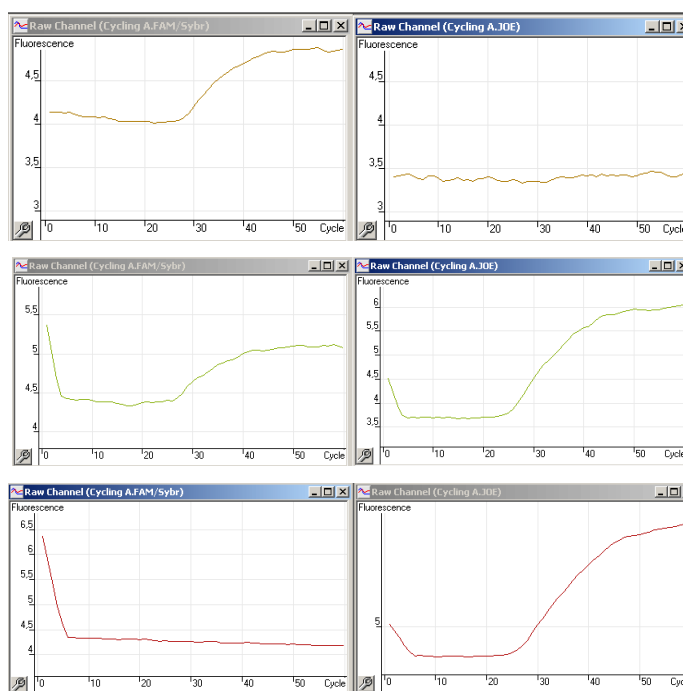


Рисунок 17 – Сверху вниз: Образцы с генотипами НН, НD, DD

Экспоненциальный рост количества продукта в канале ROX, и его отсутствие в канале Cy5 детектируется, как генотип CC; рост в обоих каналах детектируется, как CY и только в канале Cy5 – как YY (Рисунок 18).

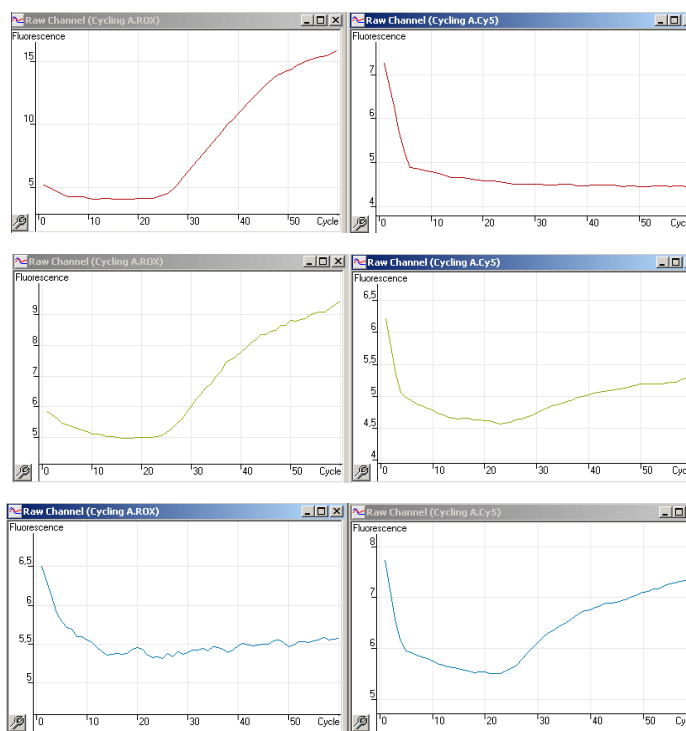


Рисунок 18 – Сверху вниз: Образцы с генотипами CC, CY, YY

Детекцию полиморфизма гена *IL-28B* rs12979860 проводили методом ПЦР в режиме «реального времени» на детектирующем амплификаторе ДТ-96 фирмы ДНК-технология. После денатурации (80°C, 2 мин; 94°C, 5 мин) проводили амплификацию из 51 цикла, каждый из которых включал: денатурацию (94°C, 30 сек), отжиг праймеров и элонгацию (67°C, 10 сек) – 5 циклов; денатурацию (94°C, 5 сек), отжиг праймеров и элонгацию (67°C, 5 сек) – 45 циклов; один цикл при 25°C, 30 сек. Автоматическая детекция результатов амплификации производилась прибором ДТ-96.

ПЦР проводили в объеме 35 мкл в растворе следующего состава: 20 мкл раствора праймеров, 10 мкл смеси *Taq*-полимеразы и буфера, а также 5 мкл ДНК. Вид окон программы при отображении исходных кривых плавления образцов с различными генотипами изображен на рисунках 25 и 26.

Экспоненциальный рост количества продукта в канале FAM, и его отсутствие в канале HEX детектируется, как генотип CC; рост в обоих

каналах детектируется, как СТ и только в канале HEX – как ТТ (Рисунок 19).

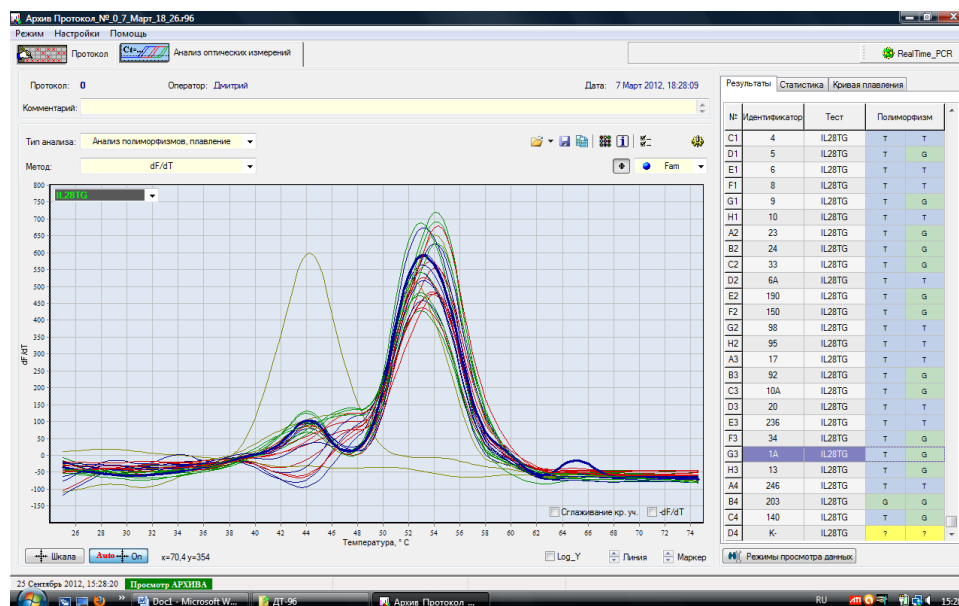


Рисунок 19 – Детекция полиморфизма гена *IL-28B* rs12979860

Экспоненциальный рост количества продукта в канале FAM, и его отсутствие в канале HEX детектируется, как генотип ТТ; рост в обоих каналах детектируется, как TG и только в канале HEX – как GG (Рисунок 20).

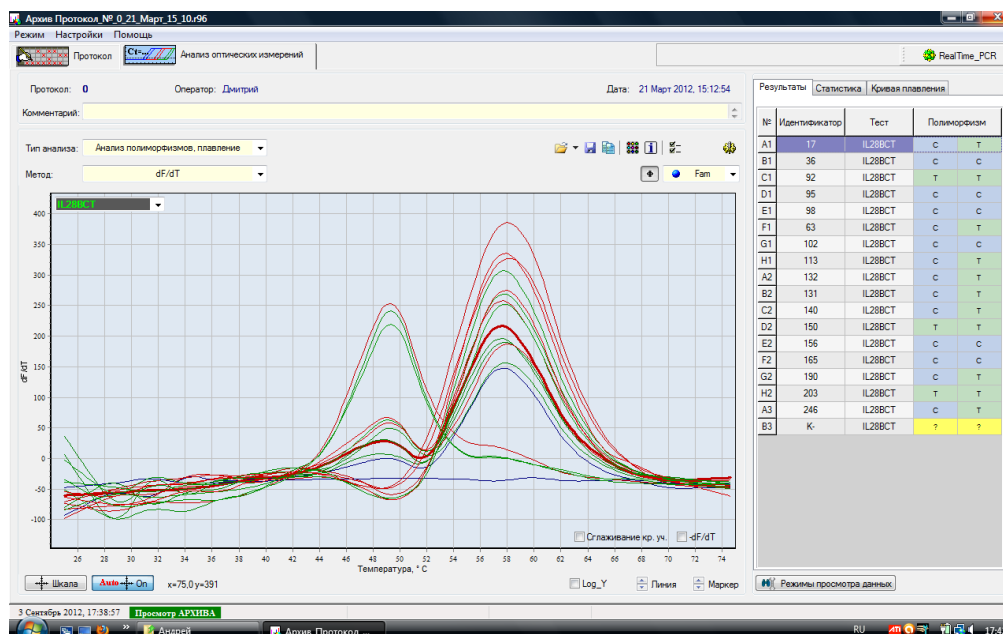


Рисунок 20 – Детекция полиморфизма гена *IL-28B* rs8099917

3. 4. Статистическая обработка данных

Многофакторный анализ проводился совместно с доктором физико-математических наук, сотрудником кафедры теории вероятностей механико-математического факультета МГУ Яровой Еленой Борисовной.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакетов статистических программ STATISTICA 10.0 и SPSS 14. Если распределение признака приближалась к нормальному, то данные представляли в виде $M \pm Sd$ (где M – среднее арифметическое, Sd – среднее квадратичное отклонение), при этом достоверность различия количественных показателей определяли с помощью параметрического t -критерия Стьюдента (p). Если распределение отличалось от нормального, то данные представляли в виде $Me\{p_{25}, p_{75}\}$, где Me – медиана, p_{25} – нижний и p_{75} – верхней квантили, и при сравнении двух независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна – Уитни [Платонов А. Е., 2000]. Критическое значение уровня значимости принимали равным 5%. Гипотезу о равенстве средних в группах проверялась с помощью дисперсионного анализа. Множественные сравнения средних проводились с помощью критерия множественных сравнений Тьюки для неравных групп. Статистически различия в группах больных рассчитывали с помощью t -теста Стьюдента и χ^2 -критерия Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность для таблиц 2×2 . Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Для исследования зависимости признаков в таблицах сопряженности 2×2 применялся двусторонний точный критерий Фишера, в таблицах сопряженности 2×3 — критерий χ^2 Пирсона. Достоверность ассоциации (p) определяли по критерию χ^2 для альтернативных признаков с поправкой непрерывность выборки и по точному двустороннему тесту Фишера для четырехпольных таблиц.

Отношение шансов (OR) определяли как отношение вероятности того, что событие произойдет, к вероятности того, что событие не произойдет. Шансом в каждой группе пациентов называлась вероятность наличия исследуемого признака к вероятности его отсутствия. В работе представлены отношения шансов для группы пациентов с ХГС: с УВО и НО, а также с разной скоростью фиброзирования печени. Для построения 95%-доверительных интервалов (ДИ) и точечной оценки отношения шансов (ОШ) применялась модель бинарной логистической регрессии. Достоверность моделей оценивалась с помощью метода максимального правдоподобия. Отношение шансов, вычисляемое для разных групп с патологией, является статистически значимым, если 95%-доверительный интервал для отношения шансов не включает единицу, поэтому для выявления статистически значимых различий достаточно представить ОШ и его 95% ДИ.

Осуществлялось совместно с доктором математических наук Яровой Е. Б.

Список использованных реактивов, тест-систем и приборов

I. Химические реактивы

1. Акриламид (Serva, Германия).
2. Агароза (Диа-М, РФ).
3. Бисакриламид (Serva, Германия).
4. Бромфеновый синий (Serva, Германия).
5. Глицерин (Sigma, Sigma, США).
6. Гуанидинхлорид (Диа-М, РФ).
7. Персульфат аммония (Serva, Германия).
8. Taq-полимераза (ЛИТЕХ, РФ)
9. ТЕМЕД (Serva, Германия).
10. Этанол перегнанный (Медтех, РФ).
11. Этидий бромид (Serva, Германия).
12. Na₂-ЭДТА, pH 8,0 (Медтех, РФ).
13. ДНК-полимераза *Taq* и краситель «Крезоловый красный».
14. Стандарт размеров длин фрагментов ДНК (Life Technologies, США).

II. Тест-системы

1. Проба-рапид-генетика (ДНК-технология, РФ).
2. Реал-Бест РНК ВГС (качественный) (Вектор-Бест, РФ).
3. Реал-Бест РНК ВГС (количественный) (Вектор-Бест, РФ).
4. «ДНК-сорб-Б» (ЦНИИЭ, РФ)

III. Приборы

1. Анализатор флуоресценции в УФ-диапазоне (Pharmacia, Швеция).
2. Дистиллятор Mili-Q (Water system, США).

3. Мини-холодильная камера (LKB, Швеция).
4. Низкотемпературная морозильная камера (Sanyo, Япония)
5. Прибор для вертикального электрофореза (Bio-Rad, США)
6. Стабилизатор тока (Pharmacia, Швеция).
7. Термостат мультитемпературный (ДНК-технология, РФ).
8. Термостат «Гном» (ДНК-технология, РФ).
9. Терцик (ДНК-технология, РФ).
10. Спектрофотометр Nanodrop (Eppendorf).
11. Амплификатор Master Cycler Gradient (Eppendorf)
12. Амплификатор Rotor-Gene-3000 (Corbett Research)
13. Амплификаторе ДТ-96 (ДНК-технология, РФ).

Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4. 1. Частота встречаемости генотипов и субтипов ВГС в исследуемой когорте пациентов

В исследуемой когорте был выявлен вирус 3 разных генотипов, 4 субтипов и один межгенотипный рекомбинант ВГС – RF2k/1b. Абсолютное и относительное содержание генотипов/субтипов вируса во всей выборке пациентов, а также гендерный состав в отдельных группах больных, инфицированных конкретным субтипом вируса, представлены в таблице 8.

Таблица 8 — Распределение субтипов вируса у пациентов с ХГС

	Субтип вируса				
	1b	1a	2a	3a	2k/1b
Пациенты с ХГС, %, (n) n=191	56,02(107)	7,33(14)	8,38(16)	27,22(52)	1,05(2)
Мужчины, % (n=88)	42,06(45)	35,71(5)	43,75(7)	55,77(29)	100(2)
Женщины, % (n=103)	57,94(62)	64,29(9)	56,25(9)	44,23(23)	0

В случае инфицирования субтипами 1b, 2a и 3a гендерное соотношение пациентов было практически равным 1:1. Только для лиц с субтипом 1a доля женщин была почти в 2 раза больше, чем мужчин. Однако, в силу малочисленности данной группы (14 человек), эти различия можно считать недостоверными. Как следует из данных таблицы 8, большинство пациентов инфицированы субтипом 1b – (56,02%), второе место занимает субтип 3a – (27,22%), третье место 2a – (8,38%), четвертое 1a – (7,33%). Доля межгенотипного рекомбинанта RF2k/1b составила почти 1%.

Сопоставляя два параметра: время инфицирования и доминирующие субтипы ВГС (1b и 3a), удалось обнаружить, что у лиц, зараженных до 1990 года, наблюдается преобладание вируса субтипа 1b. После 1990 года процентное соотношение пациентов, инфицированных этими двумя субтипами, стремится к равновесному соотношению (Рисунок 21).

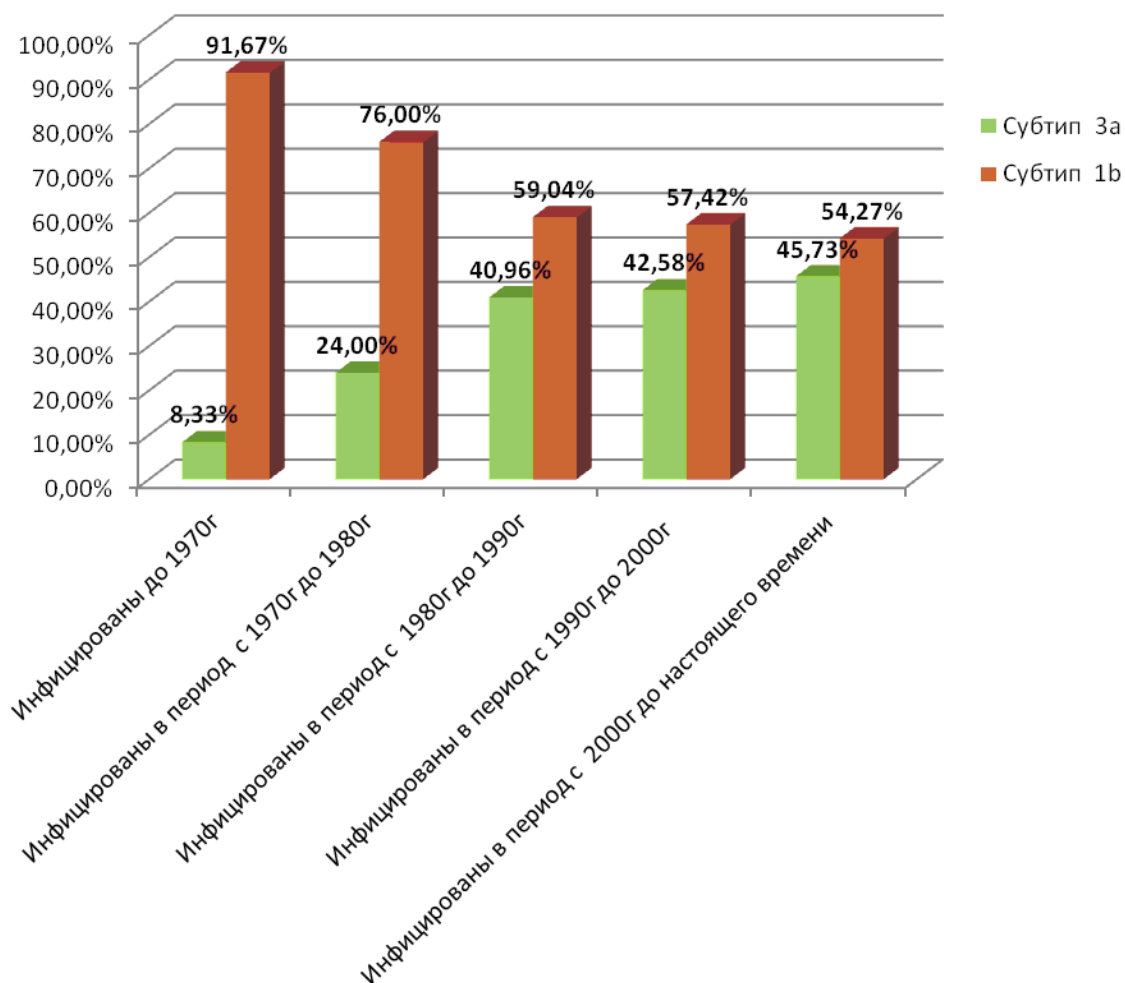


Рисунок 21 – Изменение в выявлении ВГС субтипов 1b и 3a у пациентов, инфицированных в разные периоды времени.

У пациентов, которые были инфицированы после 40 лет, доминировал вирус субтипа 1b (91,67%). В случае более молодых пациентов (до 40 лет) прослеживается тенденция к увеличению частоты встречаемости вируса субтипа 3a (таблица 9).

Таблица 9 – Встречаемость субтипов вируса у пациентов с различным возрастом инфицирования (n=120)

Возраст инфицирования	Генотип вируса 1b, (n=79)	Генотип вируса 3a, (n=41)	Уровень значимости, p
До 30 лет %, (n)	59,04(49)	40,96(34)	0,38
От 30 до 40 лет %, (n)	76,00(19)	24,00(6)	0,36
Более 40 лет %, (n)	91,67(11)	8,33(1)	0,10

Итак, анализируя содержание генотипов/субтипов вируса во всей выборке пациентов, выявлено преобладание генотипов 1 и 3. Обнаружена также тенденция к постепенному увеличению встречаемости субтипа 3a.

4. 2. Частота выявления отдельных аллельных пар по полиморфным локусам анализируемых генов в исследуемой когорте

4. 2. 1. Частота выявления отдельных аллельных пар в полиморфных локусах генов цитокинов

Общепринято, доминирующую аллельную пару называть – «дикий» генотип, а минорную – «мутантный». Однако мы будем придерживаться терминологии – доминирующий и минорный.

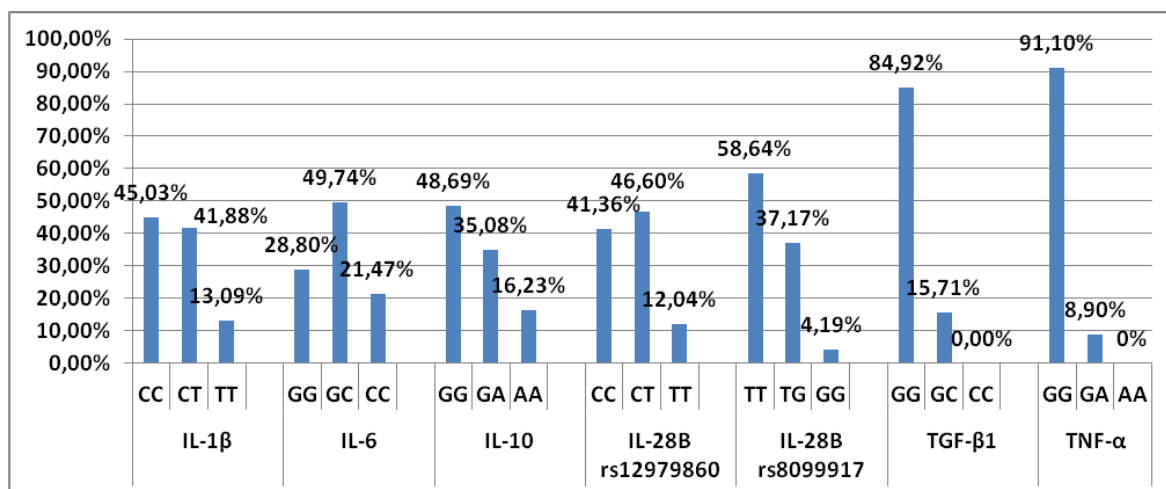


Рисунок 22 – Частота обнаружения отдельных аллельных пар в полиморфных локусах генов цитокинов в исследуемой когорте пациентов

Как следует из данных рисунка 24, у наших пациентов преобладали варианты CC и CT по гену IL-1 β , GC – по гену IL-6 (доминирование гетерозиготного генотипа – редкое явление), GG и GA по гену IL-10, CC и CT в локусе rs12979860 по гену IL-28B, TT и TG в локусе rs8099917 этого же гена, GG – по гену TGF- β 1 и GG – по гену TNF- α .

4. 2. 2. Частота выявления отдельных аллельных пар в полиморфных локусах генов, связанных с сосудистой дисфункцией

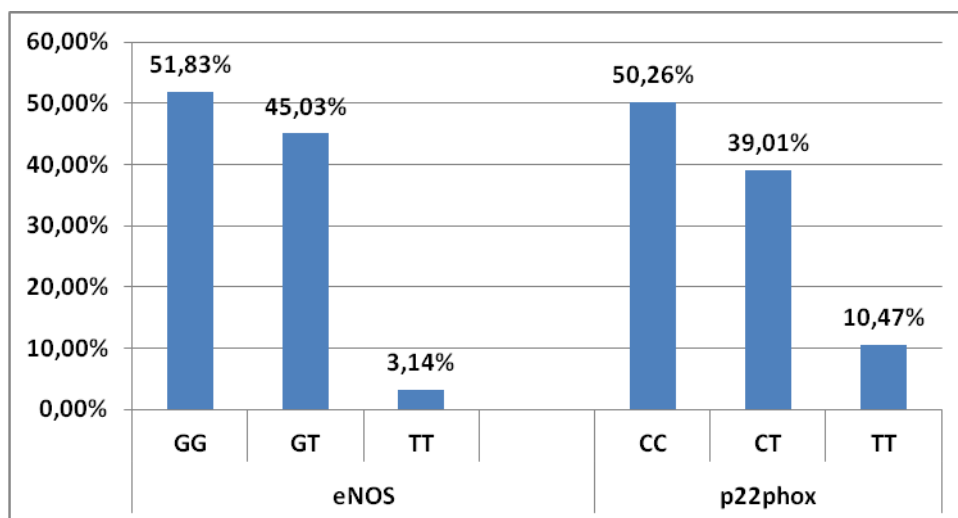


Рисунок 23 – Частота обнаружения аллельных пар в полиморфных локусах генов eNOS и p22phox в анализируемой когорте пациентов

В анализируемой когорте больных практически с одинаковой частотой выявляется доминирующий гомозиготный или гетерозиготный генотип по обоим генам.

4. 2. 3. Частота выявления отдельных аллельных пар в полиморфных локусах гена гемохроматоза

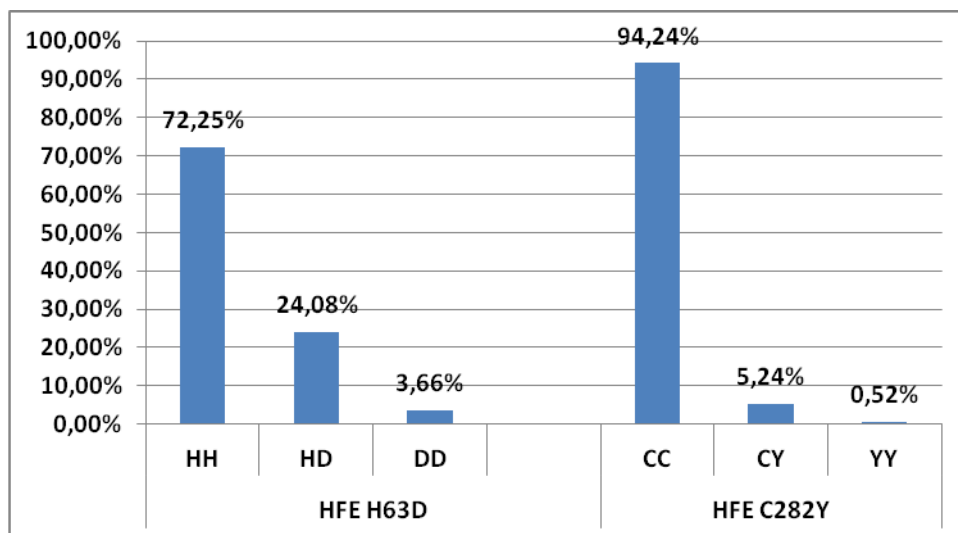


Рисунок 24 – Частота обнаружения аллельных пар в двух полиморфных локусах гена HFE в анализируемой когорте больных

Частота определения генотипа HH (локус +63) и CC (локус +282) достигала высоких значений 72,25% и 94,24%, соответственно.

4. 3. Анализ влияния факторов вируса на эффективность ПВТ

Результаты исследования генетических параметров ВГС у больных с разным ответом на терапию представлены в таблице 10. В группе с УВО преобладал вирус субтипов 1b и 3a (их сумма составила 85,71%), а в группе НО – первый генотип (72,11%) и субтип 3a (21,84%). Доля пациентов, инфицированных вирусом субтипа 1b, в группе с УВО, достигла 46,43%. Анализ соотношения доли больных, достигших УВО и без УВО и инфицированных вирусом первого генотипа, показал, что этот генотип ассоциирован с отсутствием УВО (26 человек против 63, $p < 0,001$). Для субтипа 3a достоверных различий не обнаружено. Количество пациентов, инфицированных вирусом субтипа

2а и 3а и достигших УВО, в нашем исследовании, составило 53,57%. У 2-х участников из группы НО была обнаружена РНК с межгенотипной рекомбинацией, которая соответствовала варианту - RF2k/1b (Таблица 10).

Таблица 10 — Частота встречаемости различных субтипов ВГС в группах пациентов с разной эффективностью терапии.

Субтипы вируса	Группа с УВО (n=56)	Группа с НО (n=87)
1a	0	11 (12,64%)
1b	26 (46,43%)	52 (59,77%)
2k /1b	0	2 (2,30%)
2a	8 (14,29%)	3 (3,45%)
3a	22 (39,28%)	19 (21,84%)

В таблице 11 представлены данные по вирусной нагрузке и количеству квазивариантных форм по 1ГВР. В обеих группах пациентов выявлена вариабельность вирусной нагрузки. Однако средние групповые показатели виремии перед началом ПБТ не имели достоверных различий. Различие в количестве пациентов с низкой и высокой вирусной нагрузкой в двух сравниваемых группах больных перед началом терапии было минимальным и недостоверным (Таблица 11).

Таблица 11 — Содержание вирусной РНК (МЕ/мл) и количество генетических вариантов 1ГВР в группах с разным ответом на ПБТ

Показатели	Группа с УВО (n=56)	Группа с НО (n=87)
Содержание РНК до ПБТ:	$(7,62 \pm 3,58) \times 10^5$	$(8,93 \pm 2,73) \times 10^5$
<10 ⁶ (МЕ/мл), %	62,5%	55,2%
>10 ⁶ (МЕ/мл), %	37,5%	44,8%
Содержание РНК через 6 месяцев после ПБТ	не выявлялась	$(8,93 \pm 2,73) \times 10^5$
Количество квазивариантов:	2,93±0,46	3,48±0,49
среднее значение и диапазон	2-5	2-6

Итак, показано, что пациенты с первым генотипом вируса достоверно чаще не достигают УВО, у больных с вирусом субтипа 3а не обнаружено достоверной ассоциации с результатом терапии.

4. 3. 1. Анализ выявления аллельных вариаций генов цитокинов и эффективность противовирусной терапии

Обнаружены статистически значимые различия для аллельных вариаций гена *IL-1B* в группах с различным ответом на ПВТ. Генотип ТТ достоверно чаще в 3,43 раз ($p<0,05$) встречался в группе НО по сравнению с УВО (Рисунок 25).

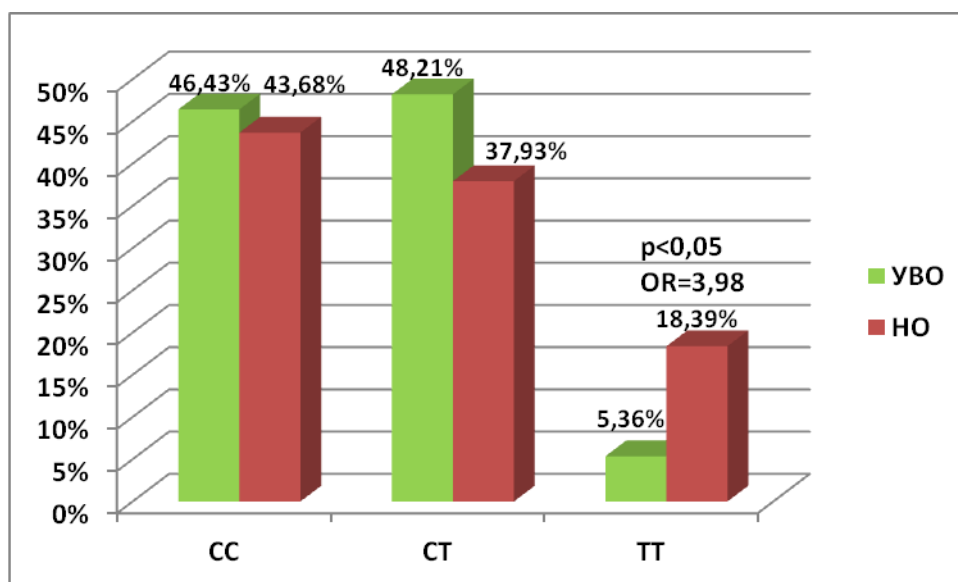


Рисунок 25 — Частота встречаемости аллельных вариаций гена *IL-1B* в группах с УВО и НО

Нами установлены статистически значимые различия во встречаемости аллельных вариаций гена *IL-28B* в локусе rs12979860 (Рис. 3А). Так генотипа СС встречался в 1,85 раз чаще в группе УВО, чем в группе НО ($p<0,05$). Генотип СТ в этом же локусе наоборот чаще (в 1,79 раз) встречался в группе НО, по сравнению с УВО ($p<0,05$).

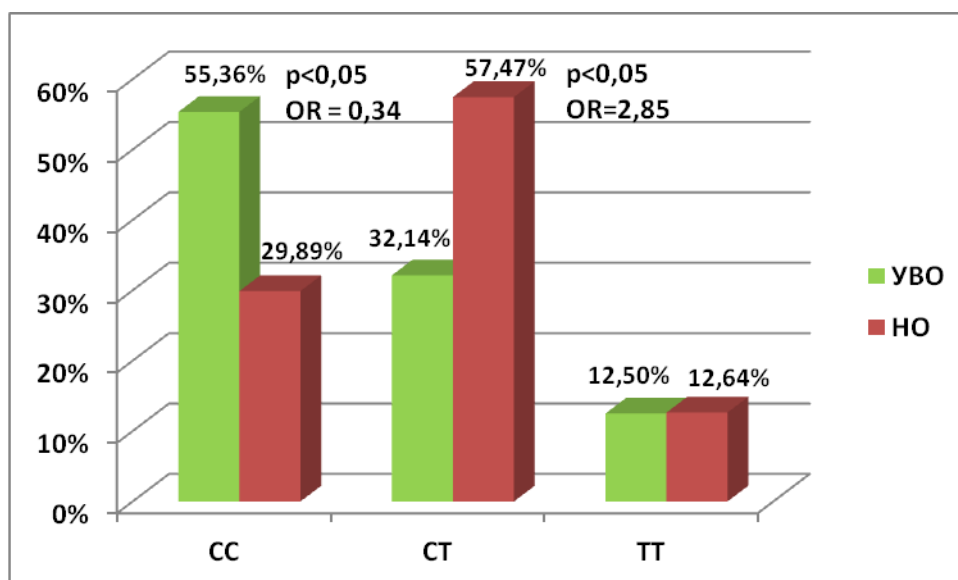


Рисунок 26 — Частота встречаемости аллельных вариаций гена *IL-28B* в локусе rs12979860 в группах с УВО и НО

Статистически значимые различия в группах с различным ответом на ПВТ получены и для аллельных вариаций гена *IL-28B* в локусе rs8099917. Генотип ТТ достоверно чаще (в 1,38 раз, $p<0,05$) встречался в группе УВО по сравнению с НО; генотип TG, наоборот, чаще (в 1,79 раз, $p<0,05$) встречается у пациентов НО по сравнению с УВО. При появлении хотя бы одной G аллели (TG или GG) вероятность достижения УВО снижалось (Рисунок 27).

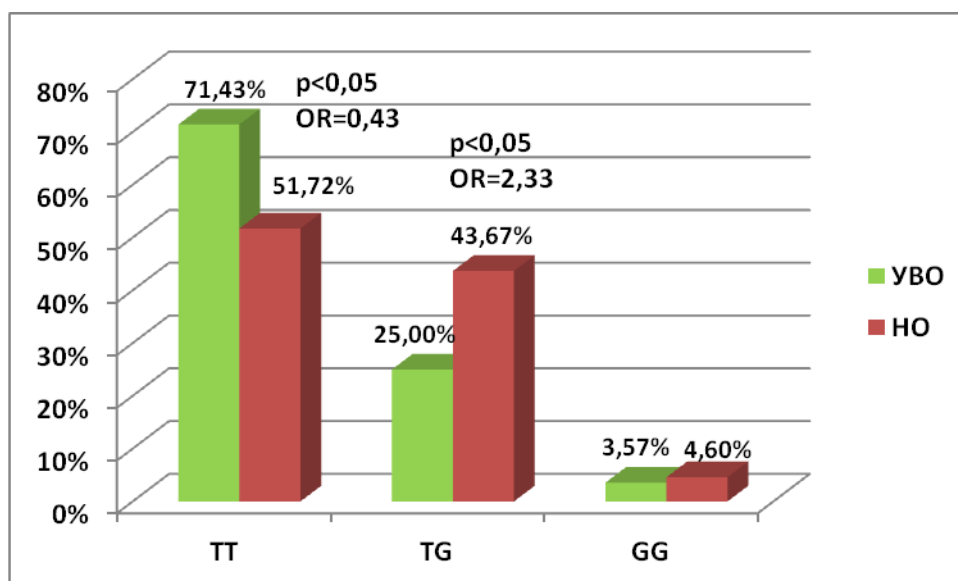


Рисунок 27 — Частота встречаемости аллельных вариаций гена *IL-28B* в локусе rs8099917 в группах с УВО и НО

Ассоциации между различными аллельными вариациями полиморфных локусов генов *IL-6*, *IL-10*, *TGF-β1* и *TNF-α* с результатом терапии не выявлено (Таблица 12). Однако, различия в генотипах *IL-6* и *IL-10* имели характер тенденции по парам GC (ген *IL-6*) и GG и GA (ген *IL-10*).

Таблица 12 — Частота встречаемости аллельных вариаций генов цитокинов в группах пациентов с разным ответом на ПБТ

Генотип/аллели генов		УВО, n=56	НО, n=87	ОШ (95% ДИ)
IL-6	GG, %(n)	25,00(14)	24,14(21)	1,05 (0,48-2,30)
	GC, %(n)	46,43(26)	56,32(49)	0,67 (0,34-1,33)
	CC, %(n)	28,57(16)	19,54(17)	0,61 (0,27-1,34)
GC+CC, %(n)		75,00(42)	75,89(66)	0,95 (0,43-2,09)
	G-аллель	48,21%	52,30%	0,85
	C-аллель	51,79%	47,70%	
IL-10	GG, %(n)	55,36(31)	45,98(40)	0,68 (0,35-1,35)
	GA, %(n)	28,57(16)	33,33(29)	1,25 (0,60-2,61)
	AA, %(n)	16,07(9)	20,69(18)	1,36 (0,56-3,31)
GA+AA, %(n)		44,64(25)	54,02(47)	1,46 (0,74-2,88)
	G-аллель	69,64%	62,64%	1,37
	A-аллель	30,36%	37,36%	
TGF-β1	GG, %(n)	83,93(47)	85,06(74)	1,09 (0,43-2,77)
	GC, %(n)	16,07(9)	14,94(13)	0,92 (0,36-2,33)
	CC, %(n)	0,00(0)	0,00(0)	-
GC+CC, %(n)		16,07(9)	14,94(13)	0,92 (0,36-2,33)
	G-аллель	91,96%	92,53%	0,92
	C-аллель	8,04%	7,47%	
TNF-α	GG, %(n)	96,43(54)	86,21(75)	0,23 (0,05-1,09)
	GA, %(n)	3,57(2)	13,79(12)	4,32 (0,92-20,37)
	AA, %(n)	0,00(0)	0,00(0)	-
GA+AA, %(n)		3,57(2)	13,79(12)	4,32 (0,92-20,37)
	G-аллель	98,21%	93,10%	4,07
	A-аллель	1,79%	6,90%	

*p<0,05

4. 3. 2. Изучение влияния аллельных вариаций генов, связанных с эндотелиальной дисфункцией, на эффективность противовирусной терапии

В представленном исследовании был проанализирован полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтетазы по локусу (+894 G/T). При анализе двух групп пациентов установлено, что только в группе НО выявляется минорный генотип ТТ (Таблица 13). Однако, в виду малочисленности лиц с генотипом ТТ статистически значимых закономерностей не обнаружено.

Также в исследовании был изучен полиморфизм фермента НАДФ-оксидазы, который вовлечен в сосудистую дисфункцию и окислительный стресс. В его субъединице p22phox, которая кодируется геном CYBA, имеется полиморфный локус +242 C/T, который был исследован. Ассоциации различных аллельных вариаций этого локуса с результатом ПВТ не выявлено (Таблица 13).

Таблица 13 — Частота встречаемости генотипов генов сосудистой дисфункции в группах пациентов с разным ответом на ПВТ

Генотип/аллели генов		УВО, n=56	НО, n=87	ОШ (95% ДИ)
eNOS	GG, %(n)	53,57(30)	54,02(47)	0,98 (0,49-1,95)
	GT, %(n)	46,43(26)	40,23(35)	1,28 (0,65-2,55)
	TT, %(n)	0,00(0)	5,75(5)	-
GT+TT, %(n)		46,43(26)	45,98(40)	1,02 (0,52-2,00)
Аллели	G-аллель	76,79%	79,31%	1,16
	T-аллель	23,21%	20,69%	
p22phox	CC, %(n)	44,64(25)	48,28(42)	1,16 (0,58-2,28)
	CT, %(n)	46,43(26)	37,93(33)	1,42 (0,71-2,82)
	TT, %(n)	8,93(5)	13,79(26)	0,61 (0,20-1,86)
CT+TT, %(n)		55,36(31)	51,72(45)	0,86 (0,44-1,70)
Аллели	C-аллель	67,86%	67,24%	0,97
	T-аллель	32,14%	32,76%	
*p<0.05				

4. 3. 3. Исследование влияния аллельных вариаций гена гемахроматоза на эффективность противовирусной терапии

В гене *HFE* (ген наследственного гемохроматоза) имеется однонуклеотидный полиморфизм по нескольким локусам. Наиболее значимыми являются локусы +63 и +282, полиморфизм которых приводит к замене H63D и C282Y в этом белке. При сравнении частоты выявления различных аллельных вариаций не обнаружено достоверных различий в сравниваемых группах больных (Таблица 14), а также с данными по всей когорте (Рисунок 26).

Минорная форма гена *HFE* (CY, YY), при которой происходит замена остатка цистеина 282 на тирозин, вовлечена в развитие гемохроматоза. Как следует из данных таблице 14, не установлено ассоциации между минорными аллелями и успешностью ПВТ.

Таблица 14 — Частота встречаемости аллельных вариантов гена гемохроматоза в группах пациентов с разным ответом на ПВТ

Генотип/аллели генов		УВО, n=56	НО, n=87	ОШ (95% ДИ)
HFE H63D	HH, %(n)	73,21(41)	71,26(62)	0,91 (0,42-1,94)
	HD, %(n)	23,21(13)	25,29(22)	1,12 (0,51-2,47)
	DD, %(n)	3,57(2)	3,45(3)	1,04 (0,16-6,53)
HD+DD, %(n)		26,78(15)	28,74(25)	1,10 (0,52-2,35)
Аллели	H-аллель	84,82%	83,91%	1,07
	D-аллель	15,18%	16,09%	
HFE C282Y	CC, %(n)	92,86(52)	94,25(82)	0,79 (0,20-3,12)
	CY, %(n)	7,14(4)	4,60(4)	1,59 (0,38-6,74)
	YY, %(n)	0,00(0)	1,15(1)	-
CY+YY, %(n)		7,14(4)	5,75(5)	1,26 (0,32-4,97)
Аллели	C-аллель	96,43%	96,55%	1,04
	Y-аллель	3,57%	3,45%	
*p<0.05				

Итак, предикторами неблагоприятного результата ПВТ у больных восточнославянского происхождения являются: инфицирование ВГС первого генотипа, отсутствие у пациента аллельных вариантов СС и ТТ по локусам rs12978860 и rs8099917 гена *IL-28B* и наличие генотипа ТТ в локусе (–511) гена *IL-1B*.

4. 4. Влияние генетических факторов вируса на развитие фиброза печени

Результаты анализа параметров ВГС у больных сравниваемых групп представлены в таблице 15. Во всех группах достоверно чаще регистрировался вирус подтипа 1b. Рекомбинантная РНК ВГС (RF 2k/1b) была обнаружена у больных из групп с умеренной и быстрой скоростью развития ФП, но частота обнаружения такого рекомбинанта была низкой. В группе с медленным формированием ФП наблюдалась более низкая вирусная нагрузка, чем в других группах. Однако, различия не достигли статистически достоверной значимости.

Таблица 15 — Генетические параметры ВГС в разных группах больных

Генетические параметры ВГС	Группа с медленным развитием ФП (n=69)	Группа с умеренным развитием ФП (n=61)	Группа с быстрым развитием ФП (n=61)
Субтип ВГС (%): 1b 1a 2a 3a 2k/1b	39(56,52%) 2(2,90%) 3(4,35%) 25(36,23%) 0	28(45,90%) 4(6,56%) 10(16,39%) 18(29,51%) 1(1,64%)	40(65,57%) 8(13,11%) 3(4,92%) 9(14,75%) 1(1,64%)
Вирусная нагрузка, (МЕ/мл)	$(8,20 \pm 1,80) \times 10^5$	$(3,67 \pm 1,28) \times 10^6$	$(1,15 \pm 1,33) \times 10^6$
Количество квазивариантов: среднее значение и диапазон	3,44±0,52 от 2 до 8	2,82±0,44 от 2 до 7	2,65±0,72 от 2 до 5

Пациенты, инфицированные вирусом субтипа 2а, чаще ($p<0,02$) попадают в группу с умеренной скоростью развития фиброза печени (Таблица 15). Пациенты, зараженные вирусом субтипа 3а, чаще выявлялись в группе с медленной скоростью развития фиброза, чем в группе с быстрой скоростью ($p=0,001$). Для других субтипов достоверных различий не выявлено.

Из 191 пациента 161 больной был инфицированы вирусом субтипа 1b и 3а, остальные 30 - другими (1а и 2а) (Таблица 16).

Таблица 16 — Частота встречаемости двух субтипов 1b и 3а в группах с разной скоростью формирования фиброза печени

Скорость развития фиброза	Доля пациентов с генотипом вируса 1b, (n=107)	Доля пациентов с генотипом вируса 3а, (n=52)
Медленная %, (n)	36,45(39)	48,08(25)
Умеренная %, (n)	26,17(28)	34,62(18)
Быстрая %, (n)	37,38(40)	17,31(9)

Итак, обнаружена достоверно значимая ассоциация между вирусом субтипа 3а и медленной скоростью развития фиброза ($p=0,001$), и субтипом 2а – и умеренной скоростью ($p<0,02$). Хотя субтип 1b достоверно чаще ($p<0,01$), чем субтип 3а, встречался у пациентов с быстрым развитием фиброза печени, но в группе больных, инфицированных первым гентипом (107 пациентов), не было достоверной ассоциации между субтипом 1b и быстрой скоростью развития фиброза.

4. 4. 1. Анализ влияния полиморфизма генов цитокинов на скорость развития фиброза печени

При сравнении встречаемости различных аллельных вариаций гена *IL-1B* в группах с разной скоростью фиброгенеза печени были

получены статистически значимые различия встречаемости генотипа СТ между группами с медленной и быстрой скоростью развития фиброза. При медленной скорости этот генотип встречается в 1,99 раз чаще, чем при быстрой. Генотип ТТ достоверно чаще определяли у пациентов с быстрой скоростью развития фиброза, чем у пациентов с медленной в 3,91 раза соответственно. Также получены достоверные различия между группами с умеренной и быстрой скоростью формирования фиброза. Различия во встречаемости генотипа СТ были в 1,75 раз чаще в группе с быстрой скоростью, чем в группе с умеренной, соответственно. Генотип ТТ достоверно чаще ($p < 0,05$) встречается у пациентов с быстрой скоростью фиброза, чем у пациентов с умеренной (Рисунок 28, АБ).

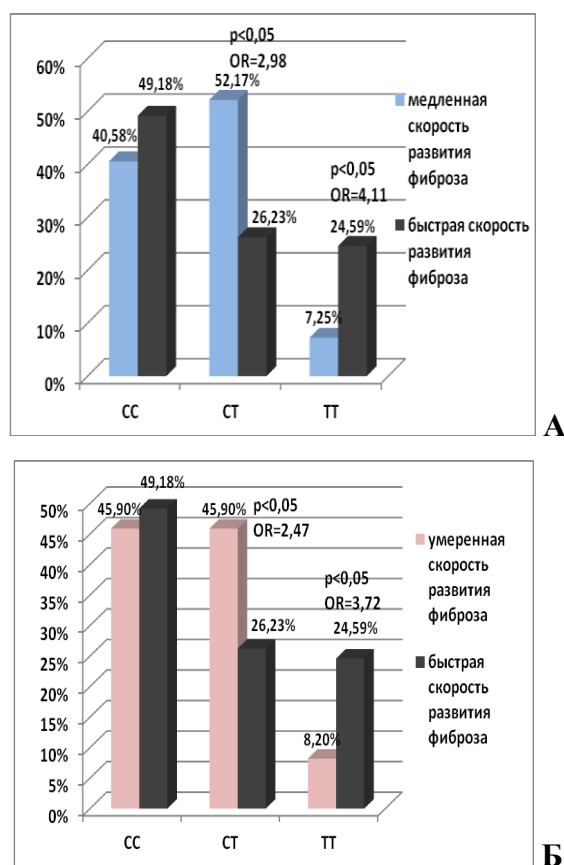


Рисунок 28 — Различия в частотах встречаемости генотипов гена *IL-1B* в группах с различной скоростью фиброгенеза

Однонуклеотидный полиморфизм в промоторной части в положении -238 влияет на экспрессию гена *TNF-А* и на содержание этого цитокина в крови. При сравнении встречаемости различных

аллельных вариаций гена *TNF-A* в группах с разной скоростью формирования фиброза печени были получены статистически значимые различия частоты обнаружения генотипа GG в группах с медленной и быстрой скоростью развития фиброза: при медленной этот генотип встречается в 1,21 раз чаще, чем при быстрой скорости фиброза. Генотип GA достоверно чаще ($p<0,05$) встречается у пациентов с быстрой скоростью развития фиброза, чем у пациентов с медленной. Также получены достоверные различия между группами с умеренной и быстрой скоростью фиброзирования печени. Обнаружены различия во встречаемости генотипа GG в группе с умеренной скоростью, чем в группе с быстрой ($p<0,05$). Генотип GA достоверно чаще (в 13 раз) встречается у пациентов с быстрой скоростью развития фиброза, чем у пациентов с умеренной (Рисунок 29, АБ)

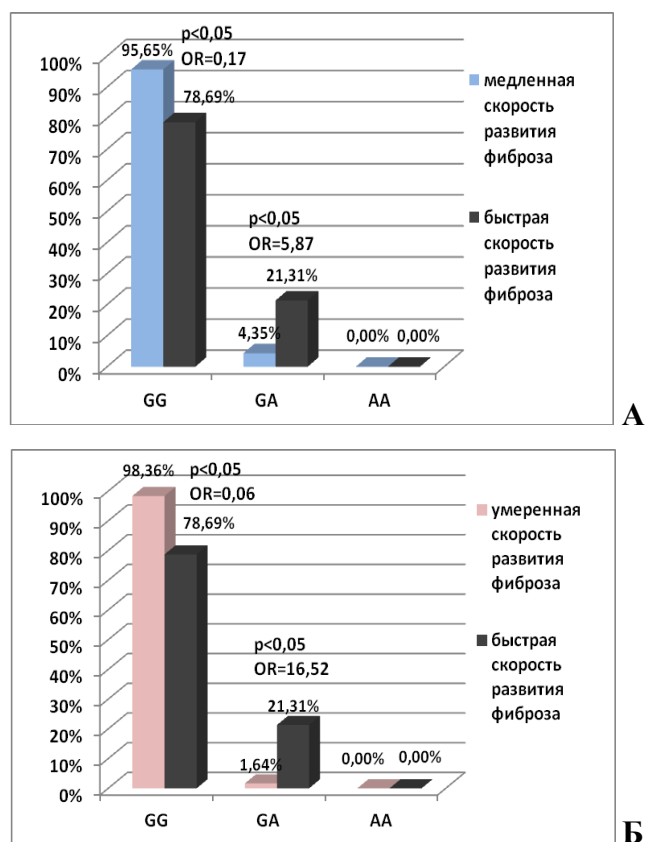


Рисунок 29 — Встречаемость аллельных вариаций гена *TNF-A* в группах с разной скоростью развития фиброза: А – для пациентов с медленной и быстрой скоростью развития фиброза, Б- для пациентов с умеренной и быстрой скоростью развития фиброза

Полиморфизм гена *TGF- β 1*, приводящий к замене G915C в кодирующей части, влияет на продукцию цитокина. При варианте GG отмечается высокое содержание *TGF- β 1*, при GC – промежуточное и при CC – низкое. Получены достоверные различия между группами с умеренной и быстрой скоростью формирования фиброза. Частота встречаемости генотипа GG были в 1,17 раз чаще в группе с умеренной скоростью, чем в группе с быстрой скоростью. Генотип GC достоверно чаще (в 2,60 раза) встречается у пациентов с быстрой скоростью фиброгенеза, чем у пациентов с умеренной (Рисунок 30).

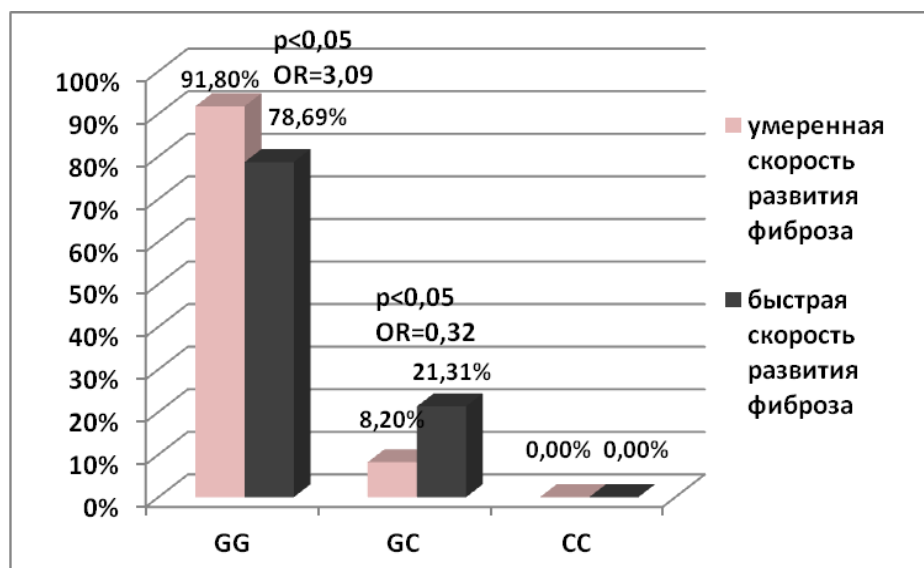


Рисунок 30 — Различия в частотах встречаемости генотипов гена *TGF- β 1* в группах с различной скоростью фиброгенеза

Ассоциации между различными аллельными вариациями полиморфных локусов генов *IL-6*, *IL-10* и *IL-28B* в локусах rs12979860 и rs8099917 со скоростью фиброгенеза печени не выявлено (Таблица 17).

Таблица 17 — Частота встречаемости аллельных вариантов генов цитокинов в группах с различной скоростью формирования фиброза печени. М – медленная, У – умеренная и Б – быстрая скорость фиброза

Генотип/аллели генов		М , n=69	У, n=61	Б , n=61	ОШ (М/Б) (95%ДИ)	ОШ(М/У) (95%ДИ)	ОШ (У/Б) (95%ДИ)
IL-6	GG, %(n)	27,54(19)	27,87(17)	31,15(19)	1,26 (0,58-2,72)	1,13 (0,52-2,47)	1,10 (0,51-2,41)
	GC, %(n)	43,48(30)	60,66(37)	45,90(28)	0,93 (0,46-1,88)	0,53 (0,24-1,48)	0,57 (0,28-1,18)
	CC, %(n)	28,99(20)	11,48(7)	22,95(14)	0,71 (0,32-1,59)	0,30 (0,11-0,79)	0,42 (0,16-1,16)
GC+CC, %(n)		72,47(50)	72,14(44)	68,85(42)	0,79 (0,37-1,72)	0,88 (0,40-1,91)	0,90 (0,41-1,97)
	G-аллель	49,28%	58,20%	54,10%	0,83	0,82	0,68
	C-аллель	50,72%	41,80%	45,90%			
Генотип/аллели генов		М , n=69	У, n=61	Б , n=61	ОШ (М/Б) (95%ДИ)	ОШ(М/У) (95%ДИ)	ОШ (У/Б) (95%ДИ)
IL-10	GG, %(n)	55,07(38)	44,26(27)	45,90(28)	0,71 (0,35-1,43)	0,69 (0,34-1,39)	0,97 (0,47-1,99)
	GA, %(n)	31,88(22)	37,70(23)	36,07(22)	0,84 (0,41-1,17)	1,81 (0,39-1,68)	1,04 (0,50-2,19)
	AA, %(n)	13,04(9)	18,03(11)	18,03(11)	0,69 (0,26-1,82)	0,70 (0,27-1,86)	1,02 (0,40-2,59)
GA+AA, %(n)		44,92(31)	55,73(34)	54,10(33)	1,41 (0,69-2,83)	1,45 (0,72-2,91)	1,03 (0,50-2,11)
	G-аллель	71,01%	63,11%	63,93%	1,38	1,43	1,04
	A-аллель	28,99%	36,89%	36,07%			
IL-28B rs12979860	CC, %(n)	40,58(28)	42,62(26)	40,98(25)	0,99 (0,49-2,00)	0,97 (0,48-1,96)	0,96 (0,46-1,99)
	CT, %(n)	47,83(33)	42,62(26)	49,18(30)	0,92 (0,46-1,85)	1,15 (0,57-2,32)	0,80 (0,39-1,63)
	TT, %(n)	11,59(8)	14,75(9)	9,84(6)	1,22 (0,39-3,79)	1,27 (0,45-3,57)	1,55 (0,51-4,73)
CT+TT, %(n)		59,42(41)	57,37(35)	59,02(36)	1,01 (0,50-2,01)	1,03 (0,51-2,08)	1,04 (0,50-2,14)
	C-аллель	64,49%	63,93%	65,57%	1,05	1,02	1,07
	T-аллель	35,51%	36,07%	34,43%			
IL-28B rs8099917	TT, %(n)	57,97(40)	59,02(36)	59,02(36)	0,99 (0,49-2,02)	0,97 (0,48-1,95)	0,96 (0,44-1,98)
	TG, %(n)	37,68(26)	34,43(21)	39,34(24)	0,89 (0,44-1,84)	1,06 (0,51-2,18)	0,84 (0,40-1,77)
	GG, %(n)	4,35(3)	6,56(4)	1,64(1)	2,77 (0,2727,96)	1,49 (0,32-7,06)	4,14 (0,44-38,99)
TG+GG, %(n)		42,03(29)	40,99(25)	40,98(25)	1,01 (0,48-2,09)	1,03 (0,51-2,09)	1,04 (0,50-2,15)
	T-аллель	76,81%	76,23%	78,69%	1,11	1,03	1,15
	G-аллель	23,19%	23,77%	21,31%			
*p<0,05							

4. 4. 2. Изучение влияния полиморфизма генов, связанных с эндотелиальной дисфункцией на скорость развития фиброза печени

При сравнении встречаемости различных аллельных вариаций гена *p22phox* (локус C242T) в группах пациентов с разной скоростью формирования фиброза печени были получены статистически значимые различия во встречаемости генотипа СТ между группами с медленной и быстрой скоростью развития фиброза (при медленной этот генотип встречается в 1,66 раз чаще, чем при быстрой. Также получены достоверные различия (в 1,81 раз) между группами пациентов с умеренной и быстрой скоростью формирования фиброза (Рисунок 31, АБ).

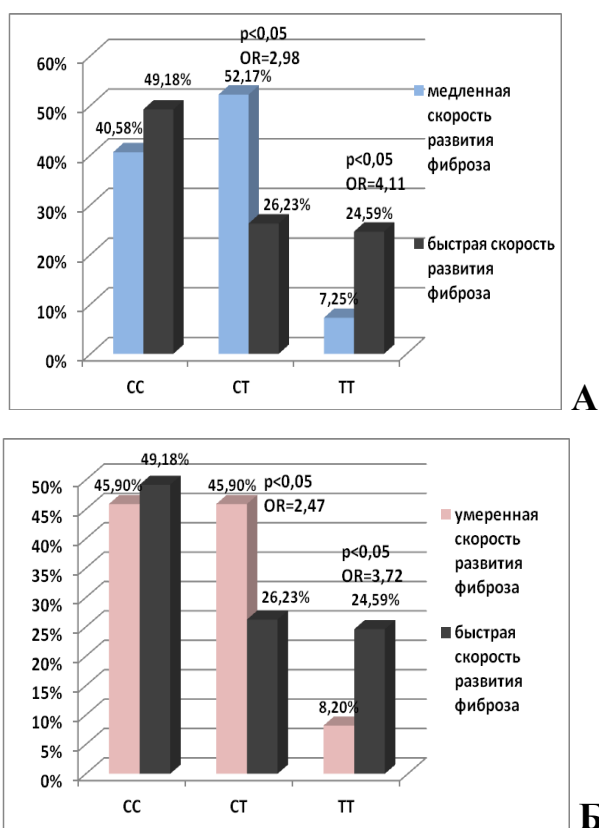


Рисунок 31 — Встречаемость аллельных вариаций гена *p22phox* в группах с различной скоростью развития фиброза

В нашем исследовании не обнаружено влияния ОНП гена эндотелиальной NO-синтетазы (G894T) на скорость развития фиброза печени (Таблица 18)

Таблица 18 — Частота встречаемости аллельных вариантов гена eNOS в группах с различной скоростью фиброгенеза печени: М – медленная, У – умеренная и Б – быстрая скорость фиброза

Генотип/аллели генов		М , n=69	У , n=61	Б , n=61	ОШ (М/Б) (95%ДИ)	ОШ(М/У) (95%ДИ)	ОШ (У/Б) (95%ДИ)
eNOS	GG, %(n)	47,83(33)	55,74(34)	52,46(32)	0,80 (0,40-1,62)	0,68 (0,34-1,38)	0,85 (0,41-1,74)
	GT, %(n)	49,28(34)	42,62(26)	42,62(26)	1,35 (0,67-2,72)	1,38 (0,69-2,78)	0,97 (0,47-2,01)
	TT, %(n)	2,90(2)	1,64(1)	4,92(3)	1,71 (0,2710,80)	1,84 (0,1621,39)	0,32 (0,03-3,21)
GT+TT, %(n)		52,18(36)	44,26(27)	47,54(29)	1,24 (0,62-2,50)	1,46 (0,72-2,93)	1,17 (0,57-2,41)
	G- аллель	72,46%	77,05%	73,77%	1,07	1,28	1,19
	T- аллель	27,54%	22,95%	26,23%			
*p<0,05							

4. 4. 3. Изучение влияния полиморфизма гена гемохроматоза на скорость развития фиброза печени

При сравнении встречаемости аллельных вариаций гена *HFE* по локусу H63D в группах пациентов с различной скоростью формирования фиброза печени статистически значимых отличий выявить не удалось (Таблица 19). Ввиду малочисленности лиц с генотипом СУ и УУ по локусу C282Y было выполнено сравнение пациентов с доминантной аллельной парой СС в группах с медленной и умеренной скоростью (65 и 61 пациент) против группы с быстрым развитием фиброза (54 больных) (Таблица 19). Обнаружено, что генотип СС достоверно чаще встречается ($p<0,001$). Пациенты с доминантной аллельной парой СС достоверно чаще встречались в группах с медленной и умеренной скоростью развития фиброза, чем в группе с быстрым фиброгенезом ($p<0,001$). Также у пациентов с быстрой скоростью фиброза аллельные пары СУ и УУ встречались чаще, чем у пациентов с медленной и умеренной скоростью фиброза 9,84% и 1,64% против 5,8% и 0 %, соответственно (Таблица 19). Следовательно, наличие аллели У является предиктором быстрой скорости фиброгенеза.

Таблица 19 — Частота встречаемости аллельных вариантов гена гемохроматоза в группах с различной скоростью фиброгенеза печени: М – медленная, У – умеренная и Б – быстрая скорость фиброза

Генотип/аллели генов		М , n=69	У, n=61	Б , n=61	ОШ (М/Б) (95%ДИ)	ОШ(М/У) (95%ДИ)	ОШ (У/Б) (95%ДИ)
HFE H63D	HH, %(n)	75,36(52)	73,77(45)	67,21(41)	0,77 (0,35-1,69)	0,81 (0,37-1,87)	0,77 (0,35-1,69)
	HD, %(n)	21,74(15)	22,95(14)	27,87(17)	0,82 (0,36-1,87)	0,81 (0,35-1,87)	0,82 (0,36-1,87)
	DD, %(n)	2,90(2)	3,28(2)	4,92(3)	1,71 (0,2710,76)	1,10 (0,15-8,21)	1,55 (0,24-9,80)
HD+DD, %(n)		24,64(17)	26,23(16)	32,79(20)	1,29 (0,59-2,82)	1,23 (0,55-2,73)	1,29 (0,59-2,82)
	Н- аллель	86,23%	85,25%	81,15%	1,45	1,08	1,34
	Д- аллель	13,77%	14,75%	18,85%			
HFE C282Y	CC, %(n)	94,20(65)	100,00(61)	88,52(54)	0,57 (0,15-2,16)	-	-
	CY, %(n)	5,80(4)	0,00(0)	9,84(6)	2,07 (0,57-7,56)	-	-
	YY, %(n)	0,00(0)	0,00(0)	1,64(1)	-	-	-
CY+YY, %(n)		5,80(4)	0,00(0)	11,48(7)	2,07 (0,57-7,56)	-	-
	С- аллель	97,10%	100,00%	93,44%	2,35	-	-
	У- аллель	2,90%	0,00%	6,56%			
*p<0,05							

Учитывая клиническую значимость раннего выявления вероятности формирования цирроза печени у пациентов с ХГС отметим, что предиктором быстрой скорости фиброза печени восточнославянского происхождения является: 1) наличие аллельных вариаций СТ и ТТ в локусе -511 С/Т гена *IL-1B*; 2) наличие генотипа GC в локусе +915 G/C гена *TGF-B1*; 3) наличие аллельной вариации GA в локусе -238 G/A гена *TNF-A*, а также отсутствие генотипа CC в локусе C282Y гена *HFE*.

4. 5. Анализ сочетанного влияния однонуклеотидных замен исследуемых генов пациентов и субтипов вируса гепатита С на скорость развития фиброза печени и ответ на ПВТ

4. 5. 1. Анализ роли полиморфизма исследуемых генов пациентов и факторов вируса в достижении УВО при терапии

Для оценки прогностического характера успешности ПВТ была создана модель, учитывающая генетические данные патогена и хозяина. В этой модели, разработанной на основе многофакторного анализа, присутствуют статистически значимые ОНП генов, влияющих на эффективность ПВТ. В процессе создания модели были проанализированы различные сочетания аллельных вариаций всех исследуемых генов и учитывались как достоверные различия между группами пациентов, так и уровень достоверности самой модели. В модели используется система баллов в соответствии с генотипом пациента по генам *IL-1B* и *IL28B* отдельно для каждого генотипа вируса. С появлением у пациента хотя бы одной «мутантной» аллели в этих генах уменьшается вероятность успеха ПВТ. Значение баллов:

0 – пациент гомозиготен (CC/CC/TT) по генам *IL-1B* и *IL28B* C/T и *IL28B* T/G;

1 – гетерозиготен, хотя бы по одному из этих генов (CC/CT/TT; CT/CC/TT; CC/CC/TG)

2 – гетерозиготен по двум генам (CC/CT/TG; CT/CT/TT; CT/CC/TG)

3 – гетерозиготен по трем генам (CT/CT/TG) или имеет обе «мутантные» аллели в одном из генов (TT/CT/TT; TT/CC/TG; CT/TT/TT; CC/TT/TG; CT/CC/GG; CC/CT/GG).

Таблица 20 — Сумма баллов с учетом ОНП пациентов, прошедших курс ПВТ, инфицированных субтипом вируса 3a (42 пациента)

Ответ на терапию	0 баллов	1 балл	2 балла	3 балла	Количество пациентов
УВО (% , n)	70,00%(7)	50,00%(7)	50,00%(6)	40,00%(2)	22
НО (% , n)	30,00%(3)	50,00%(7)	50,00%(6)	60,00%(4)	20
Количество пациентов	10	14	12	6	42

Таблица 21 – Сумма баллов с учетом ОНП пациентов, прошедших курс ПВТ, инфицированных субтипом вируса 1b (79 пациентов)

Ответ на терапию	0 баллов	1 балл	2 балла	3 балла	Количество пациентов
УВО (% , n)	62,50%(5)	44,00%(11)	28,57%(8)	11,11%(2)	26
НО (% , n)	37,50%(3)	56,00%(14)	71,43%(20)	88,89%(16)	53
Количество пациентов	8	25	28	18	79

Так как в гене *IL28B* два полиморфных локуса rs12979860 и rs8099917, рассмотрим сочетание отдельных аллельных пар (табл. 22)

Таблица 22 — Анализ сочетаний различных аллельных вариаций ОНП двух локусов гена *IL28B* с ответом на ПВТ.

IL28B C/T Локус rs12979860	IL28B T/G Локус rs8099917	УВО, %(n)	НО, %(n)	Уровень значимости, p
CC	TT	53,57(30)	27,59(24)	0,001
	TG	1,78(1)	2,30(2)	p>0,05
	GG	0,00(0)	0,00(0)	-
CT	TT	16,07(9)	22,99(20)	p>0,05
	TG	16,07(9)	34,78(30)	p>0,05
	GG	0,00(0)	0,00(0)	-
TT	TT	1,78(1)	1,15(1)	p>0,05
	TG	7,14(4)	6,70(6)	p>0,05
	GG	3,57(2)	4,60(4)	p>0,05
Итого: 143		56	87	

При анализе однонуклеотидных замен в регуляторных областях rs8099917 и rs12979860 гена *IL28B* были получены статистически значимые доказательства неслучайного сочетания аллельных пар СС и ТТ у лиц, достигших УВО (Таблица 22).

Среди всех пациентов с генотипом СС (их доля составляет 41,36%) по локусу rs12979860 гена *IL28B* 94,74% имели генотип ТТ по локусу rs8099917 (Таблица 23).

Таблица 23 – Частота сочетания аллельных пар по двум локусам rs12979860 и rs8099917 гена *IL28B*

rs8099917 rs12979860	ТТ, %(n)	TG, %(n)	GG, %(n)
СС, %(n)	94,74(54)	5,26(3)	0,00(0)
СТ, %(n)	42,65(29)	57,35(39)	0,00(0)
ТТ, %(n)	11,11(2)	55,56(10)	33,33(6)
Всего: 143	85	52	6

В группе пациентов восточнославянского происхождения выявлено доминирование пар СС и ТТ. Комбинация аллельных пар СТ и TG по частоте встречаемости занимает второе место (57,35%), третье место занимает пара ТТ и TG (55,56%). Не выявлено пациентов с сочетанием пар СС-GG и СТ-GG.

Для ОНП локусов генов *IL-1B*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-28B* (rs8099917), *TNF-A* и *TGF-1B* достоверных ассоциаций между генотипом пациента, генотипом вируса и достижением УВО при терапии, не выявлено (Таблица 24).

Таблица 24 — Анализ встречаемости аллельных вариаций генов цитокинов у пациентов с ХГС, инфицированных вирусом генотипа 1 (1b, 2k/1b и 1a) или генотипа 2,3 (2a и 3a) в зависимости от ответа на противовирусную терапию

Генотип вируса	Ответ на терапию	IL-1β			уровень значимости p<0,05
		CC, %(n)	CT, %(n)	TT, %(n)	
Генотип 1, n=91	УВО,n=26	42,31(11)	50,00(13)	7,69(2)*	*p<0,01
	НО ,n=65	47,69(31)	35,38(23)	16,92(11)*	
Генотип 2, 3, n=52	УВО,n=30	50,00(15)	46,67(14)	3,33(1)**	p>0,05
	НО ,n=22	31,82(7)	45,45(10)	22,73(5)**	
		IL-6			
		GG, %(n)	GC, %(n)	CC, %(n)	
Генотип 1, n=91	УВО,n=26	30,77(8)	46,15(12)	23,08(6)	p>0,05
	НО ,n=65	16,92(11)	56,92(37)	26,16(17)	
Генотип 2, 3, n=52	УВО,n=30	20,00(6)	50,00(15)	30,00(9)**	
	НО ,n=22	45,45(10)	50,00(11)	4,55(1)**	
		IL-10			
		GG, %(n)	GA, %(n)	AA, %(n)	
Генотип 1, n=91	УВО,n=26	65,39(17)	23,08(6)	11,54(3)	p>0,05
	НО ,n=65	43,08(28)	40,00(26)	16,92(11)	
Генотип 2, 3, n=52	УВО,n=30	53,33(16)	26,67(8)	20,00(6)	
	НО ,n=22	45,45(10)	22,73(5)	31,82(7)	
		IL-28B rs8099917			
		TT, %(n)	TG, %(n)	GG, %(n)	
Генотип 1, n=91	УВО,n=26	76,92(20)	23,08(6)*	0,00(0)*	p<0,01
	НО ,n=65	41,54(27)	50,77(33)*	7,69(5)*	
Генотип 2, 3, n=52	УВО,n=30	66,67(20)	26,67(8)	6,67(2)	p>0,05
	НО ,n=22	72,73(16)	27,27(6)	0,00(0)	
Генотип 2, 3, n=52	УВО,n=30	86,67(26)	13,33(4)	0,00(0)	
	НО ,n=22	95,45(21)	4,55(1)	0,00(0)	
		TGF-1β			
		GG, %(n)	GC, %(n)	CC, %(n)	
Генотип 1, n=91	УВО,n=26	84,62(22)	15,38(4)	0,00(0)	p>0,05
	НО ,n=65	80,00(52)	20,00(13)	0,00(0)	
Генотип 2, 3, n=52	УВО,n=30	86,67(26)	13,33(4)	0,00(0)	
	НО ,n=22	95,45(21)	4,55(1)	0,00(0)	

Продолжение таблицы 24

		TNF- α			
		GG, %(n)	GA, %(n)	AA, %(n)	
Генотип 1, n=91	УВО, n=26	100,00(26)	0,00(0)	0,00(0)	p>0,05
	НО, n=65	86,15(56)	13,85(9)*	0,00(0)	
Генотип 2, 3, n=52	УВО, n=30	93,33(28)	6,67(2)*	0,00(0)	
	НО, n=22	86,36(19)	13,64(3)*	0,00(0)	

*отмечены сравниваемые пары

** ввиду малочисленности пациентов в данном случае сравнения не проводятся

Генотип ТТ гена *IL-1B* чаще выявляется ($p<0,01$) у пациентов не достигших УВО и инфицированных вирусом первого генотипа.

Для пациентов, инфицированных первым генотипом вируса, характерны статистически значимые различия во встречаемости генотипа СС по локусу (rs12979860) гена *IL-28B*. Этот генотип встречался в 2,92 раза чаще у пациентов с УВО, чем у больных с НО (53,85% и 18,46% соответственно, $p=0,02$) (Рисунок 32).

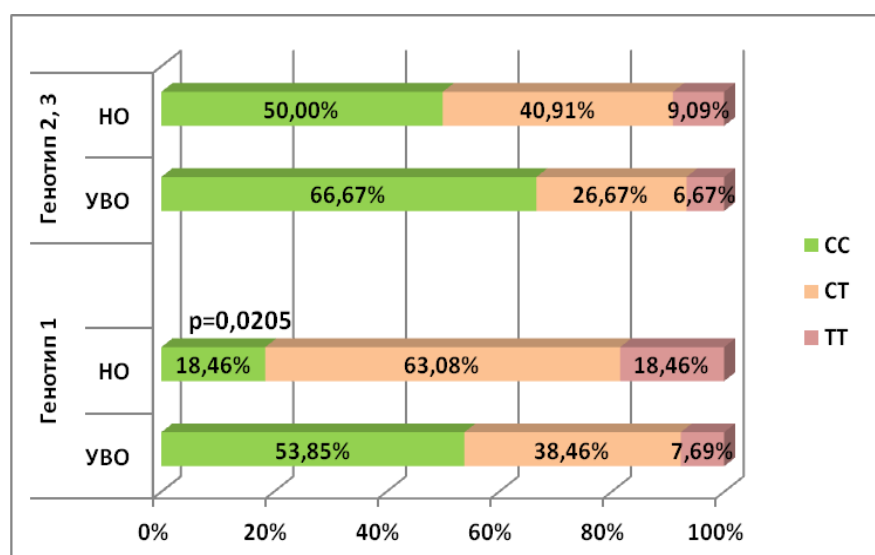


Рисунок 32 — Частота встречаемости различных аллельных вариаций гена *IL-28B* (rs12979860) у пациентов, инфицированных вирусом генотипа 1(1b, 2k/1b и 1a) или генотипа 2,3 (2a и 3a) в зависимости от ответа на противовирусную терапию

Появление G-аллеля в локусе rs8099917 гена *IL28B* ассоциировано с отсутствием УВО, а наличие А-аллеля по гену *TNF-α* снижало вероятность эффективного исхода терапии.

Для генов *eNOS* и *p22phox*, ОНП которых влияет на эндотелиальную дисфункцию, достоверных ассоциаций между генотипом пациента, генотипом патогена и достижением УВО при терапии, не выявлено (Таблица 25). Аллельная пара GT гена *eNOS* чаще определялась у пациентов группы УВО, инфицированных 1ым генотипом вируса, но закономерность имела характер тенденции.

Таблица 25 — Анализ встречаемости аллельных вариаций генов, связанных с эндотелиальной дисфункцией у пациентов с ХГС, инфицированных вирусом генотипа 1 (1b, 2k/1b и 1a) или генотипа 2,3 (2a и 3a) в зависимости от ответа на противовирусную терапию

Генотип вируса	Ответ на терапию	eNOS			p, уровень значимости
		GG, %(n)	GT, %(n)	TT, %(n)	
Генотип 1, n=91	УВО, n=26	38,46(10)	61,54(16)	0,00(0)	p>0,05
	НО, n=65	52,31(34)	41,54(27)	6,15(4)	
Генотип 2, 3, n=52	УВО, n=30	63,33(19)	36,67(11)	0,00(0)	
	НО, n=22	63,64(14)	31,82(7)	4,55(1)	
		p22phox			
		CC, %(n)	CT, %(n)	TT, %(n)	
Генотип 1, n=91	УВО, n=26	57,69(15)	30,77(8)	11,54(3)	p>0,05
	НО, n=65	44,62(29)	44,62(29)	10,77(7)	
Генотип 2, 3, n=52	УВО, n=30	36,67(11)	56,67(17)	6,67(2)	
	НО, n=22	54,55(12)	22,73(5)	22,73(5)	

Для ОНП гена гемохроматоза *HFE* (H63D и C282Y) достоверных ассоциаций между аллельными вариациями пациентов и генотипа патогена, относительно достижения УВО, не выявлено (Таблица 26).

Таблица 26 — Анализ встречаемости отдельных аллельных пар полиморфных локусов гена гемохроматоза у пациентов с ХГС, инфицированных вирусом генотипа 1 (1b, 2k/1b и 1a) или генотипа 2,3 (2a и 3a) в зависимости от результата терапии

Генотип вируса	Ответ на терапию	HFE H63D			p, уровень значимости
		HH, %(n)	HD, %(n)	DD, %(n)	
Генотип 1, n=91	УВО, n=26	80,77(21)	15,38(4)	3,85(1)	p>0,05
	НО, n=65	63,08(41)	32,31(21)	4,62(3)	
Генотип 2, 3, n=52	УВО, n=30	76,67(23)	20,00(6)	3,33(1)	
	НО, n=22	81,82(18)	18,18(4)	0,00(0)	
		HFE C282Y			
		CC, %(n)	CY, %(n)	YY, %(n)	
Генотип 1, n=91	УВО, n=26	92,31(24)	7,69(2)	0,00(0)	p>0,05
	НО, n=65	93,85(61)	4,62(3)	1,54(1)	
Генотип 2, 3, n=52	УВО, n=30	93,33(28)	6,67(2)	0,00(0)	
	НО, n=22	95,45(21)	4,55(1)	0,00(0)	

Сравнение пациентов, инфицированных вирусом первого генотипа и генотип HD или DD по локусу +63 гена *HFE* показало, что появление D аллеля снижало вероятность достижения УВО (Таблица 26). Однако данная закономерность имела характер тенденции. Ввиду малочисленности пациентов, инфицированных вирусом генотипа 2, 3 и имеющих HD или DD генотипы по локусу +63, выявить достоверных различий не удалось. Аналогичная ситуация сложилась для сравнения генотипов пациентов по локусу +282.

4. 5. 2. Анализ сочетанного влияния полиморфизма исследуемых генов пациентов и факторов вируса гепатита С на скорость развития фиброза печени

В результате многофакторного анализа генетических данных пациента и патогена была создана модель, в которой присутствуют значимые ОНП генов, влияющих на скорость фиброгенеза печени

пациентов. В процессе создания модели были проанализированы различные сочетания аллельных вариаций всех исследуемых генов и учитывались как достоверные различия между группами пациентов, так и уровень достоверности самой модели. В многофакторном анализе было установлено, что ОНП двух генов *TNF-A* и *HFE* (локус C282Y) влияют на развитие фиброза печени. Для оценки прогностического характера развития фиброза в зависимости от различных генотипов пациентов по генам *TNF-A* и *HFE* C282Y была сформирована система баллов. С появлением у пациента хотя бы одной мутантной аллели по этим генам возрастает вероятность быстрого прогресса фиброза печени. Значение баллов:

0 – пациент имеет две гомозиготные доминантные аллели по обоим генам *TNF-A* (GG) и *HFE* C282Y (CC)

1 – гетерозиготен, хотя бы по одному из этих генов (GA/CC; GG/CY)

2 – гетерозиготен по обоим генам (GA/CY)

3 – по одному гену – гетерозиготен, а по другому имеет обе мутантные аллели (GA/YY) (таблица 11).

Таблица 27 — Сумма баллов с учетом ОНП пациентов, с разной скоростью развития фиброза печени, инфицированных вирусом субтипа 3а (52 пациента)

Скорость развития фиброза печени	0 баллов	1 балл	2 балла	3 балла	Количество пациентов
Медленная, (% , n)	52,63%(10)	50,00%(13)	20,00%(1)	50,00%(1)	25
Умеренная, (% , n)	31,58%(6)	42,31%(11)	20,00%(1)	0,00%(0)	18
Быстрая, (% , n)	15,79%(3)	7,69%(2)	60,00%(3)	50,00%(1)	9
Количество пациентов	19	26	5	2	52

Пациенты, набравшие 0 баллов достоверно чаще выявлялись в группе с медленной скоростью фиброгенеза, чем с быстрой ($p<0,05$). Пациенты с 1 баллом равновероятно попадают в группы с медленной и умеренной скоростью фиброза печени, но очень редко в группу с быстрой ($p<0,05$). Сравнение пациентов с баллом 2 и 3 не имело достоверные различия в виду их малочисленности.

Таблица 28 — Сумма баллов с учетом ОНП пациентов с разной скоростью развития фиброза печени, инфицированных вирусом субтипа 1b

Скорость развития фиброза печени	0 баллов	1 балл	2 балла	3 балла	Количество пациентов
Медленная, (% , n)	38,30%(36)	15,38%(2)	0,00%(0)	0,00%(0)	38
Умеренная, (% , n)	30,85%(29)	7,69%(1)	0,00%(0)	0,00%(0)	30
Быстрая, (% , n)	30,85%(29)	76,92%(10)	100,00%(1)	100,00%(1)	41
Количество пациентов	94	13	1	1	109

При инфицировании пациента вирусом субтипа 1b появление гетерозиготности (1-3 балла) приводит к быстрому развитию фиброза ($p<0,05$) (Таблица 28).

Анализ трех признаков: длительности инфицирования, генотипа вируса и скорости развития фиброза печени – представлен в таблице 29. В этом исследовании участвовали 161 пациент, инфицированные субтипом вируса 1b или 3a, остальные 30 - другими (1a, 2a). Выделены статистически значимые различия.

Таблица 29 — Сопоставление скорости формирования фиброза печени, длительности инфицирования и субтипов вируса

Субтип вируса	Длительность инфицирования	Скорость развития фиброза		
		медленная	умеренная	быстрая
1b (n=109)	до 10 лет (n=48), %(n)	35,42(17)	41,67(20)*	22,91(11)*
	более 10 лет (n=61), %(n)	34,43(21)	16,39(10)*	49,18(30)*
3a (n=52)	до 10 лет (n=27), %(n)	66,67(18)	33,33(9)	0,00(0)*
	более 10 лет (n=25), %(n)	28,00(7)	36,00(9)	36,00(9)*
*p<0,001				

Статистически значимые различия получены для групп с умеренной и быстрой скоростью развития фиброза (Таблица 29). Пациенты, инфицированные вирусом субтипа 1b при длительности инфицирования до 10 лет, чаще выявлялись в группе с умеренной скоростью, чем в группе с быстрой скоростью ($p<0,05$). При длительности заболевания более 10 лет они (имеющие субтип 1b) чаще попадали в группу с быстрым развитием фиброза. Пациентов, инфицированных вирусом субтипа 3a и имеющих быструю скорость развития фиброза, нет в группе с длительностью инфицирования до 10 лет (Таблица 29). Однако при длительности заболевания более 10 лет в группе с быстрым развитием фиброза с близкой частотой выявлялись пациенты, инфицированные ВГС субтипа 1b или 3a (Таблица 29).

При анализе сочетанного влияния субтипа вируса, которым инфицирован пациент, в совокупности с аллельными вариациями генов цитокинов на скорость формирования фиброза печени получены статистически значимые различия для гена *IL-1B* (Рисунок 33). У пациентов, инфицированных вирусом субтипа 2a и 3a и имеющих генотип ТТ гена *IL-1B*, достоверно чаще встречались в группе с быстрой

скоростью фиброгенеза, чем в группе с медленной скоростью развития фиброза (33,33% против 3,57%, $p=0,0468$).

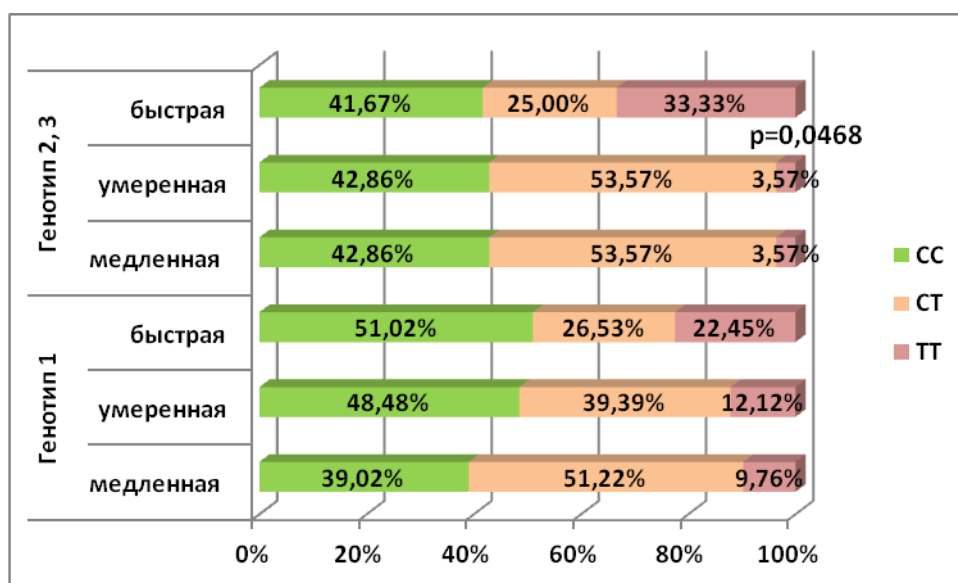


Рисунок 33 — Частота встречаемости различных аллельных вариаций гена *IL-1B* у пациентов с различной скоростью фиброгенеза, инфицированных вирусом генотипа 1(1b, 2k/1b и 1a) или генотипа 2,3 (2a и 3a)

Аллельная вариация GA гена *TNF-A* в сочетании с инфицированием вирусом любого генотипа приводит к быстрой скорости фиброгенеза: 20,41% и 0,00% для вируса генотипа 1, $p=0,0049$ и 25,00% и 0,00% для вируса генотипа 2 и 3 соответственно ($p=0,0369$) (Рисунок 34).

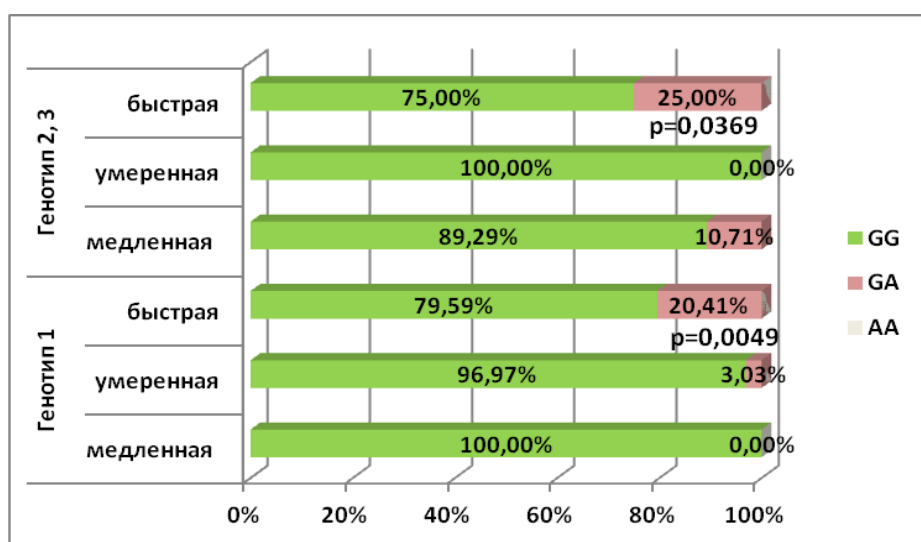


Рисунок 34 — Частота встречаемости различных аллельных вариаций гена TNFα у пациентов с различной скоростью фиброгенеза, инфицированных вирусом генотипа 1 (1b, 2k/1b и 1a) или генотипа 2,3 (2a и 3a)

Для аллельных вариантов полиморфных локусов генов *IL-6*, *IL-10*, *IL-28B* (rs12979860 и rs8099917) и *TGF-β1* достоверных ассоциаций генотипа пациента в совокупности с генотипом патогена, влияющих на скорость формирования фиброза, не выявлено (Таблица 30).

Таблица 30 — Анализ встречаемости аллельных вариаций генов цитокинов у пациентов с ХГС, инфицированных вирусом генотипа 1 (1b, 2k/1b и 1a) или генотипа 2,3 (2a и 3a) в зависимости от скорости фиброгенеза печени

Генотип вируса	Скорость развития фиброза печени	IL-1β			p, уровень значимости
		CC, %(n)	CT, %(n)	TT, %(n)	
Генотип 1, n=123	медленная, n=41	39,02(16)	51,22(21)*	9,76(4)*	p>0,05, кроме *
	умеренная, n=33	48,48(16)	39,39(13)	12,12(4)	
	быстрая, n=49	51,02(25)	26,53(13)*	22,45(11)*	
		IL-6			
		GG, %(n)	GC, %(n)	CC, %(n)	
Генотип 1, n=123	медленная, n=41	34,15(14)	39,02(16)	26,83(11)	p>0,05
	умеренная, n=33	30,30(10)	60,61(20)	9,09(3)	
	быстрая, n=49	26,53(13)	44,90(22)	28,57(14)	
Генотип 2, 3, n=68	медленная, n=28	17,86(5)	50,00(14)	32,14(9)	
	умеренная, n=28	25,00(7)	60,71(17)	14,29(4)	
	быстрая, n=12	50,00(6)	50,00(6)	0,00(0)	

Продолжение таблицы 30

		IL-10			
		GG, %(n)	GA, %(n)	AA, %(n)	
Генотип 1, n=123	медленная, n=41	53,66(22)	31,71(13)	14,63(6)	p>0,05
	умеренная, n=33	42,42(14)	45,45(15)	12,12(4)	
	быстрая, n=49	48,98(24)	36,73(18)	14,29(7)	
Генотип 2, 3, n=68	медленная, n=28	57,14(16)	32,14(9)	10,71(3)	
	умеренная, n=28	46,43(13)	28,57(8)	25,00(7)	
	быстрая, n=12	33,33(4)	33,33(4)	33,33(4)	
		IL-28B rs12979860			
		CC, %(n)	CT, %(n)	TT, %(n)	
Генотип 1, n=123	медленная, n=41	31,71(13)	56,10(23)	12,20(5)	p>0,05
	умеренная, n=33	33,33(11)	48,48(16)	18,18(6)	
	быстрая, n=49	36,73(18)	51,02(25)	12,24(6)	
Генотип 2, 3, n=68	медленная, n=28	53,57(15)	35,71(10)	10,71(3)	
	умеренная, n=28	53,57(15)	35,71(10)	10,71(3)	
	быстрая, n=12	58,33(7)	41,67(5)	0,00(0)	
		IL-28B rs8099917			
		TT, %(n)	TG, %(n)	GG, %(n)	
Генотип 1, n=123	медленная, n=41	43,34(19)	48,78(20)	4,88(2)	p>0,05
	умеренная, n=33	54,55(18)	36,36(12)	9,09(3)	
	быстрая, n=49	55,10(27)	42,86(21)	2,04(1)	
Генотип 2, 3, n=68	медленная, n=28	75,00(21)	21,43(6)	3,57(1)	
	умеренная, n=28	64,29(18)	32,14(9)	3,57(1)	
	быстрая, n=12	75,00(9)	25,00(3)	0,00(0)	
		TGF-1 β			
		GG, %(n)	GC, %(n)	CC, %(n)	
Генотип 1, n=123	медленная, n=41	82,93(34)	17,07(7)	0,00(0)	p>0,05
	умеренная, n=33	90,91(30)	9,09(3)	0,00(0)	
	быстрая, n=49	75,51(37)	24,49(12)	0,00(0)	
Генотип 2, 3, n=68	медленная, n=28	82,14(23)	17,86(5)	0,00(0)	
	умеренная, n=28	92,86(26)	7,14(2)	0,00(0)	
	быстрая, n=12	91,67(11)	8,33(1)	0,00(0)	

* сравниваемые пары

Для лиц, инфицированных первым генотипом вируса выявлена тенденция во встречаемости генотипа ТТ гена *IL-1B* между группами с медленной и быстрой скоростью развития фиброза. Аллельная пара СТ достоверно чаще определялась ($p<0,02$) в группе с медленной скоростью фиброза, чем в группе с быстрой скоростью, когда пациент был инфицирован ВГС генотипа 1.

Для ОНП генов *eNOS* и *p22phox*, связанных с эндотелиальной дисфункцией не выявлено достоверных ассоциаций между генотипом пациента, генотипом патогена и скоростью формирования фиброза (Таблица 31).

Таблица 31 — Анализ встречаемости аллельных вариаций генов связанных с эндотелиальной дисфункцией у пациентов с различной скоростью развития фиброза печени, инфицированных вирусом генотипа 1 (1b, 2k/1b и 1a) или генотипов 2,3 (2a и 3a)

Генотип вируса	Скорость развития фиброза печени	eNOS			p, уровень значимости
		GG, %(n)	GT, %(n)	TT, %(n)	
Генотип 1, n=123	медленная, n=41	39,02(16)	58,54(24)	2,44(1)	p>0,05
	умеренная, n=33	51,52(17)	45,45(15)	3,03(1)	
	быстрая, n=49	46,94(23)	46,94(23)	6,12(3)	
Генотип 2, 3, n=68	медленная, n=28	60,71(17)	35,71(10)	3,57(1)	
	умеренная, n=28	60,71(17)	39,29(11)	0,00(0)	
	быстрая, n=12	75,00(9)	25,00(3)	0,00(0)	
		p22phox			
		CC, %(n)	CT, %(n)	TT, %(n)	
Генотип 1, n=123	медленная, n=41	48,78(20)	41,46(17)	9,76(4)	p>0,05
	умеренная, n=33	39,39(13)	57,58(19)	3,03(1)	
	быстрая, n=49	63,27(31)	24,49(12)	12,24(6)	
Генотип 2, 3, n=68	медленная, n=28	42,86(12)	46,43(13)	10,71(3)	
	умеренная, n=28	53,57(15)	35,71(10)	10,71(3)	
	быстрая, n=12	41,67(5)	33,33(4)	25,00(3)	

Для ОНП гена гемохроматоза *HFE* (H63D и C282Y) достоверных ассоциаций генотипа пациента в совокупности с генотипом патогена, влияющих на скорость формирования фиброза, не выявлено (Таблица 32).

Таблица 32 — Анализ встречаемости аллельных вариаций гена гемохроматоза у пациентов с различной скоростью развития фиброза печени, инфицированных вирусом генотипа 1 (1b, 2k/1b и 1a) или генотипов 2,3 (2a и 3a)

Генотип вируса	Скорость развития фиброза печени	HFE H63D			p, уровень значимости
		HH, %(n)	HD, %(n)	DD, %(n)	
Генотип 1, n=123	медленная, n=41	73,17(30)	21,95(9)	4,88(2)	p>0,05
	умеренная, n=33	72,73(24)	24,24(8)	3,03(1)	
	быстрая, n=49	65,31(32)	28,57(14)	6,12(3)	
Генотип 2, 3, n=68	медленная, n=28	78,57(22)	21,43(6)	0,00(0)	
	умеренная, n=28	75,00(21)	21,43(6)	3,57(1)	
	быстрая, n=12	75,00(9)	25,00(3)	0,00(0)	
		HFE C282Y			
		CC, %(n)	CY, %(n)	YY, %(n)	
Генотип 1, n=123	медленная, n=41	95,12(39)	4,88(2)*	0,00(0)	p>0,05
	умеренная, n=33	100,00(33)	0,00(0)	0,00(0)	
	быстрая, n=49	87,76(43)	10,20(5)*	2,04(1)*	
Генотип 2, 3, n=68	медленная, n=28	92,86(26)	7,14(2)	0,00(0)	
	умеренная, n=28	100,00(28)	0,00(0)	0,00(0)	
	быстрая, n=12	91,67(11)	8,33(1)	0,00(0)	

* Отмечена тенденция в более частой встречаемости генотипов CY и YY в группе с быстрой скоростью развития фиброза, по сравнению с группой, имеющей медленную скорость развития фиброза

Появление D-аллели в локусе +63 гена *HFE* не влияло на скорость развития фиброза печени в группах пациентов, инфицированных вирусом генотипа 1 или генотипов 2 и 3. Наличие аллеля Y в локусе +282 для пациентов, инфицированных вирусом генотипа 1, чаще

приводило к быстрому развитию фиброза. Однако данная закономерность имела характер тенденции.

Итак, анализируя генетические факторы вируса гепатита С и ОНП генов цитокинов, гены связанные с эндотелиальной дисфункцией и гемохроматоза, были выявлены следующие закономерности ассоциированные с высокой вероятностью достижения УВО и медленной или быстрой скоростью развития фиброза печени:

1) наиболее значимым генетическим фактором ВГС оказался генотип: с первым генотипом ассоциирована низкая вероятность достижения УВО; с субтипом 3а – медленная скорость развития фиброза; с вирусом субтипа 2а – умеренная скорость развития фиброза;

2) ни вирусная нагрузка, ни количество генетических вариантов по 1ГВР не влияли на достижение УВО;

3) в нашем исследовании частота обнаружения пациентов, инфицированных вирусом субтипа 3а, имеет тенденцию к увеличению, хотя до сих пор преобладает субтип 1b;

4) наличие в геноме пациента аллельной пары СТ по локусу -511 С/Т гена *IL-1B* ассоциировано более медленной скоростью развития фиброза, а аллельной пары ТТ – с отсутствием ответа на терапию и быстрым развитием фиброза печени;

5) одновременное определение в ДНК пациента аллельных пар СС (rs12979860) и ТТ (rs8099917) гена *IL28B* достоверно чаще выявлялось у лиц с УВО, а появление Т-аллеля (rs12979860) и G-аллеля (rs8099917) – у лиц с отсутствием УВО;

6) быстрая скорость развития фиброза печени достоверно чаще определялась у лиц с генотипом GC в локусе +915 G/C гена *TGF-B1*, при

появлении Y-варианта в позиции +282 гена *HFE* и A-аллеля в локусе -238 G/A гена *TNF-A*;

7) медленная скорость развития фиброза печени у пациентов была ассоциирована с генотипом GG в локусе -238 G/A гена *TNF-A*; генотипом CT в локусе +242 C/T гена *p22phox* и инфицирование ВГС субтипа 3a

8) создана предсказательная модель, определяющая вероятность достижения УВО с учетом факторов вируса гепатита С и ОНП генов пациентов восточнославянского происхождения.

Глава 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

5. 1. Роль факторов вируса в эффективности ПВТ и скорости развития фиброза печени

Общепризнанно, что генотипы вируса, совокупность генетических вариантов (квазивариантов) и вирусная нагрузка являются важными генетическими факторами, влияющими на течение и эффективность ПВТ [Lin E. et al., 2006]. Установлено, что благоприятное течение вирусного гепатита С связано с молодым возрастом (до 40 лет) и низким уровнем РНК вируса в крови. Инфицирование ВГС субтипа 1b ассоциировано с более высоким уровнем виремии, тяжестью печеночных изменений по сравнению с генотипами 2,3 [Blatt L.M. et al., 2000]. В нашем исследовании установлено, что большая часть пациентов (91,67%), инфицированная в возрасте более 40 лет, была заражена вирусом субтипа 1b, а среди больных, инфицированных в возрасте моложе 40 лет, чаще встречается вируса субтипа 3a. Расчет относительно 1990 года показал, что у пациентов инфицированных до 1990 года наблюдается преобладание вируса субтипа 1b относительно субтипа 3a. После 2000 года процентное соотношение больных инфицированных этими двумя субтипами примерно одинаковое, с 1990-го года хорошо выражена тенденция к увеличению доли субтипа 3a. Этот факт подтверждается исследованиями других российских ученых [Бацких С. Н., 2012].

Успех ПВТ во многом зависит от того, каким генотипом вируса инфицирован пациент. При 1 и 4 генотипе он ниже, чем при 2 и 3. Ранее установлено, что УВО достигается у 40-50% больных, зараженных вирусом генотипа 1 и у 70-80% пациентов с генотипом вируса 2 и 3 [Rosen H.R. et al., 2011]. Частота достижения УВО у больных, инфицированных генотипом вируса 4, составляет 65% [Fung J et al., 2008].

В нашем исследовании в группе с УВО у пациентов преобладали вирусы субтипов 3а и 1b, в группе НО – 1b, что согласуется с результатами других исследований [Asellah T. et al, 2010; Abbas Z. et al. 2005]. Доля пациентов, инфицированных вирусом субтипа 1b и достигших УВО, составила 33,30% (26 пациента из 78), что не противоречит опубликованным сведениям – 36-48% [Asellah T. et al, 2010; Abbas Z. et al. 2005]. Количество пациентов, зараженных вирусом субтипа 3а, достигших УВО в нашем исследовании, составило 53,6% (22 из 41), что входит в диапазон значений, полученных другими авторами – 65-80% [Asellah T. et al, 2010; Abbas Z. et al. 2005].

В обеих групп больных выявлена вариабельность вирусной нагрузки: от $2,2 \times 10^4$ до $9,1 \times 10^7$. Однако средние групповые показатели виремии перед началом ПВТ не имели достоверных различий (Таблица 2). Подобный факт отмечался и другими авторами [Abbas Z. et al. 2005]. Ранее считалось, что при высокой вирусной нагрузке (более 5×10^5 МЕ/мл) вероятность достижения УВО меньше, чем при более низких значениях. Известно, что набор квазивариантов (КВ), различающихся по структуре 1ГВР, и их динамика во времени являются важным показателем взаимоотношений ВГС и макроорганизма. Установлено, что, если в острой фазе гепатита С количество этих генетических вариантов резко уменьшается к концу 3 месяца, то происходит элиминация вируса [Farci, P. et al., 2002]. Роль вирусных КВ в формировании УВО до сих пор оценивается неоднозначно. В ряде публикаций показано, что при количестве КВ равным 5 или более пациент имеет низкую вероятность достижения УВО [Moreau I. et al., 2008; Salmeron J. et al., 2006]. Однако этот факт, в других работах, не подтверждается [Fan X. et al., 2009]. Возможно, такое противоречие вызвано тем, что были использованы различные методики выделения вирусной РНК и детекции КВ. Близкие нашим количественные

показатели получены А.А. Al-Qahtani и соавт. при анализе больных, инфицированных вирусом генотипа 4 [Al-Qahtani A.A. et al., 2010].

У 2-х участников из группы НО была обнаружена межгенотипная рекомбинация вирусной РНК, что свидетельствует об относительной редкости данного явления среди больных Московского региона и совпадает с данными П.Н. Дмитриева и соавт. [Дмитриев П.Н. и соавт., 2009]. Однако оба участника исследования закончили курс ПВТ безуспешно.

В работах ряда исследователей установлено достоверное увеличение случаев цирроза печени у больных ХГС с субтипом 1b [Vince A et al., 1998; Martinot-Peignoux M et al., 1999]. Однако в другом исследовании, где анализировалась связь между генотипом вируса, степенью фиброза и переходом ХГС в цирроз, такой зависимости не установлено [Adinolfi LE et al., 2000]. Высокий уровень репликации ВГС напрямую ассоциирован с прогрессированием гепатита и переходом его в хроническую стадию [Pontisso P et al., 1999].

В нашем исследовании во всех группах с разной скоростью развития фиброза печени (ФП) достоверно чаще регистрировался вирус подтипа 1b, что отражает длительное доминирование этого субтипа на территории Российской Федерации [Lvov D.K., et al., 1996; Viazov S., et al., 2010]. Рекомбинантная РНК ВГС (2k/1b) была обнаружена у больных из групп с умеренной и с быстрой скоростью развития ФП. Отсутствие субтипа 2k/1b у пациентов группы с медленным развитием ФП, позволяет предположить, что, возможно, этот вариант вируса приводит к более тяжелому течению болезни.

В группе больных с медленным формированием фиброза количество вариантов по 1ГВР было выше, чем в остальных группах. Однако различия были статистически не достоверными. Известно, что одним из факторов развития фиброза при ХГС является интенсивный ответ цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ). Можно предположить, что

чем больше генетических вариантов вируса и ниже вирусная нагрузка (это наблюдалось в группе с медленным развитием фиброза), тем на меньшее количество генетических вариантов будет сформирован ответ ЦТЛ. Остальные минорные варианты вируса будут в низком содержании и не достигнут порога чувствительности, необходимого для развития ЦТЛ-специфической реакции.

Итак, при анализе только факторов вируса установлено, что при инфицировании первым генотипом достоверно чаще наблюдалось отсутствие УВО; медленная скорость развития фиброза ассоциирована с инфицированием вирусом субтипа 3а, а умеренная – с 2а.

5. 2. Роль факторов пациента в эффективности ПВТ и скорости формирования фиброза печени

5. 2. 1. Влияние генетических факторов пациента на эффективность терапии

Известно, что интенсивность иммунного ответа зависит от ОНП генов, продукты которых участвуют в иммунном ответе.

Интерлейкин *IL-1B*, который регулирует воспалительные и иммунные процессы (активирует В- и Т-лимфоциты), стимулирует синтез белков острой фазы и некоторых цитокинов. В нашем исследовании был проанализирован его полиморфный локус –511 С/Т и обнаружено более частое выявление минорного генотипа ТТ гена *IL-1B* в группах больных НО. По данным авторов, анализировавших больных ХГС (коренные жители Пакистана), такой зависимости не обнаружено [Abbas Z., 2005]. Мы связываем такое расхождение с этническими различиями между группами пациентов

Полифункциональный провоспалительный цитокин *IL-6* принимает участие в индукции белков острой фазы, в регуляции созревания В-клеток и продукции иммуноглобулинов. Известно, что полиморфный локус –174 G/C в промоторной части гена *IL-6* влияет на

содержание этого цитокина в крови: варианты G/G и G/C дают более высокое содержание этого цитокина, чем генотип C/C. Так же, как в работе J. Nattermann и соавт. нами не обнаружено достоверных различий в выявлении отдельных аллельных вариантов в сравниваемых группах больных [Nattermann J. et al., 2007].

По данным L.J. Yee и соавт., генотип A/A гена *IL-10* ассоциирован с достижением пациентами УВО [Yee L.J. et al., 2001]. В нашем исследовании в обеих группах преобладал генотип G/G, достоверных различий не обнаружено. Аналогичные данные получены другими авторами для коренных жителей Пакистана [Abbas Z., 2005].

С полиморфизмом гена *IL-28B* ассоциирована самопроизвольная элиминация вируса при остром гепатите С и высокая вероятность достижения УВО [Halfon P. et al., 2011]. В нашем исследовании установлено, что у больных, инфицированных вирусом 1 генотипа и достигших УВО, с одинаковой достоверностью преобладал как аллельный вариант C/C (rs12978860), так и вариант T/T (rs8099917). У пациентов, инфицированных вирусом субтипа 3а и достигших УВО, часто обнаруживались эти протективные аллельные варианты гена. О роли этой зависимости для пациентов, инфицированных вирусом генотипа 2 и 3 пока не существует однозначного мнения [Halfon P. et al., 2011; Moghaddam, A. et al., 2011].

При анализе полиморфизма по локусу +915G/C гена *TGF-1B* аллель G была ассоциирована с высокой вирусной нагрузкой при ХГС, гомозиготный по аллелю G генотип достоверно чаще обнаруживался у РНК-позитивных больных [Pereira F.A. et al., 2008]. В нашем исследовании взаимосвязь ОНП данного гена с эффективностью ПВТ не обнаружена. Вероятно, это связано с генетическими особенностями восточнославянской популяции.

Полифункциональный цитокин *TNF-А* принимает участие в формировании защитных реакций организма, стимулирует иммунный

ответ, и регулирует процессы иммунного воспаления. Одной из ключевых биологических функций *TNF-А* является его участие в регуляции апоптоза, в том числе поврежденных вирусом клеток [Jonsson J.R. et al., 2000]. При анализе влияния полиморфизма локуса –238 G/A гена *TNF-А* на вероятность достижения УВО нами не выявлено различий в содержании отдельных аллельных вариантов *TNF-А*, что совпадает с данными других авторов [Abbas Z., 2005, He J. et al., 2011].

Известно, что полиморфизм гена эндотелиальной NO-синтетазы (+894 G/T) влияет на активность этого фермента. При аллельном варианте ТТ она минимальна. В нашем исследовании была выявлена тенденция к наличию гомозиготного минорного аллельного варианта ТТ у пациентов группы НО (5,75% против 0%). Потенциальная роль полиморфизма этого гена в достижении УВО при терапии больных ХГС ранее не исследовалась.

С сосудистой дисфункцией и окислительным стрессом связан генетический полиморфизм еще одного фермента – никотинамидадениндинуклеотид фосфат (НАДФ-оксидазы), в субъединице *p22phox* (СУВА +242 C/T). Однако нам не удалось выявить ассоциацию этого полиморфизма субъединицы *p22phox* НАДФ-оксидазы с результатом ПВТ. Ассоциация этого полиморфизма гена СУВА с эффективностью ПВТ исследована не достаточно.

Имеющиеся в настоящее время данные о распространенности мутантных аллелей гена *HFE* (C282Y, H63D, S65C) у больных ВГС достаточно противоречивы [Lawrie W. et al., 2001]. Отмечается влияние однонуклеотидных замен гена *HFE* (+63 H/D и +282 C/Y) на эффективность ПВТ. Было показано, что аллельный вариант гена гемахроматоза (+63HD) значительно чаще обнаруживается у больных с УВО в Польше (западные славяне) [Sikorska K. et al., 2010]. Гетерозиготное состояние по +63 H/D и +282 C/Y ассоциировано с достижением первичного [Gattoni A., 2006] и устойчивого

вирусологического ответа у коренных жителей Италии и Франции [Carneiro M.V. et al., 2010; Lebreu P., 2004]. Нами не выявлено различий по частоте обнаружения минорных форм (H/D и D/D) в сравниваемых группах больных, что мы связываем с генетическими особенностями восточнославянской популяции. Связь полиморфизма +63 H/D гена *HFE* и ответом на ПВТ была обнаружена у больных ХГС жителей Норвегии не славянского происхождения [Distant S. et al., 2002].

Аллельная вариация C282Y гена *HFE*, при которой происходит замена остатка цистеина на тирозин, ассоциирована с развитием гемохроматоза. В нашем исследовании не обнаружено ассоциации между выявлением минорных аллелей и большой вероятностью закончить терапию без УВО. Ранее такую зависимость установили для пациентов из Польши (западные славяне) и из Норвегии (не славянского происхождения) [Distant S. et al., 2002; Sikorska K. et al., 2010].

Итак, исследуя роль генетического полиморфизма больных на эффективность противовирусной терапии было установлено, что ОНП генов *IL-1B* и *IL-28B* ассоциированы с УВО.

5. 2. 2. Влияние генетических факторов пациента на скорость развития фиброза печени

Полиморфизм интерлейкина *IL-1B*, как полифункциональный цитокин, мог быть вовлечен в регуляцию сложных процессов регуляции скорости развития фиброза печени у пациентов с ХГС. Ранее было обнаружено, что у коренных жителей Японии с ХГС в цирротической стадии или с ГЦК преобладает вариант ТТ [Tanaka Y., et al., 2003].

В нашем исследовании генотип ТТ достоверно чаще обнаруживается у пациентов с быстрой скоростью развития фиброза, чем у пациентов с медленной или умеренной. А аллельный вариант СТ гена *IL-1B* встречается чаще в группе с медленной скоростью развития фиброза, чем в группе с быстрой. Очевидно, это связано с тем, что при

гетерозиготном генотипе уровень секреции этого цитокина ниже, чем при минорном гомозиготном.

Некоторыми авторами были найдены ассоциации полиморфизма –174C/G гена *IL-6* и степенью фиброза печени при ВГС в популяции коренных жителей Италии [Cussigh A. et al., 2011]. Аллель G полиморфизма –174C/G гена *IL-6* чаще ассоциировался с развитием тяжелой степени фиброза печени у больных ХГС в популяции коренных жителей Франции [Bedossa P., Poynard T., 1996]. Примечательно, что среди коренного населения Италии носительство аллеля –174G гена *IL-6* и тяжелая степень фиброза чаще встречается у мужчин [Cussigh A. et al., 2011]. В нашем исследовании не установлено ассоциации ОНП этого гена со скоростью развития фиброза печени. Вероятно, это связано с этногенетическими особенностями наших пациентов.

Полиморфизм гена *IL-10* в промоторе в положении –1082 G>A ассоциирован с разным уровнем продукции этого цитокина [Pestka S et al., 2004]. Более низкий уровень *IL-10* характерен для генотипа AA. У пациентов из Италии с таким генотипом отличалось более медленное развитие фиброза [Falleti E. et al., 2007]. В нашем исследовании взаимосвязь данного цитокина со скоростью формирования фиброза не обнаружена, что, вероятно, объясняется генетическими особенностями восточных славян.

Влияние ОНП гена *IL-28B* на тяжесть заболевания интенсивно изучается. Для пациентов из Италии установлено, что более быстрое формирование ФП ассоциировано с генотипами СТ и ТТ в локусе rs12979860 и вариантами GT и GG в локусе rs8099917, а в случае развития ХГС-ЦП достоверно чаще выявлялся вариант ТТ в локусе rs12979860 [Di Marco V. et al., 2012; Fabris C. et al., 2011]. Недавно появилось сообщение о том, что эти ОНП влияют на скорость формирования ФП у пациентов восточнославянского происхождения. Вероятно, расхождения с нашими результатами произошли из-за того,

что пациентов с генотипом TT и GG было мало у групп с различной скоростью развития фиброза.

TNF-A – полифункциональный цитокин, уровень которого в сыворотке крови часто бывает повышен при ХГС [Constantini P.K. et al., 2002]. Однонуклеотидный полиморфизм гена *TNF-A* в промоторной части в положении –238 влияет на экспрессию и, соответственно, на содержание этого цитокина в крови. При варианте AA наблюдается низкий уровень *TNF-A*. В нашем исследовании обнаружено, что аллели GA и AA достоверно чаще обнаруживаются у пациентов с быстрым развитием фиброза, что совпадает с данными других авторов, полученными для европейской популяции (жители Германии) [Hohler T. et al., 1998].

Полиморфизм гена *TGF-B1*, приводящий к замене G915C в кодирующей части, влияет на продукцию цитокина. При варианте GG отмечается высокое содержание *TGF-B1*, при GC – промежуточное и при CC – низкое [Pereira F.A. et al., 2008]. Лиц с генотипом CC гена *TGF-B1* в нашем исследовании не выявлено, что может свидетельствовать о его низкой распространенности среди больных восточнославянского происхождения в Московском регионе. Как установлено ранее, аллельные варианты, приводящие к высокой секреции *TGF-B1*, являются факторами риска прогрессирования фиброза печени [Wilson L.E. et al., 2006]. У коренных жителей Германии с высокой степенью фиброза печени (F3-F4), аллель +915G встречался в два раза чаще, чем у пациентов с легкой степенью фиброза печени (F1-F2). Однако не было выявлено связи между степенью некрОВОспалительной активности и генотипами *TGF-B1* [Tag CG et al., 2003]. Но описана взаимосвязь между генотипом GG, высокой продукцией *TGF-B1* и развитием фиброза легких и печени для коренных жителей Австралии [Powell E.E et al., 2000]. Ранее было показано для коренных жителей Германии, что у лиц с быстрым развитием ФП достоверно чаще выявляется генотип CC гена

TGF-B1 [Eurich D., et al., 2011]. В нашем исследовании достоверно чаще в группе с умеренной скоростью встречался генотип GG, чем в группе с быстрой. Генотип GC, наоборот, достоверно чаще встречается у пациентов с быстрой скоростью фиброгенеза, чем у пациентов с умеренной. Очевидно, что эти особенности характерны для пациентов восточнославянского происхождения.

Известно, что повышенный уровень NO может стимулировать ангиогенез, образование микротромбов, ишемические нарушения и фиброз печени [McNaughton L., et al., 2002]. Поэтому мы исследовали ОНП гена *NOS3* в локусе (G894T) разные аллельные варианты которого приводят к различной активности фермента. Установлено, что при варианте TT активность синтетазы снижена. В нашем исследовании не обнаружено влияния этого полиморфизма на скорость развития ФП. Ранее ассоциацию данного полиморфизма со скоростью течения ФП никто не изучал.

Установлено, что генетический полиморфизм НАДФ-оксидазы связан с сосудистой дисфункцией. Этот фермент играет также значительную роль в развитии воспалительной активности Купферовских клеток [Bataller R., et al., 2003]. У экспериментальных животных инактивация НАДФ оксидазы предотвращала развитие тяжелого поражения печени. Нам удалось выявить тенденцию к более частому обнаружению гетерозиготного варианта СТ у пациентов из группы с медленным развитием ФП. Влияние полиморфизм гена *CYBA* на развитие ФП ранее не исследовалось. Для генотипа СТ характерна средняя продукция данного фермента, что благоприятнее сказывается на эндотелии, чем мажорный гомозиготный аллельный вариант.

По данным Е.А.Кулагиной мутантные аллели гена *HFE* (+282C/Y и +63H/D) достоверно чаще ассоциируются с синдромом перегрузки железа (СПЖ) и клиническими признаками гемохроматоза при ХГС у пациентов Московского региона. [Кулагина Е.А., 2006]. У смешанных

гетерозиготных носителей +282C/Y и +63H/D при хроническом гепатите С выявлена наибольшая частота СПЖ и клинических признаков гемохроматоза. Как установлено ранее многими исследователями, у пациентов с ХГС в 30-40% случаев выявляется нарушение гомеостаза железа, причиной которого может быть неблагоприятный аллельный вариант гена наследственного гемахроматоза (HFE), дисфункция обменных процессов из-за хронической ВГС-инфекции и сочетание обоих факторов [Dostalikova-Cimburova M. et al., 2012]. В ряде публикаций анализирующих выборки жителей Америки и Италии показано, что для больных ХГС с аллельными вариантами HD, DD и CY, YY по этим ОНП гена *HFE*, характерно более тяжелое течение гепатита [Bonkovsky H.L. et al., 2006; Corengia C. et al., 2005]. Однако есть и противоположное мнение [Gattoni A., et al., 2006]. В РФ среди доноров восточнославянского происхождения частота встречаемости гетерозиготных носителей гена *HFE* по локусу 63 составляют около 20-27%, а по локусу 282 – около 6,4% [Лавров А.В., 2004; Самоходская Л.М. и соавт., 2007]. Эти данные согласуются с результатами, полученными другими авторами для коренных жителей Европы славянского и неславянского происхождения [Абдуллаев С.М. и соавт., 2006; Gehrke S.G. et al., 2003; Rasal L. et al., 2007]. В нашем исследовании в группах пациентов с разной скоростью формирования фиброза печени статистически значимых различий выявлено не было. Однако у пациентов с быстрой скоростью фиброза аллели CY и YY встречались чаще, чем у пациентов с медленной и умеренной скоростью фиброза. Закономерность имеет хорошо выраженную тенденцию.

Интересно отметить, что у наших больных длительность инфицирования (11-12 лет) и возраст инфицирования (около 30 лет) были почти одинаковыми в группе пациентов с медленной и умеренной скоростью формирования фиброза, но не в группе с быстрым развитием. Средняя скорость фиброзирования в группе с медленным развитием ФП

была достоверно ниже, чем в остальных группах. Между группами с умеренным и быстрым развитием ФП статистически достоверных различий не выявлено. Очевидно, большинство пациентов из группы с умеренной скоростью формирования ФП через 8-9 лет (разница в длительности инфицирования между этими группами) достигнут цирротической стадии ХГС.

5. 3. Роль сочетанного влияния факторов вируса и пациента в эффективности противовирусной терапии и развитии фиброза печени

В нашем исследовании при работе с большим массивом накопленных данных о полиморфизме вируса и отдельных генов пациентов с ХГС возникла необходимость многофакторной статистической обработки данных. В результате сравнительного анализа групп пациентов и факторов вируса была создана комплексная модель. В этой модели использовалась система условных баллов, согласно которым можно прогнозировать исход противовирусной терапии и скорость развития фиброза печени. Данная прогностическая модель была представлена впервые.

Для прогнозирования исхода противовирусной терапии статистически значимыми оказались ОНП генов хозяина *IL-1B* (–511 C>T) и *IL28B* (rs12979860 C>T, rs8099917 T>G). Значимость данных ОНП в ПВТ была описана нами в публикациях и согласуется с данными других авторов [Abbas Z. et al., 2005; Halfon P. et al., 2011; Moghaddam A. et al., 2011]. С появлением хотя бы одной минорной аллели по этим генам количество условных баллов увеличивалось, а вероятность достижения УВО у пациентов с ХГС уменьшалась. Самый благоприятный прогноз ПВТ характерен для пациентов с наименьшим количеством условных баллов, а именно наличие мажорных аллельных вариаций по всем трем генам. Однако определяющим фактором в

прогнозе противовирусной терапии остается субтип вируса, которым инфицирован пациент. Согласно ученым исследующим другие этносы, вирус гепатита С генотипа 1 (1a, 1b) гораздо хуже поддается лечению, чем генотипа 2, 3 [Fujino H et al., 2013; Marciano S et al., 2014; Pol S et al., 2014].

При прогнозе скорости развития фиброза печени статистически значимыми оказались ОНП генов хозяина *TNF-A* (–238 G>A) и *HFE* C282Y. Значимость данных ОНП в скорости развития фиброза была описана нами в публикациях и согласуется с данными других авторов [Hohler T. et al., 1998; Абдуллаев С.М., и соавт., 2006; Gehrke S.G., et al., 2003.; Kankova K.. et al., 2002]. С появлением хотя бы одной минорной аллели по этим генам количество условных баллов увеличивалось, также как и вероятность быстрой скорости фиброгенеза. Самый благоприятный прогноз, при котором скорость развития фиброза печени минимальна, характерен для пациентов с наименьшим количеством условных баллов, а именно наличие мажорных аллельных вариаций по обоим генам. Однако определяющим фактором в прогнозе скорости развития фиброза печени остается субтип вируса, которым инфицирован пациент [Ackefors M. et al., 2013; Shoeb D. et al., 2013].

При многофакторном анализе также было показано, что у пациентов восточнославянского происхождения наличие генотипа СС гена *IL28B* по локусу rs12979860 в 94,74% ассоциирован с наличием генотипа ТТ rs8099917 этого же гена. Эти данные свидетельствуют о том, что оба локуса, вероятно, наследуются сцепленно, так как находятся на одной хромосоме. Очевидно, частое сочетание аллельных пар СС (rs12979860) и ТТ (rs8099917) является особенностью нашей выборки пациентов (восточнославянского происхождения).

Нами было показано лица, обладающие генотипами СС и ТТ в полиморфных локусах rs12979860 и rs8099917 гена *IL28B* достоверно

чаще достигали УВО по сравнению с лицами, имеющими все другие возможные аллельные варианты по данным локусам.

Многофакторный анализ пациентов, прошедших курс противовирусной терапии выявил, что лица, инфицированные не первым генотипом вируса, и имеющие генотип СС по локусу rs12979860 гена *IL-28B* почти в три раза чаще достигают УВО, по сравнению остальными пациентами.

Анализируя скорость развития фиброза печени, нами была обнаружена взаимосвязь между длительностью инфицирования и субтипом вируса. Пациенты, инфицированные вирусом субтипа 1b, чаще встречаются в группе с большой длительностью инфицирования (более 10 лет), чем в группе с небольшой длительностью инфицирования (до 10 лет). Четких данных об ассоциации ВГС генотипа 1 с быстрой скоростью развития фиброза печени не получено. Напротив, инфицирование вирусом субтипа 3a – ассоциировано с медленной скоростью развития фиброза, а 2a – с умеренной.

При многофакторном анализе влияния субтипа вируса и аллельных вариаций на скорость фиброгенеза печени получена достоверно значимая ассоциация для ОНП гена *IL-1B*. У пациентов, инфицированных вирусом субтипов 2a и 3a и имеющих аллельную вариацию ТТ гена *IL-1B* чаще встречались в группе с быстрой скоростью фиброгенеза, чем в группе с медленной скоростью развития фиброза. Данный факт связан с тем, что даже при инфицировании «благоприятным» субтипом вируса аллельная вариация ТТ гена *IL-1B* ассоциирована с более быстрым развитием фиброза печени.

Также статистически значимые ассоциации получены для аллельной вариации GA гена *TNF-A*. Этот генотип в сочетании с инфицированием пациента любым субтипом вируса приводит к быстрой скорости фиброгенеза. Данный факт обусловлен неблагоприятным

прогнозом течения фиброгенеза при появлении минорной аллели А гена *TNF-A*.

Итак, установлено сочетанное влияние генетических факторов вируса гепатита С и генов цитокинов, гемохроматоза и генов, связанных с эндотелиальной дисфункцией на эффективность лечения хронического гепатита С пегилированным интерфероном альфа и рибавирином, а также на скорость развития фиброза печени.

Выводы

1. Показано, что среди полиморфных генетических факторов вируса гепатита С: генотип/субтип, количество генетических вариантов, репликативная активность – наиболее значимым для прогноза терапии и оценки скорости развития фиброза печени является генотип вируса. Подтверждена динамика изменения субтипов 1b и 3a в Московском регионе.

2. Установлено, что достижение УВО при двойной стандартной терапии ассоциировано с ОНП генов цитокинов *IL28B* и *IL-1B*. Обнаружена высокая частота одновременной встречаемости аллельных пар СС (rs12979860) и ТТ (rs8099917) гена *IL28B*. Не выявлены ассоциации полиморфизма генов цитокинов: *IL-6* (–174 G>C), *IL-10* (–1082 G>A), *TNF-A* (–238 G>A), *TGF-B1* (+915 G>C); наследственного гемохроматоза – *HFE* (H63D, C282Y) и генов, вовлеченных в развитие эндотелиальной дисфункции *eNOS* (+894 G>T) и оксидативного стресса *p22phox* (+242C>T) с ответом на терапию.

3. Выявлено, что быстрое развитие фиброза печени достоверно чаще наблюдается у пациентов, имеющих аллельный вариант GA (–238 G>A) гена *TNF-A*, генотип GC (+915 G>C) гена *TGF-B1* и вариант CY или YY (C282Y) в белке, кодируемом геном *HFE*. Медленное развитие фиброза печени достоверно чаще отмечается у пациентов с

генотипом GG в локусе –238 G/A гена *TNF-A* и аллельным вариантом СТ (+242 C/T) гена *p22phox*. Не выявлены ассоциации полиморфизма генов цитокинов: *IL-1B* (–511 C>T), *IL-6* (–174 G>C), *IL-10* (–1082 G>A), *IL-28B* (rs12979860 C>T, rs8099917 T>G), и гена, вовлеченного в развитие эндотелиальной дисфункции *eNOS* (+894 G>T) с разной скоростью развития фиброза.

4. Создана прогностическая модель с условной системой баллов. На ее основе установлено, что высокая вероятность достижения УВО отмечается при инфицирование пациента ВГС генотипа 2 или 3 и при выявлении у больного аллелей CC (rs12979860) и TT (rs8099917) гена *IL28B*, отсутствии генотипа TT (–511 C/T) гена *IL-1B*. Высокая вероятность неэффективности терапии наблюдается при инфицирование пациентов вирусом генотипа 1 и при наличии у них T– (rs12979860) или G–аллеля (rs8099917) гена *IL28B* и генотипа TT (–511 C/T) гена *IL-1B*.

5. С помощью данной модели показано, что прогностическими факторами медленной скорости развития фиброза являются: инфицирование пациента вирусом субтипа 3а, наличие в гене *TNF-A* аллельной пары GG (–238 G/A) и варианта CC (C282Y) в белке гена *HFE*. Прогностическими факторами быстрого фиброзирования печени являются: инфицирование ВГС генотипа 1, наличие в гене *TNF-A* аллельного варианта GA (–238 G/A) и вариантов CY и YY (C282Y) в белке гена *HFE*.

Список литературы

1. Абдуллаев С.М., Целищева Ю.И., Самоходская Л.М. и др. Генетические факторы агрессивного течения хронического гепатита С // Вестн. РАМН. 2007. № 1. –С. 8–13.
2. Абдуллаев С.М., Балацкий А.В., Ефименко А.Ю. Полиморфизм гена HFE как фактор прогрессирования фиброза у больных русской этнической принадлежности. // Вестник РГМУ. – 2006. – №2. – С. 49-54
3. Абдуллаев С.М. Автореф диссертации к.м.н. – Москва, 2008. – 24 с.
4. Бацких С.Н., Морозов С.В., Чуланов В.П., Покровский В.И., Вирус гепатита С 3-его типа: такой «простой» и такой «сложный». Терапевтический архив. -2012.-№11. – С. 4-8
5. Гайдаренко А. Д. Прогнозирование проявлений эпидемического процесса гепатита С на основе компьютерного моделирования. Автореф диссертации к.м.н. – Москва, 2009. – 24 с.
6. Дерябин П.Г., Вязов С.О., Исаева Е.И., Самохвалов Е.И., Львов Д.К. Персистенция вируса гепатита С в культурах клеток головного мозга новорожденных мышей. // Вопросы вирусол. – 1997. – Т. 42. – С. 254-258
7. Дмитриев П.Н., Цыкина М.Н., Серков И.Л. и др. Рекомбинация вируса гепатита С. // Мир вирусн. гепатитов - 2009. - №1. –С.3
8. Звягинцева Т.Д., Гриднева С.В. Современные представления о сосудистом эндотелии в норме и при патологии желудочно-кишечного тракта // Эксп. клин.гастроэнтерол. 2005. № 4. С. 6–12.
9. Ивашкин В.Т., Буеверов А.О., Грязин А.Е. Механизмы устойчивости вируса гепатита С к противовирусным препаратам. // Мол. медицина. 2004. № 2. С. 18—23.

10. Ивашкин В.Т., Маммаев С. Н., Буеверов А. О., Шульпекова Ю. О. Взаимодействие вирусов гепатита В и С с клетками иммунной системы макроорганизма. // Клиническая лабораторная диагностика. 2001. – № 7. – С. 45-48.
11. Кузин С.Н., Крель П.Е., Игнатова Т.М., Лопаткина Т.Н., Самохвалов Е.И., Кузина Л.Е., Лавров В.Ф., Лисицына Е.В., Богомолов П.О., Кудрявцева Е.Н., Куприянова Н.В., Коваленко Е.С., Заботина Е.Е., Бурневи Э.З., Корабельникова М.И., Мамонова Н.А. Структура генотипов вируса гепатита у пациентов с хроническим гепатитом С. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. –№ 3. –С. 33-38.
12. Кулагина Е.А. Фенотипические проявления генотипа HFE у больных хроническим гепатитом С с синдромом перегрузки железом. // Бюллетень СО РАМН. 2006. –№4. С –122.
13. Лавров А.В. Молекулярно-генетическая характеристика наследственного гемахроматоза у российских больных. Автореф. дис. канд. мед. наук., 2004.
14. Михайлов М.И. Вирусные гепатиты (энциклопедический словарь). 2004. Изд-во Москва-Амипресс, стр. 107-132.
15. Мукомолов С.Л., Лавакова И.А., Сулягина Л.Г., Синайская Е.В., Болсун Д.Д., Иванова Н.В. Современная эпидемиология гепатита С в России. <https://herexpert.ru>. 2012; –С. 1-6.
16. Петрищев Н.Н. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция. // Под. ред. Петрищева Н.Н. // 2003, СПб.: Изд-во СПбГМУ. 184 с.
17. Пигузова Е. А. Система фактора некроза опухоли альфа и его рецепторов в иммунопатогенезе персистентных вирусных инфекций.// дис. канд. биол. наук. Томск, 2006.

18. Платонов А. Е. Статистический анализ в медицине и биологии. 2000 г.
19. Ратникова Л.И., Мельников И.В. Значение оксида азота в повреждении гепатоцитов при патологии печени. // Эпидемиология и инфекц. болезни // 2002. №. 6. С.50-54
20. Самохвалов Е.И., Николаева Л.И., Альховский С.В. и др. Частота встречаемости отдельных субтипов вируса гепатита С в Московском регионе. // Вопр. вирусологии // 2013.-№1. – С. 36-40
21. Самоходская Л.М., Игнатова Т.М., Абдуллаев С.М., Краснова Т.Н., Некрасова Т.П., Мухин Н.А., Ткачук В.А. Прогностическое значение комбинации аллельных вариантов генов цитокинов и гемохроматоза у больных хроническим гепатитом С. //Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2007. № 2. С.50-56
22. Самоходская Л.М., Лавров А.В., Ефименко А.Ю. и др. Особенности генетики наследственного гемохроматоза в русской популяции. // Медиц. генет. 2007. V.1. С. 32-35.
23. Семенова Н.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Бычков В.А., Чечина О.Е. Роль полиморфизма гена IL-6 -174с/г в развитии хронической HCV-инфекции. // Бюллетень сибирской медицины. 2010. Т.9. №.5.
24. Собчак, Д. М., Монакова Э.А. Показатели иммунитета у больных хроническим гепатитом С при различной гистологической активности. // Клиническая медицина. 2004. № 4. С. 49-52.
25. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. (Монография) 1998. Изд. Теза. С-Петербург., стр. 209- 212.
26. Abbas Z, Moatter T., Hussainy A., Jafri W. Effect of cytokine gene polymorphism on histological activity index, viral load and response to treatment in patients with chronic hepatitis C genotype 3. //World J. Gastroenterol. 2005. V. 11. №.42. P.6656-6661.

27. Ackefors, M., et al. Evolution of fibrosis during HCV recurrence after liver transplantation--influence of IL-28B SNP and response to peg-IFN and ribavirin treatment. //J. Viral. Hepat., 2013. - №20(11). - P. 770-778.
28. Adinolfi L.E., Utili R., Andreana A., Tripodi M.F., Marracino M., Gambardella M., Giordano M., Ruggiero G. Serum HCV RNA levels correlate with histological liver damage and concur with steatosis in progression of chronic hepatitis C. // Dig. Dis. Sci. 2001. V.46. №.8. P. 1677–1683.
29. Alberti A., Benvegna L., Boccato S. Ferrari A., Sebastiani G. Natural history of initially mild chronic hepatitis C. // Dig. Liver Dis. 2004. V. 36, №. 10. P. 646–654.
30. Albina J.E. and Reichner J.S. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. // Cancer Metastasis Rev. 1998. V.17, №.1. P.39-53.
31. Alter M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. // World J. Gastroenterol. 2007. V. 13, №.17. P.2436-2441.
32. Alter M.J., Kruszon-Moran D., Nainan O.V., McQuillan G.M., Gao F., Moyer L.A., Kaslow R.A., Margolis H.S. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. // N Engl J. Med. 1999.V. 41. P. 556-562.
33. Al-Qahtani A.A. et al. Quasispecies of genotype 4 of hepatitis C virus genomes in Saudi patients managed with interferon alfa and ribavirin therapy. // Ann Saudi Med/ - 2010. №.30(2). - P. 109-114.
34. Appel, N., et al. From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication.// J Biol Chem. - 2006. –№281(15). - P. 9833-9836.
35. Arber N., Moshkowitz M., Konikol T. F., Halpern Z, Hallak A, Santo M, Tiomny E, Baratz M, Gilat T. Elevated serum iron predicts poor

response to interferon treatment in patients with chronic HCV infection. // Dig. Dis.Sci. 2001. № 40. P. 2431-2433.

36. Asselah T. Genetic polymorphism and response to treatment in chronic hepatitis C: the future of personalized medicine. // J. Hepatol. 2010. V.52. №.3. P.452-454.

37. Asselah T., Bieche I., Narguet S., Sabbagh A., Laurendeau I., Ripault M.P., Boyer N., Martinot-Peignoux M., Valla D., Vidaud M., Marcellin P. Liver gene expression signature to predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. // Gut. 2008. V. 57. P.516–524.

38. Avila M.A., Mingorance J, Martínez-Chantar M.L., Casado M, Martin-Sanz P, Boscá L, Mato J.M. Regulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase during septic shock: role of nitric oxide. // Hepatology. 1997.V.25. №.2. P.391-396.

39. Azouz A., Razzaque M., El-Hallak M., Taguchi T. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. // Med. Electron Microsc. 2004. V. 37. P. 141–148.

40. Bacon B. R., Tavill A. S., Brittenham G. M., Park C. H., Recknagel R. O. Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. // J. Clin.Invest. 1983. V.71. P. 429–439.

41. Bacon B.R., Britton R.S. The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? // Hepatology. 2001. №. 11. P. 127.

42. Bartenschlager R. Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. // Nat Rev Drug Discov. 2002. V.1. P.911–916.

43. Bataller, R., Paik, Y.H., Lindquist, J.N., Lemasters, J.J. and Brenner, D.A. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. // Gastroenterology. 2004. V.126. P.529-540.

44. Bataller, R., Schwabe, R.F., Choi, Y.H., Yang, L., Paik, Y.H., Lindquist, J., Qian, T., Schoonhoven, R., Hagedorn, C.H., Lemasters, J.J. and Brenner, D.A. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. // *J Clin Invest.* 2003. V.112. P.1383-1394.
45. Bedard K. Krause K.-H. (2007) The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology // *Physiol Rev.* 2007. V.87. P.245–313.
46. Bedossa P., Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group // *Hepatology.* 1996. V. 24. P. 289—293.
47. Behrens S., Tomei L., Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus // *EMBO J.* 1996. V. 15. P. 12–22.
48. Blatt L.M., Mutchnick M.G., Tong M.J., Klion F.M., Lebovics E., Freilich B., Bach N., Smith C., Herrera J., Tobias H., Conrad A., Schmid P., McHutchison J.G. Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with chronic hepatitis C in the United States // *J. Viral Hepat.* 2000. V. 7. №.3. P.196-202.
49. Boni S., Lavergne J.-P., Boulant S., Cahour A. Hepatitis C Virus Core Protein Acts as a trans-Modulating Factor on Internal Translation Initiation of the Viral RNA // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. №.18. P. 17737–17748.
50. Bonkovsky H.L., Troy N., McNeal K., Banner B.F., Sharma A., Obando J., Mehta S., Koff R.S., Liu Q., Hsieh C.C. Iron and HFE or TfR1 mutations as comorbid factors for development and progression of chronic hepatitis C // *J Hepatol.* 2002. V. 37. №.6. P. 848-854.
51. Boudreau, H.E., Emerson, S.U., Korzeniowska, A., Jendrysik, M.A. and Leto, T.L. (2009) Hepatitis C virus (HCV) proteins induce NADPH

oxidase 4 expression in a transforming growth factor beta-dependent manner: a new contributor to HCV-induced oxidative stress. *J. Virol*, 83, P. 12934-12946.

52. Bochud, P.Y., et al. Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C.// *J. Hepatol.* - 2009. №51(4): P. 655-666.

53. Boulant, S., et al. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features.// *J. Virol.* - 2005. №79(17): P. 11353-11365.

54. Bressanelli, S., et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* - 1999. №96(23): P. 13034-13039.

55. Brooks D.G., Trifilo M.J., Edelmann K.H., Teyton L., McGavern D.B., Oldstone M.B. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo // *Nat. Med.* 2006. V.12. P. 1301-1309.

56. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Biology and genetic heterogeneity of hepatitis C virus // *Clin Exp Rheumatol.* 1995. Suppl 13:S3-7.

57. Bukh, J., R.H. Miller, and R.H. Purcell. Genetic heterogeneity of the hepatitis C virus. // *Princess Takamatsu Symp.* - 1995. №25: P. 75-91.

58. Bukh, J., R.H. Purcell, and R.H. Miller. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* - 1994. №91(17): P. 8239-8243.

59. Cahilly C., Ballantyne C.M., Lim D.S., Gotto A., Marian A.J. A variant of p22 (phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis // *Circ Res.* 2000. V.86. P.391– 395.

60. Cam S.F., Sekuri C., Tengiz I. et al. The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature coronary artery disease in a Turkish population // *Thromb. Res.* 2005. V. 116. P.287-292.
61. Canbay A., Friedman, S. and Gores, G.J. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis // *Hepatology.* 2004. V.39. P.273-278
62. Carneiro, M.V., et al. The H63D genetic variant of the HFE gene is independently associated with the virological response to interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C.// *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* - 2010. №22(10): P. 1204-1210.
63. Castejon A. M., Bracero J., Hoffmann I. S., Alfieri A. B., Cubeddu L. X. NAD(P)H oxidase p22phox gene C242T polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanics // *J. Hum Hypertens.* – 2006. Vol. 20, №10. P. 772 – 779.
64. Cecere A., Marotta F., Vangieri B. et al. Progressive liver in-jury in chronic hepatitis C infection is related to altered cel-lular immune response and to different citokine profile // *Panminerva Med.* 2004. № 46. P. 171—187.
65. Chamberlain RW, Adams N, Saeed AA, Simmonds P, Elliott RM. // *J. Gen Virol.* 1997. V.78. №.6. P.1341-1347.
66. Chen T.Y.; Hsieh, Y.S.; Wu, T.T.; Yang, S.F.; Wu, C.J.; Tsay, G.J.; Chiou, H.L. Impact of serum levels and gene polymorphism of cytokines on chronic hepatitis C infection // *Transl. Res.* 2007. V. 150. P. 116-121.
67. Chen, Y. and J. Pei. An assessment of a TNF polymorphic marker for the risk of HCV infection: meta-analysis and a new clinical study design.// *Infect. Genet. Evol.* - 2009. №9(6): P. 1356-1363.

68. Cheng YQ, Lin JS, Wang WQ, Xiong P, Jiang XD. Inflammation and repair in viral hepatitis C // *Dig Dis Sci*. 2008. V.53. №.6. P.1468-1487.
69. Choi, J. and Ou, J.H. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006. V.290. P.847-851.
70. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome // *Science*. 1989.V. 244. N4902. P.359-362.
71. Chung, K.M., et al. Nonstructural protein 5A of hepatitis C virus inhibits the function of karyopherin beta3.// *J. Virol.* - 2000. №74(11): P. 5233-5241.
72. Cocquerel, L., et al. The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum.// *J. Virol.* - 1999. №73(4): P. 2641-2649.
73. Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, Masetti S, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clin Chem*. 2003;49:P. 389–395
74. Constantini P.K., Wawrzynowicz-Syczewska, M; Clare, M; Boron-Kaczmarska, A; McFarlane, IG; Cramp, ME; Donaldson, PT 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. V.22. №.5. P.404-412.
75. Corengia, C., et al. Iron accumulation in chronic hepatitis C: relation of hepatic iron distribution, HFE genotype, and disease course. // *Am. J. Clin. Pathol.* - 2005. №124(6): P. 846-853
76. Cussigh A, Falletti E, Fabris C, Bitetto D, Cmet S, Fontanini E, Bignulin S, Fornasiere E, Fumolo E, Minisini R, Pirisi M, Toniutto P.

Interleukin 6 promoter polymorphisms influence the outcome of chronic hepatitis C *Immunogenetics* // *Immunogenetics*. 2011. V. 63. P.33–41.

77. Cussigh, A., et al. Interleukin 6 promoter polymorphisms influence the outcome of chronic hepatitis C. // *Immunogenetics*. - 2011. №63(1): P. 33-41.

78. Dai CY, Chuang WL, Lee LP, et al. Associations of tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 and -238 with clinical characteristics of chronic hepatitis C// *J Viral Hepat*. 2006. V.13.P. 770-774.

79. Dai, C.Y.; Chuang, W.L.; Lee, L.P.; Pan, W.C.; Huang, J.F.; Hsieh, M.Y.; Hou, N.J.; Lin, Z.Y.; Chen, S.C.; Hsieh, M.Y.; Wang, L.Y.; Chang, W.Y.; Yu, M.L. Association between transforming growth factor-beta polymorphism and virologic characteristics of chronic hepatitis C // *Transl.Res*. 2008, P. 151-156.

80. Di Marco V., Bronte F., Calvaruso V. et al. IL28B polymorphisms influence stage of fibrosis and spontaneous or interferon-induced viral clearance in thalassemia patients with hepatitis C virus infection. // *Haematologica*. – 2012 – Vol. 97. – P. 679-686.

81. Di Castelnuovo A, Soccio M, Iacoviello L, Evangelista V, Consoli A, Vanuzzo D *et al*. The C242T polymorphism of the p22phox component of NAD (P)H oxidase and vascular risk. Two case–control studies and a meta-analysis // *Thromb Haemost*. 2008. V.99. P.594–601.

82. Di Giovine F.S., Takhsh E., Blakemore A.I., Duff G.W. Single base polymorphism at –511 in the human interleukin-1 beta gene (IL1 beta) // *Hum. Mol. Genet*. 1992. V. 1, № 6. P. 450.

83. Dinanuer M.C., Pierce, E.A., Bruns, G.A., Curnutte, J.T., Orkin, S.H. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal

recessive chronic granulomatous disease // J. Clin. Invest. 1990. V.86. №5. P.1729–1737.

84. Distant S., Bjoro K., Hellum K.B. et al. Raised serum ferritin predicts non-response to interferon and ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C infection // Liver. 2002. V. 22. P. 269-275.

85. Dostalíkova-Cimburova M., Kratka K., Stránský J. et al. Iron overload and HFE gene mutation in Czech patients with chronic liver diseases. // Dis. Markers. – 2012. – Vol. 32. – P. 65-72.

86. Drakesmith H, Prentice A. Viral infection and iron metabolism // Nat Rev Microbiol. 2008. V.6. №7. P.541-552.

87. Duranski M.R., Greer J.J., Dejam A, et al. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver // J. Clin Invest. 2005. V.115. P.1232–1240.

88. Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, et al. Hepatitis C virus genotypes: An investigation of type-specific differences in geographic origin and disease // Hepatology. 1994. V.19. P.13-18.

89. Duvet S., et al. Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval.// J. Biol. Chem. - 1998. №273(48): P. 32088-32095.

90. Elefsiniotis I.S., et al. Differential viral kinetics in treated genotype 4 chronic hepatitis C patients according to ethnicity.// J. Viral. Hepat. - 2009. №16(10): P. 738-742.

91. Eurich D., Bahra M., Boas-Knoop S. et al. Transforming growth factor beta1 polymorphisms and progression of graft fibrosis after liver transplantation for hepatitis C virus-induced liver disease // Liver Transplant. – 2011. – Vol. 17. – P. 279-288

92. Fabris C., Falletti E, Cussigh A. et al. IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: role in the course of chronic

viral hepatitis and the development of HCC // J. Hepatol. – 2011. – Vol. 54. – P. 712-722.

93. Fan, X. et al. High diversity of hepatitis C viral quasiespecies is associated with early virological response in patients undergoing antiviral therapy.// Hepatology. - 2009. №50(6): P. 1765-1772.

94. Farci P., Strazzera R., Alter J. et al. Early changes in hepatitis C viral quasiespecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99 – P. 3081-3086.

95. Farinati F, Cardin R, Bortolami M, Guido M, Rugge M. Oxidative damage, pro-inflammatory cytokines, TGF- α and c-myc in chronic HCV-related hepatitis and cirrhosis // World J. Gastroenterol. 2006. V.12. P. 2065–2069

96. Falletti E., Fabris C., Toniotto P. et al. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and liver fibrosis progression due to recurrent hepatitis C // J. Interferon Cytokine Res. – 2007. – Vol. 27. – P. 239-246.

97. Feder J. N., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy D.A., Basava A., Dormishian F., Domingo R. Jr, Ellis M.C., Fullan A., Hinton L.M., Jones N.L., Kimmel B.E., Kronmal G.S., Lauer P., Lee V.K., Loeb D.B., Mapa F.A., McClelland E., Meyer N.C., Mintier G.A., Moeller N., Moore T., Morikang E., Prass C.E., Quintana L., Starnes S.M., Schatzman R.C., Brunke K.J., Drayna D.T., Risch N.J., Bacon B.R., Wolff R.K.. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis // Nature Genet.1996. V. 13. P. 399–408.

98. Fishman D., Faulds G., Jeffery R., Mohamed-Ali V., Yudkin J.S., Humphries S., et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis // J. Clin Invest. 1998. V.102. P.1369–1376.

99. Frank N. et al. Effects of rice bran oil on plasma lipid concentrations, lipoprotein composition, and glucose dynamics in mares.// J. Anim. Sci. - 2005. №83(11): P. 2509-2518.
100. Fujita, N., Takei Y. Iron, hepatitis C virus, and hepatocellular carcinoma: iron reduction preaches the gospel for chronic hepatitis C // J. Gastroenterol.2007. V. 42. P.923–926.
101. Fujinaga H. et al. Hepatocarcinogenesis in hepatitis C: HCV shrewdly exacerbates oxidative stress by modulating both production and scavenging of reactive oxygen species. //Oncology. - 2011. №81 Suppl. 1: P. 11-17.
102. Fujino H. et al., Predictive value of the IFNL4 polymorphism on outcome of telaprevir, peginterferon, and ribavirin therapy for older patients with genotype 1b chronic hepatitis C.// J. Gastroenterol., - 2013.
103. Fukushi S, Okada M, Stahl J, Kageyama T, Hoshino FB, Katayama K. Ribosomal protein S5 interacts with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. J. Biol Chem. 2001 Jun 15;276(24):P. 20824-20826.
104. Fung J., Lai C.L., Hung, Young J., Cheng C., Wong D., Yuen M.F. Chronic hepatitis C virus genotype 6 infection: response to pegylated interferon and ribavirin // The Journal of Infectious Diseases.2008. V.198. №.6808–6812.
105. Gale M.J. Jr., et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. //Virology. - 1997. №230(2): P. 217-227.
106. Galli A., Svegliati-Baroni G., Ceni E., Milani S., Ridolfi F., Salzano R., Tarocchi M., Grappone C., Pellegrini G., Benedetti A., Surrenti C., Casini A. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2- mediated mechanism // Hepatology. 2005. V.41. P. 1074–1084.

107. Gattoni A., Parlato A., Vangieri B. et al. Role of hemochromatosis genes in chronic hepatitis C // Clin. Ter. 2006. V. 157. P. 61-68.
108. Ge D., Fellay J., Thompson A.J., Simon J.S., Shianna K.V., Urban T.J., Heinzen E.L., Qiu P., Bertelsen A.H., Muir A.J., Sulkowski M., McHutchison J.G., Goldstein D.B. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance // Nature. 2009. V.461. №.7262. P.399-401.
109. Gehrke S.G., Stremmel W., Mathes I. et al. Hemochromatosis and transferrin gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype. // J. Mol. Med. – 2003. – Vol. 81. – P. 780-787.
110. Gewaltig J., Mangasser-Stephan K., Garton C. et al. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis // Clin. Chim. Acta. 2002. V. 316, № 1–2. P. 83–94.
111. Gonzalez-Amaro R., Garcia-Monzon C., Garcia-Buey L. et al. Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis // J. Exp Med. 1994. V.179. P. 841–848.
112. Goyal A., Kazim S.N., Sakhuja P., Malhotra V., Arora N., Sarin S.K. Association of TNF-beta polymorphism with disease severity among patients infected with hepatitis C virus // J. Med Virol. 2004. V.72. №.1. P.60-65.
113. Grakoui A. et al. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. //J. Virol. - 1993. №67(3): P. 1385-1395
114. Grakoui A., Shoukry N.H., Woollard D.J., Han J.H., Hanson H.L., Ghayeb J., Murthy K.K., Rice C.M., Walker C.M. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help.// Science. 2003. V. 302. P. 659–662.

115. Griffin S. and P. Karran. Incision at DNA G.T mispairs by extracts of mammalian cells occurs preferentially at cytosine methylation sites and is not targeted by a separate G.T binding reaction. //Biochemistry. - 1993. №32(48): P. 13032-13039
116. Halfon, P. and P. Cacoub, [IL-28B polymorphism and hepatitis C: impact on viral clearance--prolonged, spontaneous and after treatment with antiviral drugs]. Rev Med Interne, 2011. 32(5): p. 271-4.
117. Hanafiah M. et al. Probable hepatic tuberculosis masquerading as Klatzkin tumour in an immunocompetent patient.// BMJ. Case. Rep. - 2013.
118. Hardie W.D., Le Cras T.D., Jiang K. et al. Conditional expression of transforming growth factor-alpha in adult mouse lung causes pulmonary fibrosis // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. – 2004. – V. 286, № 4. – P. 741 – 749.
119. Hassan M.I. et al. Antiproliferative effect of hepatitis C virus on mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells: potential role in viral persistence in Egyptian patients. //Clin. Biochem. - 2007. №40(16-17): P. 1173-1179.
120. He J. et al. The relationship between tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and hepatitis C virus infection: a systematic review and meta-analysis.// Ren. Fail. - 2011. №33(9): P. 915-922.
121. Helmy A., Newby D.E., Jalan R. Enhanced vasodilatation to endothelin antagonism in patients with compensated cirrhosis and the role of nitric oxide // Gut. – 2003. – V. 52. – P. 410–415.
122. Hingorani A.D., Jia H., Stevens P.A., Monteith P.S. et al (1995) A common variant in exon 7 of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene // Clin Sci. V.88. P.21.

123. Hohler T. et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection. //J. Med. Virol. - 1998. №54(3): P. 173-177.

124. Honda M, Sakai A, Yamashita T, et al. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C // Gastroenterology. 2010. V.139. №.2. P.499–509.

125. Houghton M., Weiner A., Han J., Kuo G., Choo Q.L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease // Hepatology. 1991. V.14. P.381-388.

126. Hourieux C. et al. Core protein domains involved in hepatitis C virus-like particle assembly and budding at the endoplasmic reticulum membrane. //Cell Microbiol. - 2007. №9(4): P. 1014-1027.

127. Hutyrova B., Pantelidis P., Drabek J., Zůrková M., Kolek V., Lenhart K., Welsh K.I., Du Bois R.M., Petrek M.. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis // Am J. Respir Crit Care Med. 2002. V.165. P.148– 151.

128. Inoue N., Kawashima S., Kanazawa K., Yamada S., Akita H., Yokoyama M. Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease //Circulation. 1998. –Vol. 97, №.2. P. 135 – 137.

129. Jin X., Zimmers T.A., Perez E.A. et al. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair // Hepatology. 2006. V. 43, № 3. P. 474–484.

130. Jonsson, J. R. C. J. Edwards-Smith, S. C. Catania et al. Expression of cytokines and factors modulating apoptosis by human sinusoidal leucocytes // J. Hepatol. 2000. V. 32. P. 392-398.

131. Jones C.T. et al. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. //J. Virol. - 2007. №81(16): P. 8374-8383.

132. Kalinina O. et al. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg.// J. Virol. - 2002. №76(8): P. 4034-4043.

133. Kankova K. et al. Relations among serum ferritin, C282Y and H63D mutations in the HFE gene and type 2 diabetes mellitus in the Czech population. //Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes - 2002. №110(5): P. 223-229.

134. Kato J., Miyanishi K., Kobune M., Nakamura T., Takada K., Takimoto R., Kawano Y., Takahashi S., Takahashi M., Sato Y., Takayama T., Niitsu Y. Long-term phlebotomy with low-iron diet therapy lowers risk of development of hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis C // J. Gastroenterol. 2007. V.42. P.830–836.

135. Kim K.M. et al. Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. //Circ. Res. - 2007. №101(9): P. 919-927.

136. Kimura, T., Saito, T., Yoshimura, M., Yixuan, S., Baba, M., Ji G.; Muramatsu M.; Kawata S. Association of transforming growth factor-beta 1 functional polymorphisms with natural clearance of hepatitis C virus // J. Infect. Dis. 2006. V.193. P. 1371-1374.

137. Kinnman N., Andersson U., Hultcrantz R. In situ expression of transforming growth factor-beta1-3, latent transforming growth factor-beta binding protein and tumor necrosis factoralpha in liver tissue from patients with chronic hepatitis C // Scand. J. Gastroenterol. 2000. V. 35, №. 12. P. 1294 – 1300.

138. Kirkali G., Gezer S., Umur N., Zcan A., Tankurt E. Nitric Oxide in Chronic Liver Disease // Turk J. Med Sci. 2000. P. 511-515.

139. Kitade M., Yoshiji H., Noguchi R., Ikenaka Y., Kaji K., Shirai Y., Yamazaki M., Uemura M., Yamao J., Fujimoto M., Mitoro A., Toyohara M., Sawai M., Yoshida M., Morioka C., Tsujimoto T., Kawaratani H. and Fukui H. Crosstalk between angiogenesis, cytokeratin-18, and insulin resistance in the progression of non-alcoholic steatohepatitis // *World J. Gastroenterol.* 2009. V.15. P.5193-5199.

140. Kolykhalov A.A. et al. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. // *J. Virol.* - 2000. №74(4): P. 2046-2051.

141. Korf M., Jarczak D., Beger C., Manns M.P., Krüger M. Inhibition of hepatitis C virus translation and subgenomic replication by siRNAs directed against highly conserved HCV sequence and cellular HCV cofactors // *J. Hepatol.* 2005. V. 43. P. 225–234.

142. Kowdley K.V. Iron hemochromatosis and hepatocellular carcinoma // *Gastroenterology.* 2004. V. 127. P.79-86.

143. Koziel M.J., Dudley D., Afdhal N., Grakoui A., Rice C.M., Choo Q.L., Houghton M., Walker B.D. HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus – identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release // *J. Clin Invest.* 1995. V.96. P. 2311–2321.

144. Kurbanov F. et al. Detection of hepatitis C virus natural recombinant RF1_2k/1b strain among intravenous drug users in Uzbekistan. // *Hepatol. Res.* - 2008. №38(5): P. 457-464.

145. Lambeth J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen // *Nat. Rev. Immunol.* 2004. V.4. P.181 – 189.

146. Lander E.S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome // *Nature.* 2001/ - V.409. – P. 860-921.

147. Laperche S., Lunel F., Izopet J., Alain S., Dény P., Duverlie G., Gaudy C., Pawlotsky J.M., Plantier J.C., Pozzetto B., Thibault V., Tosetti F., Lefrère J.J.. Comparison of hepatitis C virus NS5b and 5' noncoding gene sequencing methods in a multicenter study.// J. Clin. Microbiol. – 2005.- №43(2): P.733-739.
148. Larrea E., Garcia N., Qian C., Civeira M.P., Prieto J. Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C // Hepatology. 1996. V.23. P.210–217.
149. Lawrie W., Powell M.D. Hemochromatosis: the paradigm for Population Screening for Genetic Diseases // World Gastroenterology news. 2001. V. 6. P. 2-3.
150. Lebrey P., Zylberberg H., Hue S. et al. Influence of HFE gene polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C // J. Viral. Hepat. 2004. V.11. P. 175-182.
151. Lee Y.M. et al. Molecular epidemiology of HCV genotypes among injection drug users in Taiwan: Full-length sequences of two new subtype 6w strains and a recombinant form_2b6w.// J. Med. Virol. - 2010. №82(1): P. 57-68.
152. Leopold J. A., Loscalzo J. Oxidative enzymopathies and vascular disease // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2005. – Vol. 25, №7. P. 1332 – 1340.
153. Levrero, M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. //Oncogene. - 2006. №25(27): P. 3834-3847.
154. Li K. et al. Improved performance of primary rat hepatocytes on blended natural polymers. //J. Biomed. Mater Res. A. - 2005. №75(2): P. 268-274.

155. Lin C. and C.M. Rice. The hepatitis C virus NS3 serine proteinase and NS4A cofactor: establishment of a cell-free trans-processing assay. //Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. - 1995. №92(17): P. 7622-7626.

156. Lin E., Hwang Y., Wang S.C., et al. An artificial neural network approach to the drug efficacy of interferon treatments // Pharmacogenomics. 2006. V.7. P. 1017–1024.

157. Lio D, Caruso C, Di Stefano R et al. IL-10 and TNF-alpha polymorphisms and the recovery from HCV infection // Hum. Immunol. 2003. V. 64.P. 674–680.

158. Llovet J.M. and J. Bruix. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma.// Hepatology. - 2008. №48(4): P. 1312-1327.

159. Lvov D.K., Samokhvalov E.I., Tsuda F. et al. Prevalence of hepatitis C virus and distribution of its genotypes in Northern Eurasia // Arch. Virology. – 1996. –Vol. 141. – P. 1613-1622.

160. Majumder M. et al. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. //J. Virol. - 2001. №75(3): P. 1401-1407.

161. Mangia A. Individualizing treatment duration in hepatitis C virus genotype 2/3-infected patients // Liver International. 2011. V.31, №. 1. P. 36–41.

162. Marcello T., Grakoui A., Barba-Spaeth G., Machlin E.S., Kotenko S.V., MacDonald M.R., et al. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics // Gastroenterology. 2006. V.131. P.1887–1898.

163. Marciano S. and A.C. Gadano. How to optimize current treatment of genotype 2 hepatitis C virus infection?// Liver Int. - 2014. №34 Suppl. 1: P. 13-17.

164. Martell M., Esteban J.L., Quer J., Genesca J., Weiner A., Esteban R., Guardia J., Gomez J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of

different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution // J. Virol. 1992. V. 66 P. 3225– 3239.

165. McLauchlan J. et al. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. //Embo. J. - 2002. №21(15): P. 3980-3988.

166. McNaughton L., Puttagunta L., Martinez-Cuesta M.A. et al. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 17161-17166.

167. Meenagh A., Williams F., Ross O.A., Patterson C., Gorodezky C., Hammond M., Leheny W.A., Middleton D. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America // Hum Immunol. 2002. V. 63. P. 1055–1061.

168. Minton E.J., Smillie D., Smith P., Shipley S., McKendrick M.W., Gleeson D.C., Underwood J.C., Cannings C., Wilson A.G. Clearance of hepatitis C virus is not associated with single nucleotide polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 genes // Hum Immunol. 2005. V.66. P.127–132.

169. Miyamoto Y., Saito Y., Kajiyama N., Yoshimura M., Shimasaki Y. et al (1998). Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension // Hypertension. 1998. V.32. P.3–8.

170. Moghaddam A. et al. IL28B genetic variation and treatment response in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection. //Hepatology. - 2011. №53(3): P. 746-754.

171. Moreau I. et al. Correlation between pre-treatment quasispecies complexity and treatment outcome in chronic HCV genotype 3a.// Virol. J. - 2008. №5: P. 78.

172. Moureau G. et al. Flavivirus RNA in phlebotomine sandflies.// Vector Borne Zoonotic. Dis. - 2010. №10(2): P. 195-197.

173. Murray C.L. et al. Alanine scanning of the hepatitis C virus core protein reveals numerous residues essential for production of infectious virus. //J. Virol. - 2007. №81(19): P. 10220-10231.

174. Nadaud S., Bonnardeaux A., Lathrop M., Soubrier F. Genestructure polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene // Biochem Biophys Res Commun. 1994. V.198. P.1027–1033.

175. Nakagawa S. et al. Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice.// Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2007. №353(4): P. 882-888.

176. Nattermann J. et al. Effect of the interleukin-6 C174G gene polymorphism on treatment of acute and chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus coinfecting patients. //Hepatology. - 2007. №46(4): P. 1016-1025.

177. Negoro K., Kinouchi Y., Hiwatashi N. et al. Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 50-flanking region of the tumor necrosis factor gene // Gastroenterology.1999. V. 117. P.1062–1068.

178. Nelson D.R., Tu Z., Soldevila Pico C. et al. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect // Hepatology. 2003. V. 38, № 4. P. 859–868.

179. Nelson D.R. et al. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. //Hepatology. - 2003. №38(4): P. 859-868.

180. Nepomnyashchikh G.I. et al. Role of lipid infiltration of hepatocytes in the morphogenesis of chronic hepatitis C. //Bull. Exp. Biol. Med. - 2013. №156(2): P. 281-284.

181. Neuman M.G., Sha K., Esguerra R., Zakhari S., Winkler R.E., Hilzenrat N., Wyse J., Cooper C.L., Seth D., Gorrell M.D., Haber P.S., McCaughan G.W., Leo M.A., Lieber C.S., Voiculescu M., Buzatu E., Ionescu

C., Dudas J., Saile B., Ramadori G. Inflammation and repair in viral hepatitis C // *Dig Dis Sci*. 2008. V.53. №.6. P.1468-1487.

182. Newby D.E., Hayes P.C. Hyperdynamic circulation in liver cirrhosis: not peripheral vasodilatation but splanchnic steal // *QJM: An International Journal of Medicine*. 2002. V. 95. P. 827–830.

183. Ohno T., Mizokami M., Wu R.-R. et al. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. // *J. Clin. Microbiol*. 1997, v. 35 (1), P. 201-207.

184. Okamoto K. et al. Intramembrane proteolysis and endoplasmic reticulum retention of hepatitis C virus core protein. // *J. Virol.* - 2004. №78(12): P. 6370-6380.

185. Okomoto M. et al. Effects of cultural conditions on hexavalent chromium uptake and the cytotoxicity thereof in KB cell culture.// *Nihon Eiseigaku Zasshi.* – 1990/ -№45(5):P.1000-1006.

186. Oleksyk T.K., Thio C.L., Truelove A.L., Goedert J.J., Donfield S.M., Kirk G.D., Thomas D.L., O'Brien S.J., Smith M.W. Single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the IL10 region associated with HCV clearance // *Genes Immun*. 2005. V. 6. P. 347-357.

187. Pascal L., Husa P., Znojil V., Kankona K. 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 // *Hepat. Res.* – 2007. – Vol. 37. – P. 740-747.

188. Perlemuter G. et al. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis.// *Faseb. J.* - 2002. №16(2): P. 185-194.

189. Perz J.F. et al. Case-control study of hepatitis B and hepatitis C in older adults: Do healthcare exposures contribute to burden of new infections?// *Hepatology*. - 2013. №57(3): P. 917-924.
190. Pol S. and M. Corouge. Treatment of hepatitis C: current status and perspectives.// *Rev. Prat.* - 2014. №64(5): P. 605-612.
191. Martin-Sanz P., Hortelano S., Nuria A., Callejas, Goren N., Casado M., Zeini M. and Boscá L.. Nitric Oxide in Liver Inflammation and Regeneration // *Metabolic Brain Disease*.2002. V.17. №.4. P.325-334.
192. Parsons, C.J.; Takashima, M.; Rippe, R.A. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis // *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2007. Suppl. 1. P. 79-84.
193. Pereira F.A., Pinheiro da Silva N.N., Rodart I.F., Carmo T.M., Lemaire D.C., Reis M.G. Association of TGF-beta1 codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection // *J. Med. Virol.* 2008. V. 80. Is. 1. P. 58–64.
194. Perianayagam M. C., Liangos O., Kolyada A. Y., et al. NADPH Oxidase p22phox and catalase gene variants are associated with biomarkers of oxidative stress and adverse outcomes in acute renal failure // *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007. V.18. №.1.P. 255 – 263.
195. Persico M., Capasso M., Persico E., Masarone M., Renzo A., Spano D., Bruno S., Iolascon A. Interleukin-10 - 1082 GG polymorphism influences the occurrence and the clinical characteristics of hepatitis C virus infection // *J. Hepatol.* 2006. V.45. P.779-785.
196. Pestka S., Krause C.D., Sarkar D., Walter M.R., Shi Y., Fisher P.B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors // *Annu. Rev. Immunol.* 2004. V. 22. P. 929-979.
197. Piccioli, D., Tavarini S., Nuti S., Colombatto P., Brunetto M., Bonino F., Ciccorossi P., Zorat F., Pozzato G., Comar C., Abrignani S., Wack A. Comparable functions of plasmacytoid and monocyte-derived dendritic

cells in chronic hepatitis C patients and healthy donors // J. Hepatol. 2005. V.42. P. 61–67.

198. Powell E.E., Edwards-Smith C.J., Hay J.L., Clouston A.D., Crawford D.H., Shorthouse C., Purdie D.M., Jonsson J.R. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C // Hepatology .2000. V.31. P. 828-833.

199. Prince A.M., Huima-Byron T., Parker T.S., Levine D.M. Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins // J. Viral Hepat. 1996. V.3. №1. P.11-17.

200. Pudi R., Ramamurthy S.S., Das S. A. Peptide derived from RNA recognition motif 2 of human Ia protein binds to hepatitis C virus internal ribosome entry site prevents ribosomal assembly and inhibits internal initiation of translation // J. Virol. 2005. V. 79. P. 9842–9853.

201. Quinkert D. R. Bartenschlager and V. Lohmann. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. // J. Virol. - 2005. №79(21): P. 13594-13605.

202. Ramachandran S., Xia G. L., Genova-Raeva L.M., et al. End-point limiting-dilution real-time PCR assay for evaluation for hepatitis C virus quasispecies in serum: performance under optimal and suboptimal conditions // J. Virol Meth. – 2008/ - Vol.151 – P. 217-224.

203. Rauch A., Kutalik Z., Descombes P., Cai T, Di Iulio J., Mueller T., Bochud M., Battegay M., Bernasconi E., Borovicka J., Colombo S., Cerny A., Dufour J.F., Furrer H., Günthard H.F., Heim M., Hirschel B., Malinverni R., Moradpour D., Müllhaupt B., Witteck A., Beckmann J.S., Berg T., Bergmann S., Negro F., Telenti A., Bochud P.Y. Swiss Hepatitis C Cohort Study. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study // Gastroenterology. 2010. V.138. №4. P.1338–1345.

204. Roberts A.P. et al. The P body protein LSM1 contributes to stimulation of hepatitis C virus translation, but not replication, by microRNA-122. //Nucleic Acids Res. - 2014. №42(2): P. 1257-1269.
205. Roingeard P. et al. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. //Biol. Cell. - 2004. №96(2): P. 103-108.
206. Rosen H.R. Clinical practice. Chronic hepatitis C infection // The New England journal of medicine. 2011. V.364. №.25. P.2429–2438.
207. Salmeron J. et al. Quasispecies as predictive response factors for antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C.// Dig. Dis. Sci. - 2006. №51(5): P. 960-967.
208. San J., Fortuno A., Beloqui O., Diez J., Zalba G. NADPH oxidase CYBA polymorphisms, oxidative stress and cardiovascular diseases // Clin Sci (Lond). 2008. V.114. №. P.173 – 182.
209. Sato S. et al. Antibodies generated against hepatitis C virus (HCV) core antigen: IgM and IgA antibody against HCV core. //Nihon Rinsho. - 1995. №53 Suppl.(Pt. 1): P. 253-259.
210. Schachinger V., Britten M. B., Dimmeler S., Zeiher A. M. NADH/NADPH oxidase p22 phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function // Eur. Heart J. 2001. V. 22. №.1. P. 96 – 101.
211. Schiemann U., Glas J., Török P., Simperl C., Martin K., König A., Schmidt F., Schaefer M., Folwaczny C.. Response to combination therapy with interferon alfa-2a and ribavirin in chronic hepatitis C according to a TNF-alpha promoter polymorphism // Digestion. 2003. V.68. №.1. P. 1-4
212. Schulze-Krebs A., Preimel D., Popov Y., Bartenschlager R., Lohmann V., Pinzani M., Schuppan D. Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells // Gastroenterology. 2005. V.129. №.1. P. 246–258.

213. Schultz S.S. and P.A. Lucas. Human stem cells isolated from adult skeletal muscle differentiate into neural phenotypes. //J. Neurosci. Methods. - 2006. №152(1-2): P. 144-155.

214. Seki N., Yamaguchi K., Yamada A., Kamizono S., Sugita S., Taguchi C., Matsuoka M., Matsumoto H., Nishizaka S., Itoh K., Mochizuki M. Polymorphism of the 50-flanking region of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene and susceptibility to human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) uveitis // J. Infect Dis. 1999. V.180. P. 880–883.

215. Shafi M.S. et al. End treatment response with pegylated interferon among chronic hepatitis C non-responders. //J. Coll. Physicians Surg. Pak. - 2011. №21(6): P. 334-337.

216. Shaw M.L. et al. Characterisation of the differences between hepatitis C virus genotype 3 and 1 glycoproteins. //J. Med. Virol. - 2003. №70(3): P. 361-372.

217. Sheppard P., Kindsvogel W., Xu W., Henderson K., Schlutsmeyer S., Whitmore T.E., Kuestner R., Garrigues U., Birks C., Roraback J., Ostrander C., Dong D., Shin J., Presnell S., Fox B., Haldeman B., Cooper E., Taft D., Gilbert T., Grant F.J., Tackett M., Krivan W., McKnight G., Clegg C., Foster D., Klucher K.M. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R // Nat Immunol. 2003. V.4. P.63–68.

218. Shoeb D. et al. Extended duration therapy with pegylated interferon and ribavirin for patients with genotype 3 hepatitis C and advanced fibrosis: Final results from the STEPS trial. //J. Hepatol. - 2014. №60(4): P. 699-705.

219. Sikorska K., Stalke P., Izycka-Swieszewska E. et al. The role of iron overload and HFE gene mutations in the era of pegylated interferon and ribavirin treatment of chronic hepatitis C // Med. Sci. Monit. 2010. V. 16. P. 137-143.

220. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus genome.// Curr. Stud. Hematol. Blood. Transfus. – 1994. № 61: P. 12-35.

221. Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. //J. Hepatol. - 1999. №31 Suppl. 1: P. 54-60.

222. Sinn D.H., Kim Y.J., Lee S.T., Gwak G.Y., Choi M.S., Lee J.H., Koh K.C., Yoo B.C., Paik S.W. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in Asian Patients // J Gastroenterol Hepatol. 2011. V.26. №9. P.1374-1349.

223. Smith D.B. et al. Consensus proposals for classification of the family hepeviridae.// J. Gen. Virol. - 2014.

224. Soza A., Arrese M., Gonzalez R., Alvarez M., Perez R.M., Cortes P., Patillo A., Riquelme A., Riquelme A. Clinical and epidemiological features of 147 Chilean patients with chronic hepatitis C // Ann Hepatol. 2004. V.3. №4. P.146-151.

225. Suppiah V., Gaudieri S., Armstrong N.J., O'Connor K.S., Berg T., Weltman M., Abate M.L., Spengler U., Bassendine M., Dore G.J., Irving W.L., Powell E., Hellard M., Riordan S., Matthews G., Sheridan D., Nattermann J., Smedile A., Müller T., Hammond E., Dunn D., Negro F., Bochud P.Y., Mallal S., Ahlenstiel G., Stewart G.J., George J., Booth D.R.; International Hepatitis C Genetics Consortium (IHCGC). IL28B, HLA-C, and KIR variants additively predict response to therapy in chronic hepatitis C virus infection in a European Cohort: a cross-sectional study // PLoS Med. 2011.

226. Suppiah V., Moldovan M., Ahlenstiel G., Berg T., Weltman M., Abate M.L., Bassendine M., Spengler U., Dore G.J., Powell E., Riordan S., Sheridan D., Smedile A., Fragomeli V., Müller T., Bahlo M., Stewart G.J., Booth D.R., George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis

C interferonalpha and ribavirin therapy // Nat Genet. 2009. V.41. №10. P.1100– 1104.

227. Suzich J.A. et al. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. //J. Virol. - 1993. №67(10): P. 6152-6158.

228. Suzuki T. Morphogenesis of infectious hepatitis C virus particles.// Front. Microbiol. - 2012. №3: P. 38.

229. Tag C.G., Mengsteab S., Hellerbrand C. et al. 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. V. 24. №. 5. P. 173 – 181.

230. Taga T., Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines // Annu Rev Immunol. 1997. V.15. P.797–819.

231. Tai C.L. et al. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). //J. Virol. - 1996. №70(12): P. 8477-8484.

232. Takizawa T. Cytokine mediators in acute inflammation and chronic course of viral hepatitis // Nippon Inzo Pakk. 1993. V. 10. P. 1995-1999.

233. Tallo T. et al. Genetic characterization of hepatitis C virus strains in Estonia: fluctuations in the predominating subtype with time. //J. Med. Virol. - 2007. №79(4): P. 374-382.

234. Tan S.L. et al. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. //Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. - 1999. №96(10): P. 5533-5538.

235. Tanaka Y., Furuta T., Suzuki S., et al. Impact of interleukin-1 beta genetic polymorphisms on the development of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in Japan // J Infect Dis. -2003. V. 18711. - P. 1822-1825.

236. Tanaka Y., Nishida N., Sugiyama M., Kurosaki M., Matsuura K., Sakamoto N., Nakagawa M., Korenaga M., Hino K., Hige S., Ito Y., Mita E., Tanaka E., Mochida S., Murawaki Y., Honda M., Sakai A., Hiasa Y., Nishiguchi S., Koike A., Sakaida I., Imamura M., Ito K., Yano K., Masaki N., Sugauchi F., Izumi N., Tokunaga K., Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferonalpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C // *Nat Genet.* 2009. V.41. №.10. P.1105–1109.

237. Taylor A.W. Review of the activation of TGF-beta in immunity // *J. Leukoc. Biol.* 2009. V. 85, №. 1. P. 29 – 33.

238. Tellinghuisen T.L. and C.M. Rice. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. // *Curr. Opin. Microbiol.* - 2002. №5(4): P. 419-427.

239. Tellinghuisen T.L., J. Marcotrigiano and C.M. Rice. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase.// *Nature/* - 2005. №435(7040): P. 374-379.

240. Thio C.L., Goedert J.J., Mosbrugger T., Vlahov D., Strathdee S.A., O'Brien S.J., Astemborski J., Thomas D.L. An analysis of tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms and haplotypes with natural clearance of hepatitis C virus infection // *Genes Immun.* 2004.V.5. №.4. P.294-300.

241. Thomas D.L., Thio C.L., Martin M.P., Qi Y., Ge D., O'Huigin C. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus // *Nature.* 2009. V.461. P. 798-801.

242. Thompson A.J., Muir A.J., Sulkowski M.S., Ge D., Fellay J., Shianna K.V., Urban T., Afdhal N.H., Jacobson I.M., Esteban R., Poordad F., Lawitz E.J., McCone J., Shiffman M.L., Galler G.W., Lee W.M., Reindollar R., King J.W., Kwo P.Y., Ghalib R.H., Freilich B., Nyberg L.M., Zeuzem S., Poynard T., Vock D.M., Pieper K.S., Patel K., Tillmann H.L., Noviello S., Koury K., Pedicone L.D., Brass C.A., Albrecht J.K., Goldstein D.B.,

McHutchison J.G. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pre-treatment predictor of sustained virologic response in hepatitis C virus // *Gastroenterology*. 2010. V.139. P. 120-129.

243. Trujillo-Murillo K., Perez-Ibave D., Munoz-Mejia C., Cordero-Perez P., Munoz-Espinosa L., Martinez-Rodriguez H., Bosques-Padilla F., Rivas-Estilla A.M. Prevalence of the -308 and -238 tumor necrosis factor alpha (TNF- α) promoter polymorphisms in mexican chronic hepatitis C patients // *Rev Gastroenterol Mex*. 2010. V. 75, №. 1. P. 312-318.

244. Tsukiyama-Kohara K., Iizuka N., Kohara M., Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA // *J. Virol*. 1992. V. 66. P. 1476–1483.

245. Tsutsumi T. et al. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity. // *Hepatology*. - 2002. №35(4): P. 937-946.

246. Van der Poel C.L., Cuypers H.T., Reesink H.W. Hepatitis C virus six years on // *Lancet* 1994. V.344. P.1475-1479.

247. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors // *Annu Rev Immunol*. 1992. V. 10. P. 411–452.

248. Viazov S., Ross S.S., Kyuregyan K.K. et al. Hepatitis C virus are rare even among intravenous drug users // *J. Med. Virol.* – 2010. – Vol. 82. – P. 232-238.

249. Vitturi DA, Patel RP. // *Free Radic Biol Med*. 2011. V.51.№.4. P.805-812.

250. Wallace D.F., Subramaniam V.N. Co-factors in liver disease: the role of HFE-related hereditary hemochromatosis and iron // *Biochim Biophys Acta*. 2009. V.1790. №.7. P. 663-670.

251. Weiner A.J. et al. Sequence variation in hepatitis C viral isolates. // *J. Hepatol.* - 1991. №13 Suppl. 4: P. 6-14.

252. Welsch C. et al. Structural and functional comparison of the non-structural protein 4B in flaviviridae. // J. Mol. Graph. Model. - 2007. №26(2): P. 546-557.
253. Wilson L.E., Torbenson M., Astemborski J., Faruki H., Spoler C., Rai R., Mehta S., Kirk G.D., Nelson K., Afdhal N., Thomas D.L. Progression of liver fibrosis among injection drug users with chronic hepatitis C // Hepatology. 2006. V.43. №4. P. 788–795.
254. World Health Organization "Hepatitis C factsheet". 2011.
255. Yamaga A.K. and J.H. Ou. Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. //J. Biol. Chem. - 2002. №277(36): P. 33228-33234.
256. Yamanaka T. et al. Hepatic angiosarcoma mimicking cavernous hemangioma on angiography. //Hepatogastroenterology/ - 2002. №49(47): P. 1425-1427.
257. Yee L.J., Tang J., Gibson A.W., Kimberly R., Van Leeuwen D.J., Kaslow R.A. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection // Hepatology. 2001. V.33. P.708–712.
258. Yee L.J., Tang J., Herrera J., Kaslow R.A., van Leeuwen D.J. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection // Genes Immun. 2000. V. 1. P. 386–390.
259. Yi M., Lemon S.M. 3' Nontranslated RNA Signals Required for Replication of Hepatitis C Virus RNA // J. Virol. 2003. V. 77. P. 3557-3568.
260. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese // Hum Genet. 1998. V.103. P.65–69.

261. Yu M.L., Chuang W.L. Treatment of chronic hepatitis C in Asia: when East meets West // J. Gastroenterol Hepatol. 2009. V.24. №3. P.336-345.
262. Yu S. et al. Response to therapy with pegylated interferon and ribavirin for chronic hepatitis C in hispanics compared to non-Hispanic whites. //Am. J. Gastroenterol. - 2009. №104(7): P. 1686-1692.
263. Yu Y. et al. A clinical trial of oxymatrine in treating chronic viral hepatitis type B.// Zhonghua Nei. Ke. Za. Zhi. - 2001. №40(12): P. 843-846.
264. Yu Y., Chao L., R. F., Sheng B. The TNF- α , IL-1B and IL-10 polymorphisms and risk for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2011. V. 137, №. 6. P. 947-952.
265. Yuki N., Hayashi N., Ohkawa K., Hagiwara H., Oshita M., Katayama K., Sasaki Y., Kasahara A., Fusamoto H., Kamada T. The significance of immunoglobulin M antibody response to hepatitis C virus core protein in patients with chronic hepatitis C // Hepatology. 1995. V. 22. P. 402–406.
266. Zein N.N., Germer J.J., El-Zayadi A.R., Vidigal P.G. Ethnic differences in polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in patients with chronic hepatitis C virus infection // Am J Trop Med Hyg. 2004. V.70. №4. P.434-437.
267. Zekri A.R., El-Din A.M., Hassan A., El-Din A.H., El-Shehaby A., Abu-Shady M.A. Cytokine profile in Egyptian hepatitis C virus genotype-4 in relation to liver disease progression // World J. Gastroenterol. 2005. V. 11. P.6624–6630.
268. Zhao W. et al. Expression and self-assembly of HCV structural proteins into virus-like particles and their immunogenicity. //Chin. Med. J. (Engl). - 2004. №117(8): P. 1217-1222.

267. Zylberberg H., Rimaniol A., Pol S., Masson A, De Groote D, Berthelot P, Bach JF, Bréchet C, Zavala F. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity // J. Hepatol. 1999. № 2. P. 185