

Анализ совместного влияния полиморфизмов генов системы интерферона *OAS1*, *OAS3*, *PKR*, *IFNA17* и *IFNG* на предрасположенность к хроническому вирусному гепатиту С

Бычков В.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В.

Analysis of the combined effect of polymorphisms interferon genes *OAS1*, *OAS3*, *PKR*, *IFNA17* and *IFNG* in susceptibility to chronic viral hepatitis C

Bychkov V.A., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Бычков В.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В.

Система интерферона играет ключевую роль в реализации противовирусного ответа. Известно, что наиболее опасным для возникновения инфекционных болезней является сочетание рискованных аллелей нескольких генов.

Работа посвящена анализу совместного влияния однонуклеотидных полиморфизмов генов системы интерферона *OAS1*, *OAS3*, *PKR*, *IFNA17* и *IFNG* на предрасположенность к хроническому вирусному гепатиту С. Показано, что учет нескольких рискованных генов улучшает прогнозирование развития данного заболевания.

Ключевые слова: интерферон, однонуклеотидные полиморфизмы, хронический вирусный гепатит С, прогнозные модели.

Interferon system plays a key role in the antiviral response. Based on data from the literature, the most dangerous for the development of infectious diseases is the combination of risk alleles of several genes. This study focuses on the analysis of the combined effect of single nucleotide polymorphisms of interferon system genes *OAS1*, *OAS3*, *PKR*, *IFNA17* and *IFNG* in the predisposition to chronic viral hepatitis C. It has been shown that the accounting of several risk genes improves the prediction of development of this disease.

Key words: interferon, single-nucleotide polymorphisms, chronic viral hepatitis C, predictive models.

УДК 616.36-002.2-092:575.174.015.3:578.245.4

Введение

Вирусный гепатит С является важной медико-социальной проблемой в связи с широким распространением среди трудоспособного населения, прогрессирующим течением, частым переходом заболевания в хроническую форму, низкой эффективностью противовирусной терапии и развитием тяжелых осложнений (цирроз печени, гепатоцеллюлярная карцинома) [3].

Одну из ключевых ролей в регуляции противовирусного иммунного ответа играет система интерферона, в состав которой помимо самих интерферонов входят продукты индуцируемых ими генов. Синтез интерферониндуцируемых белков (2',5'-олигоденилатсинтетаза, РНКазы L, протеинкиназа R,

аденозиндезаминаза и др.) запускает каскад реакций, приводящих к нарушению сборки вирусных частиц посредством разрушения вирусной РНК и ингибированию трансляции в зараженной клетке [9].

Установлено, что развитие инфекционного процесса определяется как свойствами возбудителя, так и индивидуальными особенностями организма хозяина, являющимися отражением его генетической структуры [6]. Несмотря на то что показана ассоциация HCV-инфекции с полиморфизмами более 50 генов, к числу которых относят гены *HLA*, гены метаболизма [7, 8, 13], гены противоинфекционного иммунитета [5, 10, 11], до сих пор не разработана система индивидуального прогнозирования характера течения и вероятности развития осложнений при хроническом вирусном гепатите С.

В настоящее время усилия исследователей сосредоточены на оценке совместного влияния генов на восприимчивость или предрасположенность организма человека к развитию мультифакторных заболеваний, к числу которых относятся хронические инфекционные заболевания. Так, было показано, что комбинированный эффект однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) существенно увеличивает риск развития и прогрессирования фиброза печени при хронической HCV-инфекции [11].

Проведенный ранее анализ ассоциации генов системы интерферона *OAS1*, *OAS3*, *PKR*, *IFNA17* и *IFNG* с HCV-инфекцией показал, что по отдельности полиморфизмы указанных генов могут служить ДНК-маркерами предрасположенности к хроническому течению вирусного гепатита С [2]. Однако индивидуально генетические полиморфизмы являются слабым фактором риска развития заболевания и не могут быть использованы в качестве прогностической модели прогнозирования развития мультифакторных заболеваний [1].

В этой связи проведено пилотное исследование, направленное на оценку совместного влияния полиморфизмов генов системы интерферона: -1A/G гена *OAS1*, +1314C/T гена *OAS3*, +244A/G гена *PKR*, +551T/G гена *IFNA17* и +874A/T гена *IFNG* на предрасположенность к развитию хронического вирусного гепатита С.

Материал и методы

Обследованы 98 пациентов с диагнозом «хронический вирусный гепатит С» и 171 здоровый донор, проживающие на территории Томской области и сопоставимые по возрасту и национальной принадлежности (все — русские, в возрасте от 18 до 56 лет). Диагноз был основан на результатах клинико-эпидемиологического анализа, сцинтиграфического и ультразвукового исследования печени, морфологического исследования биоптата печени, серологического и генетического методов оценки.

Материалом исследования служила венозная кровь. Геномную ДНК выделяли с помощью фенол-хлороформной экстракции [4]. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК тестировали спектрофотометрически. Для исследования полиморфных вариантов в генах использовали методику полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей обработкой специфическими рестриктазами и определением полиморфизма

длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Были исследованы полиморфные варианты -1A/G гена *OAS1* (rs10774671), +1314C/T гена *OAS3* (rs2285932), +244A/G гена *PKR* (rs2287350), +551T/G гена *IFNA17* (rs9298814) и +874A/T гена *IFNG* (rs2430561).

Фрагмент гена *OAS1* анализировали с помощью аллель-специфической ПЦР с использованием трех праймеров: общего (5'-cactggagcccttcccc-3') и двух аллель-специфических (аллель А — 5'-atcatgtgtctacccttcca-3' и аллель G — 5'-gatcatgtgtctacccttctg-3'). Реакцию с каждой парой праймеров проводили отдельно, ПЦР-продукт образовывался только в случае комплементарного соответствия 3'-концов праймеров к ДНК исследуемых аллелей. Смесь для амплификации объемом 10 мкл содержала: трис-НСI концентрацией 67 ммоль (рН 8,8), β-меркаптоэтанол концентрацией 10 ммоль, 0,01% Tween-20, 0,5 мкг тотальной ДНК, по 0,7 ммоль каждого из соответствующих праймеров, 0,2 ммоль каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP), 2,5 ммоль MgCl₂, 4%-й глицерин и 0,6 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы («Сибэнзим», г. Новосибирск). Режим амплификации: денатурация при температуре 95 °С (3 мин), затем 29 циклов, включающих денатурацию при 95 °С (42 с), отжиг при 63 °С (42 с) и элонгацию при 72 °С (48 с). Гомозиготные (А/А и G/G) или гетерозиготный (А/G) генотипы для данного образца определяли по наличию или отсутствию на дорожке 3%-го агарозного геля продукта амплификации размером 221 п.н. (для аллеля А) или 222 п.н. (для аллеля G). Генотип А/А определяли по наличию ПЦР-продукта с праймером, который соответствует аллелю А, и по отсутствию ПЦР-продукта с праймером, соответствующим аллелю G. Аналогично определяли генотип G/G. Гетерозиготы А/G идентифицировали при наличии продукта амплификации на обеих дорожках геля.

Для амплификации фрагмента гена *OAS3* (421 п.н.) использовали следующие праймеры: 5'-tggatgctcagggttggcc-3' и 5'-ccaacctcagctccattgctgta-3'. Смесь для амплификации объемом 25 мкл содержала: трис-НСI концентрацией 75 ммоль (рН 8,8), (NH₄)₂SO₄ концентрацией 20 ммоль, 0,01% Tween-20, 0,5 мкг тотальной ДНК, по 0,5 мкмоль каждого из праймеров, 0,2 ммоль каждого из dNTP, 2,5 ммоль MgCl₂ и 0,6 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы («Сибэнзим», г. Новосибирск). ПЦР проводили в следующем режиме: денатурация при температуре 95 °С (3 мин), затем 32 цикла,

включающих денатурацию при 95 °С (1 мин), отжиг при температуре 63 °С (1 мин) и элонгацию при 72 °С (1 мин). К ПЦР-продукту добавляли 3—5 ед. акт. рестриктазы Taq I («Сибэнзим», г. Новосибирск) и инкубировали 12 ч при температуре 65 °С. После разделения продуктов рестрикции в 3%-м агарозном геле в случае гомозиготного генотипа С/С на дорожке определялись 2 фрагмента размером 271 и 98 п.н. (фрагмент размером 52 п.н., образующийся из-за наличия второго сайта узнавания рестриктазой Taq I, элюировался из геля), гомозиготного генотипа Т/Т — фрагмент размером 369 п.н., гетерозиготного генотипа С/Т — 3 фрагмента (369, 271 и 98 п.н.).

Для амплификации фрагмента гена *PKR* (255 п.н.) использовали праймеры 5'-ttaattgctgaagccatggaac-3' и 5'-gacaatacctggacaagaagagctc-3'. Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала трис-НСl концентрацией 75 ммоль (рН 8,8), (NH₄)₂SO₄ концентрацией 20 ммоль, 0,01% Tween-20, 0,5 мкг тотальной ДНК, 0,5 мкмоль каждого из праймеров, 0,2 ммоль каждого из dNTP, 1,5 ммоль MgCl₂ и 0,6 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы («Сибэнзим», г. Новосибирск). Реакция проводилась при следующих условиях: денатурация при температуре 95 °С 3 мин, 32 цикла амплификации (95 °С — 48 с, 64 °С — 48 с и 72 °С — 48 с) с последующей 10-минутной элонгацией при температуре 72 °С. После этого ПЦР-продукт инкубировали с 4 ед. акт. рестриктазы Bst F5I («Сибэнзим», г. Новосибирск) в течение 12 ч при температуре 65 °С. На дорожках 4%-го ПААГ в случае гомозигот AA выявляли 2 фрагмента размером 177 и 78 п.н., гомозигот GG — фрагмент размером 255 п.н., гетерозиготного генотипа AG — 3 фрагмента (255, 177 и 78 п.н.).

Фрагмент гена *IFNA17* амплифицировали с помощью праймеров: 5'-caatcaggatcattgccatg-3' и 5'gctttgactcccccagg-3'. Смесь для ПЦР (10 мкл) содержала: трис-НСl концентрацией 75 ммоль (рН 8,8), (NH₄)₂SO₄ концентрацией 20 ммоль, 0,01% Tween-20, 0,5 мкг тотальной ДНК, по 0,5 мкмоль каждого из праймеров, 0,2 ммоль каждого из dNTP, 1,5 ммоль MgCl₂ и 0,6 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы («Сибэнзим», г. Новосибирск). ПЦР проводили в следующем режиме: денатурация при температуре 95 °С (5 мин), затем 30 циклов, включающих денатурацию при температуре 94 °С (1 мин), отжиг при 63 °С (1 мин) и элонгацию при 72 °С (1 мин). После амплификации образцы инкубировали с 1 ед. акт. рестриктазы Ssp I

(«Сибэнзим», г. Новосибирск) в течение 12 ч при 65 °С. На дорожках 3%-го агарозного геля в случае гомозигот Т/Т определяли 2 фрагмента размером 201 и 19 п.н., гомозигот G/G — фрагмент размером 220 п.н., гетерозиготного генотипа Т/G — 3 фрагмента (220, 201 и 19 п.н.).

Для амплификации фрагмента гена *IFNG* использовали праймеры: 5'-gctaaagaagattttcaagcta-3' и 5'cttaacaasacaatcaga-3'. Смесь для ПЦР (10 мкл) содержала: трис-НСl концентрацией 75 ммоль (рН 8,8), (NH₄)₂SO₄ концентрацией 20 ммоль, 0,01% Tween-20, 0,5 мкг тотальной ДНК, по 0,5 мкмоль каждого из праймеров, 0,2 ммоль каждого из dNTP, 1,5 ммоль MgCl₂ и 0,6 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы («Сибэнзим», г. Новосибирск). ПЦР проводили в следующем режиме: денатурация при температуре 95 °С (10 мин), затем 35 циклов, включающих денатурацию при 94 °С (1 мин), отжиг при 55 °С (1 мин) и элонгацию при 72 °С (1 мин). После амплификации образцы инкубировали с 4 ед. акт. рестриктазы Bgl II («Сибэнзим», г. Новосибирск) в течение 12 ч при 65 °С. На дорожках 3%-го агарозного геля в случае гомозигот А/А определяли 2 фрагмента размером 201 и 19 п.н., гомозигот Т/Т — фрагмент размером 220 п.н., гетерозиготного генотипа А/Т — 3 фрагмента (220, 201 и 19 п.н.).

Полученные данные обрабатывали с использованием стандартного пакета программ SPSS 11.5. Для сравнения частот аллелей и генотипов между группами больных хроническим вирусным гепатитом С и здоровыми донорами использовали критерий χ^2 Пирсона. Оценку межгенных взаимодействий проводили с помощью Log-регрессионного анализа.

Результаты и обсуждение

В таблице приведены результаты оценки совместного влияния генетических полиморфизмов генов *OAS1*, *OAS3*, *PKR*, *IFNA17* и *IFNG* на предрасположенность к развитию хронического вирусного гепатита С. Анализ показал, что наиболее весомый вклад в развитие заболевания вносит ген *IFNA17* ($\chi^2 = 83,477$; NRS = 33,0%), на втором месте ген *OAS1* ($\chi^2 = 64,565$; NRS = 16,6%), на третьем — ген *PKR* ($\chi^2 = 41,321$; NRS = 13,0%), на четвертом — ген *IFNG* ($\chi^2 = 27,139$; NRS = 13,1%); наименее значимый вклад принадлежит гену *OAS3* ($\chi^2 = 5,064$; NRS = 1,1%). Обнаружено, что комплексное включение в прогнозную модель генов системы интерферона улучшает ее качество и увеличи-

вает число верных прогнозов, описываемых данной моделью, с 72,1 до 88,8%. При этом, по данным оценки с использованием Log-регрессии, было установлено, что включение в модель полиморфизма OAS3 увеличивает вероятность верных прогнозов лишь на 0,3% (таблица).

Анализ вклада изученных полиморфизмов генов системы интерферона в предрасположенность к хроническому вирусному гепатиту С

Шаг	Включенные в модель гены	χ^2	<i>p</i>	-2LL	NRS, %	OPC, %
1	<i>IFNG</i>	27,139	<0,001	325,713	13,1	72,1
2	<i>IFNG</i> + <i>IFNA17</i>	110,616	<0,001	242,236	46,1	81,4
3	<i>IFNG</i> + <i>IFNA17</i> + <i>PKR</i>	151,937	<0,001	200,915	59,1	80,3
4	<i>IFNG</i> + <i>IFNA17</i> + <i>PKR</i> + <i>OAS1</i>	216,502	<0,001	136,350	75,7	88,5
5	<i>IFNG</i> + <i>IFNA17</i> + <i>PKR</i> + <i>OAS1</i> + <i>OAS3</i>	221,566	<0,001	131,286	76,8	88,8

Примечание. χ^2 — критерий сравнения частоты встречаемости гена у больных вирусным гепатитом С и здоровых доноров; *p* — достоверность различий показателей между сравниваемыми группами; -2LL (-2 Log Likelihood) — показатель качества приближения регрессионной модели; NRS (Nagelkerke R Square) — показатель, указывающий на ту часть дисперсии, которую можно объяснить с помощью Log-регрессии; OPC (Overall Percentage Correct) — процент верных прогнозов, описываемых данной моделью.

Хорошо известно, что наиболее опасным для возникновения многих болезней является сочетание неблагоприятных аллелей нескольких генов с аддитивным эффектом [1], поэтому идентификации рисков полиморфизмов придается большое значение. Однако следующим не менее важным этапом является оценка их комплексного действия с целью создания панели молекулярных маркеров прогнозирования и диагностики клинического течения заболевания. В этом аспекте в настоящее время реализуется комплекс молекулярно-генетических исследований, направленных на идентификацию панели специфических генотипов, ассоциированных с хроническим вирусным гепатитом С, а также риском развития осложнений заболевания. К иммуногенетическим маркерам вирусного гепатита С отнесены гены цитокинов (*TNFA*, *IL1B*, *IL4RA*, *IL6*, *IL10*), хемокинов и их рецепторов (*CCR5*, *RANTES*), а

также гены системы интерферона (*OAS1*, *OAS3*, *PKR*, *IFNG*) [7, 10, 12].

Анализ результатов проведенного исследования показал, что наибольшее значение в наличии предрасположенности вносит полиморфизм +551T/G гена *IFNA17*, видимо, потому, что IFN- α является пусковым фактором, ответственным за включение всех последующих внутриклеточных механизмов защиты от вируса. Второе место принадлежит ОНП -1A/G гена *OAS1*, сопряженного с синтезом одного из изоферментов 2',5'-олигоденилатсинтазы — энзима, ответственного за синтез олигоденилатов, которые, в свою очередь, активируют РНКазу L, что приводит к деструкции вирусной РНК. Третье по значимости место у ОНП +244A/G гена *PKR*. Протеинкиназа R фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF2, что препятствует трансляции и позволяет клетке изменить экспрессию генов для эффективной борьбы с внешними изменениями. Четвертое место по значимости у полиморфизма +874A/T гена *IFNG*. Как известно, IFN- γ обладает обширным иммуномодулирующим действием: направляет развитие иммунного ответа по Th1-зависимому пути, усиливает экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости II класса на поверхности клеток, увеличивает активность протеосомы, что способствует презентации вирусных антигенов Th-лимфоцитам, усиливает активность макрофагов, натуральных киллеров, а также стимулирует дифференцировку стволовых кроветворных клеток. Как правило, эффекты IFN- γ проявляются на первых этапах контакта с вирусом. Наименьший вклад в развитие предрасположенности к хроническому вирусному гепатиту С принадлежит полиморфизму +1314C/T гена *OAS3*, ответственного за синтез другого изофермента 2',5'-олигоденилатсинтазы.

Заключение

Таким образом, на примере генов системы интерферона было показано, что комплексное включение генов в прогнозную модель улучшает ее качество и увеличивает вероятность верных прогнозов развития хронического вирусного гепатита С, описываемых данной моделью (с 72,1 до 88,8%). Учитывая важную роль системы интерферона в иммунопатогенезе персистентных вирусных инфекций, дальнейшее изучение молекулярно-генетических механизмов ее функционирования при вирусном гепатите С позволит

идентифицировать новые подходы в предупреждении и коррекции иммунопатологических расстройств и осложнений данного инфекционного социально значимого заболевания.

Исследование выполнено в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (проект «Разработка технологической платформы молекулярной диагностики и лечения социально значимых заболеваний и подготовка на ее основе научно-исследовательских кадров для молекулярной медицины», ГК № 02.740.11.0311; проект «Разработка и внедрение методов долгосрочного прогноза научно-технологического развития в области молекулярной медицины для аналитического обеспечения реализации государственной политики в сфере инновационного развития экономики, ГК № 16.740.11.0360).

Литература

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э. Научные основы предиктивной медицины // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике: сб. науч. трудов / под ред. А.Б. Масленникова. Вып. 4. Новосибирск: Альфа Виста, 2003. 252 с.
2. Бычков В.А., Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий и др. Ассоциация полиморфизмов генов системы интерферона OAS1, OAS3, PKR и хронического вирусного гепатита C // Мед. иммунология. 2011. Т. 13, № 1. С. 93—100.
3. Лобзин Ю.В., Жданов К.В., Волжанин В.М., Гусев Д.А. Вирусный гепатит: клиника, диагностика, лечение. СПб.: ООО «Фолиант», 2003. 192 с.
4. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984. 480 с.
5. Пузырёв В.П. Генетика мультифакториальных заболеваний: между прошлым и будущим // Мед. генетика. 2003. Т. 2, № 12. С. 498—508.

6. Фрейдин М.Б., Гончарова И.А., Рудко А.А. и др. Геномные основы подверженности инфекционным заболеваниям // Молекул. медицина. 2006. Вып. 6. С. 39—46.
7. Abbas Z., Moatter T., Hussainy A. et al. 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.
8. Gehrke S.G., Stremmel W., Mathes I. et al. Hemochromatosis and transferrin receptor gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype // J. Mol. Med. 2003. V. 81, № 12. P. 780—787.
9. Justesen J., Hartmann R., Kjeldgaard N.O. Gene structure and function of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase family // Cell. and Mol. Life Sci. 2000. V. 57, № 11. P. 1593—1612.
10. Knapp S., Yee L.J., Frodsham A.J. et al. Polymorphisms in Interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C Virus Infection: Roles of MxA, OAS-1, and PKR // Gene Immun. 2003. V. 4. P. 411—419.
11. Richardson M.M., Powell E.E., Barrie H.D. et al. A combination of genetic polymorphisms increases the risk of progressive disease in chronic hepatitis C // Journal of Medical Genetics. 2005. V. 42. P. 45—50.
12. Welzel T.M., Morgan T.R., Bonkovsky H.L. et al. Variants in interferon-alpha pathway genes and response to pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C virus infection in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial // Hepatology. 2009. V. 49. P. 1847—1858.
13. Wozniak M. A., Itzhaki R.F., Faragher E.B. et al. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus // Hepatology. 2002. V. 36, № 2. P. 456—463.

Поступила в редакцию 08.02.2011 г.

Утверждена к печати 01.04.2011 г.

Сведения об авторах

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

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

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

Для корреспонденции

Бычков Вячеслав Алексеевич, тел. 8-905-990-6532; e-mail: bva_17@mail.ru