

## ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ИЗОФЕРМЕНТОВ ЦИТОХРОМА P450 НА ТЕЧЕНИЕ HCV-ИНФЕКЦИИ

Каримов Х.Я., Азимова С.Б.

## HCV-ИНФЕКЦИЯНИНГ КЕЧИШИГА ЦИТОХРОМ P450 ИЗОФЕРМЕНТЛАРИНИНГ ГЕНЕТИК ПОЛИМОРФЛИГИНИНГ ТАЪСИРИ

Каримов Х.Я., Азимова С.Б.

## INFLUENCE OF GENETIC POLYMORPHISM OF CYTOCHROME P450 ISOENZYMES ON THE COURSE OF HCV INFECTION

Karimov H.Y., Azimova S.B.

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

**Мақсад:** ўзбек миллатидаги сурункали гепатит С ва жигар циррози билан касалланган беморларда цитохром P450 нинг TNF- $\alpha$ , CTLA-4, CYP2E1, CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, CYP3A4 ва CYP1A2 генларининг полиморфлигини генотип ва алейларининг тақлилини ўтказиш. **Материал ва усуллар:** сурункали гепатит С билан касалланган 107 бемор ва 81 соғлом донорлар текширилди. Ген полиморфизмининг SNP роғраммалаштириш орқали ишлаб чиқарувчиларнинг кўрсатмаларига мувофиқ синов тизимлари ёрдамида стандарт полимераза занжир реакцияси билан амалга оширилган. **Наतिжа:** СВГС нинг нисбатан актив турининг ривожланишида TNF- $\alpha$  генининг ҳам гетерозигот ҳам гомозигот турларини ташувчи аллелей А, CYP2E1 генининг G ва G/G аллелейлари, CYP2C9\*3 полиморф генининг C аллелейи ва A/C генотиплари, CYP3A4 генининг G ва A/G генотипи ва CYP1A2 генининг C аллелейи ва T/C генотипи аҳамиятли ҳисобланади. **Хулоса:** P450 цитохромининг изоферментларининг аллелей ва генотипларини ўрганиш касаллик ривожланишида муҳим омил бўлиб, касаллик патогенези ва кечишини белгилайди. **Калит сўзлар:** сурункали гепатит С, полиморфлик, цитохром P450 изоферментлари.

**Objective:** To analyze the distribution of the frequencies of alleles and genotypes of the polymorphism of the genes TNF- $\alpha$ , CTLA-4, CYP2E1, CYP2C9 \* 2, CYP2C9 \* 3, CYP3A4 and CYP1A2 cytochrome P450 in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis of the Uzbek nationality. **Materials and Methods:** 107 patients with chronic viral hepatitis C (CVHC) and 81 conditionally healthy donor of Uzbek nationality were examined. SNP genotyping of gene polymorphism was performed by standard polymerase chain reaction. **Results:** Genetic factors that play the role in the development of moderately active HCV are A allele of polymorphic variant of TNF- $\alpha$  gene in carriers of both heterozygous and homozygous genotypes; allele G and genotype G/G of polymorphic variant of CYP2E1 gene; allele C and genotype A/C of polymorphic variant of CYP2C9 \* 3 gene; allele G and genotype A/G of polymorphic variant of CYP3A4 gene; allele C and genotype T/C of polymorphic variant of CYP1A2 gene. **Conclusions:** The revealed peculiarities of the prevalence of allele frequencies and the distribution of genotypes of cytochrome P450 isoenzymes studied are the significant factor, determining the pathogenesis of CVHC and the course of disease.

**Key words:** chronic hepatitis C, polymorphism, isoenzymes of cytochrome P450.

Проблемам хронических гепатитов в связи с их широкой распространенностью и развитием тяжелых осложнений. Считается, что около 170 млн человек на планете больны хроническим вирусным гепатитом С, ежегодно регистрируется около 3-4 млн новых случаев [6,8,9]. В настоящее время имеется достаточно данных, позволяющих говорить о роли генетических особенностей организма как в метаболизме лекарственных средств, так и в развитии патологии [1,2]. Однако, к сожалению, механизмы этого явления до конца не раскрыты, что диктует необходимость более глубокого его изучения. Знание генетических основ патологического процесса позволит определить генетические особенности заболевания каждого отдельного пациента. В клинической практике всё большее значение приобретает полиморфизм генов, ответственных за синтез ферментов, катализирующих метаболические процессы, в частности система цитохрома P450 [3,4]. По вкладу в метаболизм лекарств и содержанию изофермента в печени наиболее значимыми явились CYP3A4, CYP2E1, CYP2C9 и CYP1A2.

### Цель исследования

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма 308G>A гена TNF- $\alpha$ , 49A>G гена CTLA-4, 9896C>G гена CYP2E1, 430C>T гена CYP2C9\*2, 1075A>C гена CYP2C9\*3, 392A>G гена CYP3A4 и 164A>C гена CYP1A2 цитохрома P450 у больных хроническим гепатитом С и циррозом печени.

### Материал и методы

Основную группу составили 107 больных хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС), в контрольную груп-

пу включен 81 условно здоровый донор. С учётом степени активности заболевания больные основной группы была разделены на подгруппы: 1-я – 33 пациента с ХВГС умеренной активности, 2-я – 37 лиц с диагнозом ХВГС высокой активности, 3-я – 37 больных циррозом печени. В основную группу были включены лица узбекской национальности, с верифицированным диагнозом хронического гепатита С и цирроза печени. В качестве группы сравнения использовался популяционный контроль, который был представлен образцами ДНК 81 условно-здорового донора (без ХГС) из банка ДНК НИИ гематологии и переливания крови МЗ РУз.

Молекулярно-генетические исследования выполняли на базе отдела молекулярной медицины и клеточных технологий НИИ гематологии и переливания крови МЗ РУз (руководитель – заслуженный деятель науки РУз, профессор Каримов Х.Я.). Выделение ДНК из ядер лимфоцитов проводили в соответствии с методикой J. Sambrook и соавт., с некоторыми модификациями. SNP-генотипирование полиморфизма генов осуществляли путем стандартной полимеразной цепной реакции на программируемых термоциклерах Corbett Research (Австралия) и Applied Biosystems (США, с использованием тест-систем согласно инструкциям производителя).

### Результаты и обсуждение

Анализ распределения частот аллелей полиморфизма гена CYP2E1 цитохрома P450 при сравнительном исследовании группы больных ХВГС и контрольной группы выявил, что мутантный аллель G встречался в основной группе статистически значимо чаще, чем среди услов-

но здоровых доноров (15,4% против 6,8%;  $\chi^2=6.6$ ;  $P=0.01$ ;  $OR=2.503$ ; 95%CI 1.22-5.12). Полученные нами данные позволяют предположить наличие ассоциации между мутантным аллелем полиморфизма гена CYP2E1 и развитием ХВГС. В подгруппах больных с умеренно активным течением (16,7%) и высоко активным течением (18,9%) ХВГС также зафиксирована достоверно более высокая частота мутантного аллеля G по сравнению с таковой в контрольной группе. Наиболее низкой частота мутантного аллеля была среди больных циррозом печени, однако разница с контрольной группой имела статистически подтвержденную значимость ( $\chi^2=1.1$ ;  $P=0.3$ ;  $OR=1.7$ ; 95%CI 0.64, 4.326).

Согласно данным литературы, ранние стадии хронического вирусного гепатита С ассоциируются с индукцией CYP2E1 в меньшей степени, чем стадии прогрессирования заболевания [5,7]. Однако проведенное нами исследование показало, что наличие варианта CYP2E1, определяемого аллелем G и повышающего уровень продукции фермента CYP2E1, для ранних стадий ХВГС характерно в большей степени, чем для цирроза печени. Повышение экспрессии CYP2E1 обуславливает высокую скорость метаболизма токсинов и ксенобиотиков и, следовательно, повышенное образование продуктов ПОЛ, оказывающих повреждающее действие на гепатоциты, участвующие в патогенезе фиброза и дальнейшем развитии необратимой патологии печени. Таким образом, полученные нами результаты указывают на наличие связи между экспрессией CYP2E1 и прогрессией заболевания.

При исследовании частоты аллелей полиморфизма CYP2C9\*2 было выявлено, что как в группах больных, так и в группе популяционного контроля преобладающим был аллель дикого типа. При этом у больных ХВГС частота встречаемости «дикого» аллеля (С) полиморфизма CYP2C9\*2 составила 86,9%, а мутантного аллеля (Т) – 13,1%. Выявленные значения частоты аллелей в общей группе больных практически не отличались от показателей в исследуемой нами популяции. Некоторые отличия показателей наблюдались при изучении выборок больных в соответствии со стадией и активностью патологического процесса. Аналогичные значения показателя частоты мутантного аллеля отмечалось в контрольной группе и в подгруппе больных циррозом печени (12,2%;  $\chi^2=0,002$ ;  $P=0,97$ ;  $OR=1,02$ ; 95%CI -0,4393-2,35). Вместе с тем имело место повышение частоты встречаемости аллеля Т в подгруппе больных умеренно активным ХВГС (19,7%;  $\chi^2=2,05$ ;  $P=0,15$ ;  $OR=0,57$ ; 95%CI -0,2669-1,235), а наиболее низкий показатель частоты мутантного аллеля наблюдался у пациентов 2-й группы. Повышенная частота аллеля Т в группе больных умеренно активным ХВГС свидетельствует о его возможной ассоциации с малоактивным течением заболевания. Это предположение доказывается и сниженной частотой мутантного аллеля в подгруппе больных высокоактивным ХВГС, что позволяет говорить о протективной роли данного аллеля в отношении активизации воспалительного процесса при ХВГС. Таким образом, проследивается отчетливая связь между накоплением мутантного аллеля с более благоприятным течением ХВГС.

Изучение частоты встречаемости аллелей полиморфизма гена CYP2C9\*3 показало, что как в группе популяционного контроля, так и в подгруппах больных преобладал аллель дикого типа (С): в 1-й подгруппе – в 86,4% случаев, во 2-й – в 94,6%, в 3-й – в 89,2%. При этом показатели были близки по значению ( $p>0,05$ ). Так, в контроле частота встречаемости «дикого» аллеля изучаемого полиморфизма составила 93,8%, среди у больных ХВГС – 90,2%. Сравнительный анализ показал, что в основной группе больных ХВГС мутантный аллель С гена CYP2C9\*3 встречался чаще (9,8%), чем в группе популяционного

контроля (6,2%), однако разница оказалась недостоверной ( $\chi^2=1,61$ ;  $P=0,20$ ;  $OR=0,60$ ; 95%CI -0,2765-1,322). При анализе показателя частоты мутантного аллеля в соответствии со стадией заболевания и активностью патологического процесса обнаружен некоторый разброс значений. Наибольшая частота аллеля С регистрировалась у больных с умеренно активным ХВГС (13,6%). Этот показатель в группе больных циррозом печени было ниже, чем в 1-й подгруппе, а минимальная частота мутантного аллеля имела место в группе больных с активно протекающим ХВГС [5,4]. Повышенная частота аллеля С полиморфизма гена CYP2C9\*3 в группе больных умеренно активным ХВГС свидетельствует о его возможной ассоциации с малоактивным течением заболевания. Это предположение подтверждается и сниженной частотой мутантного аллеля в подгруппе больных высокоактивным ХВГС, что может говорить о протективной роли данного аллеля в отношении активизации воспалительного процесса при ХВГС. Таким образом, проследивается отчетливая связь между накоплением мутантного аллеля полиморфизма 1075A>С гена CYP2C9 с более благоприятным течением ХВГС.

Сравнительный анализ распространенности частот аллелей и распределения генотипов гена CYP3A4 в группах больных ХВГС и популяционного контроля выявил следующие особенности данного полиморфного сайта. Мутантный аллель G встречался среди пациентов с ХВГС основной группы встречался в 2,4 раза чаще, чем в группе популяционного контроля (соответственно у 6,1 и 2,5%). В группе больных ХВГС наблюдалось увеличение частоты не только аллеля G, но и гетерозиготного генотипа A/G (12,1% против 4,9% в контроле;  $\chi^2=2,91$ ;  $P=0,09$ ;  $OR=0,37$ ; 95%CI -0,1177-1,199). Тем не менее, несмотря на тенденцию к накоплению мутантного аллеля в группе больных, отсутствие достоверной разницы между этим показателем в указанных группах не позволяет предполагать участие полиморфизма гена CYP3A4 в развитии ХВГС. В изученных подгруппах больных ХВГС наибольшая частота встречаемости мутантного аллеля G имела место у пациентов с умеренно активным ХВГС (9,1%). При дальнейшей активизации процесса наблюдалось уменьшение частоты аллеля G.

Сравнительный анализ распространенности частот аллелей и распределения генотипов полиморфизма гена CYP1A2 выявил, что мутантный аллель С встречался в основной группе больных ХВГС в 2,3 раза чаще, чем в контрольной группе (14,0% против 6,2%), что позволяет предполагать связь мутантного аллеля полиморфизма гена CYP1A2 с развитием ХВГС. Частота встречаемости мутантного аллеля С была выше контрольного показателя и во всех подгруппах больных ХВГС. При этом максимальное значение этого показателя регистрировалось у больных циррозом печени (16,2%;  $\chi^2=6,062$ ;  $P=0,014$ ;  $OR=0,34$ ; 95%CI – 0,1396-0,8274). В группе больных с умеренно активным процессом частота мутантного аллеля С также характеризовалась высоким показателем (15,2%;  $\chi^2=4,724$ ;  $P=0,03$ ;  $OR=0,37$ ; 95%CI – 0,1456-0,9323). У больных высокоактивным ХВГС частота аллеля С составила 9,5% без достоверной разницы с показателями 1-й и 3-й подгрупп.

Связь между накоплением определенных аллелей и генотипов у больных с неблагоприятным течением ХВГС указывает на то, что данные генетические варианты полиморфизма могут являться маркерами прогрессирования ХВГС и развития тяжелого поражения печени. С другой стороны, генетические варианты полиморфизмов, обнаруживаемые с наибольшей частотой среди больных с более благоприятным течением заболевания, могут служить маркерами слабой степени поражения печени. Варианты изученных полиморфизмов, ассоциированные

со слабой степенью поражения печени, были оценены нами как генетические маркеры, имеющие протективное значение в отношении утяжеления течения ХВГС и развития цирроза печени.

#### Выводы

1. Генетическими факторами, играющими роль в развитии умеренно активного ХВГС, являются аллель А полиморфного варианта гена TNF- $\alpha$  – у носителей как гетерозиготного, так и гомозиготного генотипа; аллель G и генотип G/G полиморфного варианта гена CYP2E1; аллель C и генотип A/C полиморфного варианта гена CYP2C9\*3; аллель G и генотип A/G полиморфного варианта гена CYP3A4; аллель C и генотип A/C полиморфного варианта гена CYP1A2.

2. Выявленные особенности распространенности частот аллелей и распределения генотипов изучаемых изоферментов цитохрома P450 является значимым фактором, определяющим патогенез ХВГС и течение заболевания.

#### Литература

1. Биотрансформация лекарственных препаратов; Под ред. акад. РМН, проф. В.Г. Кукеса. – М.: Палея-М, 2001. – 133 с.
2. Каримов Х.Я. и др. Индивидуальные свойства организма от конституциологии до генетического полиморфизма. – Ташкент: Фан, 2014. – 156 с.
3. Кукес В.Г. Клиническая фармакология. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 964 с.
4. Лисица А. В. База знаний о цитохроме P-450: разработка и применение: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2007. – 44 с.
5. Осечкина Н.С., Назаров Г.В., Бонитенко Е.Ю. и др. Генетические особенности, определяющие различие эффектов воздействия этанола на организм (обзор) // www.Medline.Ru. – 2013. – Т. 14 (токсикология)..
6. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium // J. Virol. Hepat. – 1999. – №6. – P. 35-47.
7. Haufroid V, Ligoocka D, Buyschaert M. Cytochrome P4502E1 (CYP2E1)

expression in peripheral blood lymphocytes: evaluation in hepatitis C diabetes // Europ. J. Clin. Pharmacol. – 2003. – Vol. 59, №1. – P. 29-33.

8. Kurbanov F, Tanaka Y, Sugauchi F. Hepatitis C Virus Molecular Epidemiology in Uzbekistan // J. Med. Virol. – 2003. – Vol. 69. – P. 367-375.

9. Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection // Int. J. Med. Sci. – 2006. – №3 (2). – P. 41-46.

#### ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ИЗОФЕРМЕНТОВ ЦИТОХРОМА P450 НА ТЕЧЕНИЕ HCV-ИНФЕКЦИИ

Каримов Х.Я., Азимова С.Б.

**Цель:** анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма генов TNF- $\alpha$ , CTLA-4, CYP2E1, CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, CYP3A4 и CYP1A2 цитохрома P450 у больных хроническим гепатитом C и циррозом печени узбекской национальности. **Материал и методы:** обследованы 107 больных хроническим вирусным гепатитом C (ХВГС) и 81 условно здоровый донор узбекской национальности. SNP-генотипирование полиморфизма генов осуществляли путем стандартной полимеразной цепной реакции. **Результаты:** генетическими факторами, играющими роль в развитии умеренно активного ХВГС, являются аллель А полиморфного варианта гена TNF- $\alpha$  у носителей как гетерозиготного, так и гомозиготного генотипа; аллель G и генотип G/G полиморфного варианта гена CYP2E1; аллель C и генотип A/C полиморфного варианта гена CYP2C9\*3; аллель G и генотип A/G полиморфного варианта гена CYP3A4; аллель C и генотип T/C полиморфного варианта гена CYP1A2. **Выводы:** выявленные особенности распространенности частот аллелей и распределения генотипов изучаемых изоферментов цитохрома P450 являются значимым фактором, определяющим патогенез ХВГС и течение заболевания.

**Ключевые слова:** хронический гепатит C, полиморфизм, изоферменты цитохрома P450.