

ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ rs1 1536889 +3725G/C ГЕНА TLR4 У ПАЦІЄНТІВ З АВТОІМУННИМ ТА ХРОНІЧНИМ ВІРУСНИМ ГЕПАТИТОМ С

А.М. КУЧЕРЕНКО¹, Л.В. МОРОЗ², Т.І. БЕВЗ², В.І. БУЛАВЕНКО², Ю.Г. АНТИПКІН³, В.С. БЕРЕЗЕНКО³, М.Б. ДИБА³, В.М. ПАМПУХА¹, О.В. ГОРОДНА¹, Л.А. ЛІВШИЦЬ¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, 03143 Київ, вул. Заболотного, 150, Україна

² Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, Україна

³ ДУ ІПАГ імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України, Київ, Україна

E-mail: livshits@imbg.org.ua

Toll-like рецептор 4 (кодований геном TLR4) має ряд функцій, включаючи тканинний гомеостаз, регулювання загибелі клітин та виживання шляхом активації сигнальних шляхів, які ведуть до активації регулятора 3 інтерферону (IRF-3) та продукування інтерферону типу I. TLR4 може відігравати вирішальну роль у патогенезі мультифакторних та інфекційних захворювань. Функціональний поліморфізм заміни TLR4 + 3725G/C (rs11536889) призводить до пришвидшеної деградації транскрипту та зменшення кількості рецепторів. В роботі аналізували розподіл генотипів та алелів TLR4 rs11536889 серед здорових добровольців з України (n = 155), дітей (n = 56) з автоімунним гепатитом (АГ) та дорослих пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С (ХВГС) з різними ступенями тяжкості фіброзу печінки (n = 78). Генотипування проводили з використанням алель-специфічної ПЛР. Отримані частоти генотипів в українській популяції: генотип GG – 0,813, GC – 0,168, CC – 0,019 не виявили суттєвих відхилень від очікуваних, відповідно до рівноваги Харді-Вайнберга. Пацієнти АГ та ХВГС були розподілені на дві групи – зі стадією F1-F2, та F3-F4, відповідно до оцінки фіброзу за шкалою METAVIR. Частота носіїв алеля rs11536889 С була вищою у групі хворих на АГ з F3-F4 (0,179) у порівнянні з пацієнтами з F1-F2 (0,071). Ці відмінності не сягають порога достовірності, проте показали тенденцію до асоціації між носійством С алеля та розвитком фіброзу більш тяжкого ступеня. В свою чергу, у хворих на ХВГС з фіброзом більш тяжкого ступеню (0,400), у порівнянні з пацієнтами з менш тяжким ураженням печінки (0,057) спостерігалась достовірно вища (p < 0,05) частота носіїв алеля С. Ризик тяжкого ураження печінки у пацієнтів з таким генотипом збільшується в 11 разів (OR = 11,11, 95 % ДІ: 2,70–45,66). Таким чином, алель С TLR4 rs11536889 асоційований з більш високим ступенем фіброзного ураження печінки у пацієнтів з хронічним гепатитом.

Ключові слова: автоімунний гепатит, вірусний гепатит С, фіброз печінки, мононуклеотидний поліморфізм, Toll-like рецептор TLR4.

Вступ. Проблема хронічних дифузних захворювань печінки сьогодні є надзвичайно актуальною в зв'язку з неухильним ростом захворюваності на хронічні гепатити (ХГ), які в результаті прогресивного патологічного процесу в печінці можуть призводити до розвитку тяжких ускладнень з високою летальністю – цирозу печінки (ЦП) та гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК). Лідерство в дифузних захворюваннях печінки у дорослих належить вірусному гепатиту С яким на сьогодні інфіковано близько 2 % населення Землі, в Україні за оцінками ВООЗ показник розповсюдженості вірусного гепатиту С складає від 3 до 5 % (World Health Organization. Global hepatitis report, 2017). Поширеність автоімунного гепатиту є невисокою в світі і становить від 0,1 до 1,9 на 100000 на рік, однак швидко прогресуючий перебіг з формуванням цирозу печінки обумовлює актуальність цієї проблеми.

Прогресуючий перебіг та недостатня ефективність етіопатогенної терапії ХГ зумовлює більш поглиблене вивчення патогенетичних механізмів їх розвитку та прогресування, пошуку факторів які впливають на перебіг та ефективність терапії.

З метою пошуку патогенетичних чинників розвитку фіброзу та визначення генетичних маркерів, асоційованих з індивідуальними особливостями перебігу цього процесу, було проведено широкомасштабні дослідження з використанням стратегії GWAS в групі випадок-контроль (Genome-Wide Associations Study), за результатами яких було встановлено статистично достовірну асоціацію поліморфного ва-

© КУЧЕРЕНКО А.М., МОРОЗ Л.В., БЕВЗ Т.І., БУЛАВЕНКО В.І., АНТИПКІН Ю.Г., БЕРЕЗЕНКО В.С., ДИБА М.Б., ПАМПУХА В.М., ГОРОДНА О.В., ЛІВШИЦЬ Л.А., 2019

ріанту +3725G/C (rs11536889) гена *TLR4* [1, 2]. Також у ряді досліджень було показано, що даний поліморфний варіант гена *TLR4* асоційований з ризиком розвитку та ступенем прогресування низки патологічних станів [3–6].

Ген *TLR4* кодує білок, який належить до родини Toll-подібних рецепторів (TLR – Toll-like receptors). Toll-подібні рецептори являють собою трансмембранні білки, які відіграють ключову роль у прояві раннього вродженого імунітету. Вони розпізнають широкий спектр молекулярних структур, пов'язаних з патогенами, таких як бактеріальний ліпополісахарид, вірусні білки, нуклеїнові кислоти та ендогенні структури, що пов'язані з пошкодженням (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLR4>).

TLR4 функціонально залучений в такі процеси як підтримання гомеостазу тканин, регуляцію клітинної загибелі та активацію сигнальних шляхів, які, в свою чергу, індують продукцію інтерферонів. Функціональний поліморфізм гена *TLR4*, заміна +3725G/C (rs11536889), впливає на стабільність мРНК, рівень експресії і сигналінг, індукований ліпополісахаридами та іншими лігандами, а також призводить до зменшення кількості рецепторів [7]. Таким чином, поліморфізми гена *TLR4* значно впливають на імунну відповідь і характер розвитку інфекційних, алергічних та аутоімунних захворювань [8].

В попередніх дослідженнях було виявлено декілька поліморфних маркерів, які показали суттєву асоціацію з розвитком фіброзу у пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С. Автори наголошували на необхідності проведення подальших досліджень зі з'ясування ролі окремих генетичних маркерів і, зокрема rs11536889 гена *TLR4*, як генетичного чинника ризику розвитку фіброзу печінки у пацієнтів з гепатитом [1, 2]. Метою нашої роботи було дослідження асоціації поліморфізму rs11536889 +3725G/C гена *TLR4* з клінічними проявами фіброзних змін у дорослих хворих на хронічний вірусний гепатит С та дітей з аутоімунним хронічним гепатитом.

Матеріали і методи. *Пацієнти.* Аallelний поліморфізм гена *TLR4* rs11536889(+3725G/C) і розподілення алелей досліджували в популяційній вибірці, яка складалася з 155 осіб –

здорових неспоріднених донорів крові з різних регіонів України. Такий аналіз також проводили в групах пацієнтів: група дітей з аутоімунним гепатитом (АГ) ($n = 56$), та пацієнтів з хронічним гепатитом С (ХВГС) ($n = 78$) з різними стадіями фіброзу печінки, які були надані медичними закладами України: Вінницьким національним медичним університетом ім. М.І. Пирогова, ТОВ «Український лікувально-діагностичний центр» (Київ), а також ДУ «Інститут педіатрії акушерства і гінекології ім. академіка О.М. Лук'янової НАМН України» (Київ).

В Центрі дитячої гепатології ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології ім. академіка О.М. Лук'янової НАМН України» в період з 2016 по 2018 рр. обстежено 56 дітей віком від 1 до 18 років з діагнозом аутоімунний гепатит (АГ).

Діагноз АГ встановлено відповідно до міжнародних рекомендацій з вивчення захворювань печінки (European Association for the Study of Liver (EASL) Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis, 2015). Всім дітям, окрім загальноклінічних досліджень (загальний аналіз крові і сечі, біохімічне дослідження крові, імунологічне дослідження) проведено визначення в сироватці крові аутоантитіл (ANA, Anti-LKM-1, Anti-SMA, anti-LC1). Вірусологічне дослідження, для виключення вірусної природи захворювання проводили з використанням наступних тестів (анти-HAVIgM, HBsAg, анти-HBcIgM, анти-HBcIgG, ПЛР DNA HBV, анти-HCV IgG та ПЛР RNA HCV). Також у всіх дітей були виключені метаболічні захворювання, недостатність альфа-1 антитрипсину та хворобу Вільсона.

Для верифікації діагнозу усім пацієнтам виконано пункційну біопсію печінки із морфологічним та імуногістохімічним дослідженням біоптату печінки (з визначенням в тканині печінки експресії CD138 – кластер диференціації 138: мембранний білок, який використовують в якості імунологічного маркера плазматичних клітин). Дані дослідження проводили з використанням мікроскопу «OLYMPUS BN-2».

Визначення жорсткості печінки (еластометрія) проводилось на сканері «Радмир ULTIMA».

Для інтерпретації отриманих показників та визначення стадії фіброзу використовували шка-

лу METAVIR [9] (для дітей), відповідно до яких стадії фіброзу F0 відповідали значення еластографії нижче 5,8 кПа, стадії фіброзу F1 – мінімальні зміни 5,8–7,2 кПа, стадії фіброзу F2 – помірні прояви 7,2–9,5 кПа, стадії фіброзу F3 – суттєві зміни 9,5–12,5 кПа та стадії фіброзу F4 – від 12,5 кПа (цироз печінки).

Також у дослідження було включено 82 пацієнта з хронічним вірусним гепатитом С (ХВГС) віком від 20 до 65 років, які перебували на диспансерному обліку у Вінницькому гепатологічному центрі.

Діагноз ХГС був виставлений згідно класифікації, наведеної в МКБ-10, та підтверджений виявленням в сироватці крові всіх обстежених хворих сумарних anti-HCV, антитіл до структурних та неструктурних білків HCV: anti-HCVcor, anti-HCVNS3, anti-HCVNS4, anti-HCVNS5, позитивної ПЛР з визначенням наявності якісної та кількісної HCV-RNA, генотипуванням HCV. Клінічно та анамнестично у всіх обстежених були виключені інфекційні захворювання іншої етіології, загострення хронічних запальних процесів, спадкові, психічні захворювання а також зловживання алкоголем та прийом гепатотоксичних ліків.

Визначення сумарних anti-HCV проводилось методом ІФА на тест-системах Roche Diagnostics (Швейцарія), визначення anti-HCVcor, anti-HCVNS3, anti-HCVNS4 та anti-HCVNS5 виконувалось на тест-системах фірми Орженікс (Ізраїль) методом імуноблотінгу.

Для визначення HCV-RNA використовувався метод ПЛР (чутливість методу – >100 МЕ/мл), кількісний варіант ПЛР був проведений для оцінки концентрації HCV-RNA (низьке вірусне навантаження – ≤ 600000 МЕ/мл, високе вірусне навантаження – > 600000 МЕ/мл), зі застосуванням аналізатору та тест-системи, Cobas 6000, Roche Diagnostics (Швейцарія).

Для генотипування HCV-RNA застосовували методи, що базуються на використанні ПЛР з типоспецифічними праймерами для отримання продуктів ампліфікації різної довжини. Дослідження виконувалось на тест-системах Roche Diagnostics (Швейцарія).

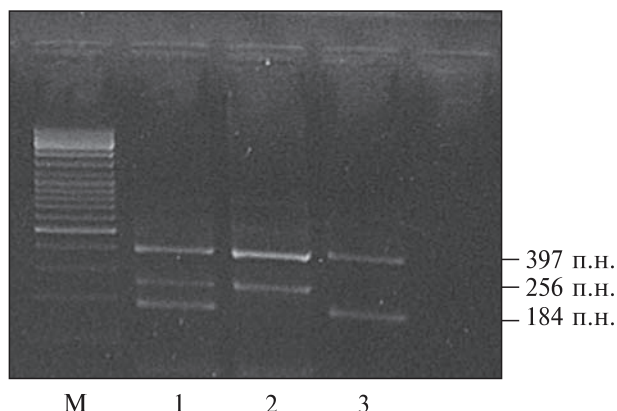
Дослідження проводили в Українському лікувально-діагностичному центрі (м. Київ) та лабораторії «Сінево».

Еластометрію печінки проводили на апараті «FibroScan» (Франція). Показники оцінювалися за шкалою METAVIR [9] відповідно до стадії фіброзу F0 – < 6,2 кПа – фіброз відсутній, F1 – 6,2–8,3 кПа – мінімальні зміни, F2 – 8,3–10,8 кПа – помірні прояви, F3 – 10,8–14 кПа – суттєві зміни, F4 – >14 кПа – цироз печінки.

Участь у дослідженні та відбір крові проводились за умови інформованої згоди пацієнтів. Вводили номенклатуру зразків ДНК, яка мала цифровий код. Порівняльний аналіз генотипів проводився в групах пацієнтів з помірним ураженням печінки (стадії фіброзу F1-F2) та значним ураженням печінки (F3-F4).

Зразки ДНК. ДНК виділяли методом фенол-хлороформної екстракції з використанням протеїнази К [10]. Якість препаратів ДНК визначали за спектральними характеристиками на приборі ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, США). Для аналізу мононуклеотидної заміни rs11536889 +3725G/C гена TLR4 використовували методику алей-специфічної ПЛР і праймери що описані у Hishida et. al., 2009 [11]. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в автоматичному режимі на термоциклері iCycler виробництва «BIO-RAD» (США). Продукти ПЛР фракціонували в 1,5–2%-ному агарозному гелі і фарбували 1%-ним розчином бромістого етидію (інтеркалюючий барвник ДНК). Наявність продуктів візуалізували за допомогою УФ-трансліюмінатора. На ділянці, фланкованій послідовностями гомологічними олігонуклеотидним праймерам F1 та R2, ампліфікується константний продукт довжиною 397 п.н., що слугує позитивним контролем перебігу реакції (рисунок).

У випадку коли ДНК-матриця належала індивіду гомозиготі за алелем дикого типу (GG), в результаті ампліфікації ДНК *in vitro* утворювалися фрагменти довжиною 184 п.н. та константний продукт ПЛР довжиною 397 п.н. У випадку гомозиготі за мутантним алелем (CC), ампліфікувався продукт довжиною 256 п.н. та константний ПЛР продукт 397 п.н. Якщо досліджувана проба містила ДНК матрицю гетерозиготного індивіда (GC), на електрофореграмі спостерігають всі три продукти – 397, 256, 184 п.н.



Електрофореграма алельних варіантів +3725 G/C гена *TLR4*. Розділення продуктів ПЛР за допомогою електрофорезу в 1,6%-ному агарозному гелі. М – маркер молекулярної маси (100 п.н.); 1 – гетерозигота GC; 2 – гомозигота CC; 3 – гомозигота GG

Для розрахунку частот алелів та теоретично очікуваного розподілу генотипів, показників фактичної і теоретичної гетерозиготності, розрахунку показника χ^2 використовували пакет комп'ютерних програм «Генерор»[12].

Для оцінки статистичної достовірності різниці частот генотипів та алельних частот використовували критерій Фішера. У дослідженнях типу «випадок-контроль» з метою оцінки сили асоціації генетичного чинника з патологією (оцінки зв'язку зі стадією фіброзу) розраховували показник відношення шансів (OR) – співвідношення шансів прояву певного стану дихотомічної змінної в двох групах суб'єктів [13, 14].

Для розрахунку відношення шансів обчислювали вірогідність впливу факторів ризику

Таблиця 1. Розподіл генотипів та алелів поліморфізму rs11536889 +3725 G/C гена *TLR4* у здорових індивідів з України

Генотипи та алелі	Кількість	Частота
Генотип GG	126	0,813
Генотип GC	26	0,168
Генотип CC	3	0,019
Алель G	278	0,897
Алель C	32	0,103
Всього	155	

(в даному випадку, поліморфного алеля або певного генотипу) в контрольній та дослідній групах:

Шанс знайти генетичний маркер в дослідній групі

$$= (A(A + B))/(B(A + B)) = A/B;$$

Шанс знайти генетичний маркер в контрольній групі

$$= (C(C + D))/(D(C + D)) = C/D,$$

де А – кількість осіб з генетичним маркером в дослідній групі, В – кількість індивідів без маркера в дослідній групі, С – кількість осіб з генетичним маркером в контрольній групі, D – кількість індивідів без маркера в контрольній групі.

Таким чином показник OR, розраховується за формулою:

$$OR = (A/B)/(C/D) = (A \times D)/(B \times C)$$

Інтерпретацію розрахованого показника проводили наступним чином. Якщо OR = 1, то досліджуваний маркер не впливає на прояв ознаки. OR > 1 означає, що маркер асоційований з підвищеними шансами прояву ознаки, а OR < 1, навпаки – зі зниженими.

З метою оцінки точності OR розраховували 95 % довірчий інтервал (ДІ). Чим більший інтервал, тим менша точність OR. Якщо в довірчий інтервал входила одиниця, показник OR вважали недостовірним. Слід мати на увазі, що саме по собі значення OR не є чутливим до розміру вибірки, однак від розміру вибірки залежить розмір стандартного відхилення та довірчий інтервал [14]. Розрахунок OR проводили з використанням програмного пакету «OpenEpi»[15].

Результати досліджень і їх обговорення. Із використанням описаних методик аналізу алельного поліморфізму rs11536889 +3725G/C гена *TLR4* було проведено молекулярно-генетичний аналіз в популяційній вибірці індивідів з різних регіонів України, яка складалась з 155 осіб. Результати розподілу генотипів та частот алелів в даній групі індивідів наведено у табл. 1.

Необхідно відзначити, що найбільш розповсюдженим генотипом за поліморфізмом гена *TLR4* виявилися гомозиготи GG (частота 0,813), в той час як з найнижчою частотою зустрічалися гомозиготи CC (0,019).

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за досліджуваним поліморфним варіантом в популяційній групі свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга.

За результатами порівняльного аналізу розподілу частот алелів поліморфізму +3725 G/C гена TLR4 із відповідними показниками у світових популяціях, отриманих в рамках проєкту «1000 геномів» з досліджуваною нами популяційною вибіркою з України (табл. 2) можна зробити висновок, що за розподілом алельних варіантів популяція України не відрізнялась від європейської і змішаної американської популяції. В той же час, встановлено статистично достовірні відмінності між популяцією України та азійською, східно-азійською та африканською суперпопуляціями [21-<http://www.internationalgenome.org/>].

З метою встановлення можливої ролі поліморфного варіанта rs11536889 +3725 G/C гена TLR4 в якості генетичного маркера прогнозу розвитку ушкодження печінки різного ступеня при автоімунному гепатиті у дітей нами було проведено аналіз розподілу генотипів у групі пацієнтів ($n = 56$) з діагнозом автоімунний гепатит. Результати розподілу генотипів в даній групі пацієнтів наведено в табл. 3.

За результатами порівняльного аналізу практично не виявлено відмінності в розподілі частот генотипів, проте встановлено, що частота індивідів носіїв алеля С зі значним ураженням печінки становила 0,179 що у 2,5 рази перевищувала частоту індивідів з таким генотипом в

групі пацієнтів з помірним ураженням печінки (0,071). Необхідно зазначити, що данні відмінності не досягли порогу достовірності, що може бути зумовлено невеликою чисельністю досліджуваної групи.

Важливо відмітити, що індивіди гомозиготи за алелем С (CC) зустрічалися лише серед пацієнтів зі значним ураженням печінки (0,036) і складала 3,6 % від своєї групи, в той час як в групі з помірним ураженням печінки пацієнти з таким генотипом були відсутні. Виявлені закономірності можуть вказувати на те, що носійство алеля С може бути фактором підвищеного ризику ступеню ураження печінки у пацієнтів з автоімунним гепатитом.

Подальші дослідження були спрямовані на оцінку можливої асоціації носійства алеля С

Таблиця 2. Розподіл алельних варіантів поліморфізму rs11536889 +3725 G/C гена TLR4 в світових популяціях

Популяція	Частота алеля	P *
Україна	0,103	
Європейська суперпопуляція	0,158	0,018
Змішана Американська суперпопуляція	0,117	0,611
Східно Азійська суперпопуляція	0,177	0,002
Суперпопуляція Азії	0,262	<0,0000001
Африканська суперпопуляція	0,010	<0,0000001

Примітка. P* – вірогідність, за результатами розрахунку точного двостороннього критерію Фішера.

Таблиця 3. Розподіл генотипів за поліморфним варіантом rs11536889 +3725 G/C гена TLR4 у пацієнтів з автоімунним гепатитом

Генотип/алель	Контрольна група, $n = 155$	Група з АГ, $n = 56$	Пацієнти з АГ, що різняться за ступенем ураження печінки помірне $n = 28$, значне $n = 28$	
			F1 + F2	F3 + F4
GG	0,813	0,875	0,929	0,821
GC	0,168	0,107	0,071	0,143
CC	0,019	0,018	0,000	0,036
G	0,897	0,929	0,964	0,893
C	0,103	0,071	0,036	0,107
GC + CC	0,187	0,125	0,071	0,179

зі ступенем ураження печінки у пацієнтів з хронічним гепатитом С.

З метою встановлення можливої ролі поліморфного варіанта rs11536889 +3725G/C гена *TLR4* в якості генетичного маркера прогнозу індивідуальних особливостей перебігу хронічного вірусного гепатиту С, було проведено аналіз розподілу генотипів та алельних варіантів за цим локусом в групах пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С, у яких спостерігали різний ступень фіброзного ураження печінки. Отримані дані про розподіл генотипів та алельних варіантів +3725 G/C гена *TLR4* наведені в табл. 4.

За результатами аналізу, було встановлено достовірно вищу частоту носіїв алельного варіанту С rs11536889 +3725G/C гена *TLR4* в групі пацієнтів зі значним ураженням печінки (0,400) порівняно з пацієнтами з помірним ураженням (0,057).

Отримані результати дослідження вказують на зв'язок алеля С з ризиком виникнення фіброзу печінки при вірусному гепатиті С. Індивіди, які є носіями алельного варіанта (С), значно частіше страждають ускладненим протіканням гепатиту, тоді як у гомозигот за алелем G перебіг захворювання відзначається меншими ускладненнями.

Частота носіїв алеля С була статистично вірогідно вищою ($p < 0,05$) rs11536889 спостерігалася у хворих зі значним ступенем фіброзу печінки (0,400) у порівнянні з пацієнтами з менш тяжким ураженням печінки (0,057).

Таблиця 4. Розподіл генотипів за поліморфним варіантом rs11536889 +3725 G/C гена *TLR 4* у пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С з різним ступенем ураження тканин печінки

Генотип/алель	Помірне ураження, частота (n = 53)	Значне ураження, частота (n = 25)
	F1 + F2	F3 + F4
GG	0,943	0,600
GC	0,057	0,320
CC	0,000	0,080
G	0,972	0,760
C	0,028	0,240
GC + CC	0,057	0,400

Важливо зазначити, що ризик значного uszkodження печінки у пацієнтів з гепатитом С (носіїв алелю С) є в 11 разів вищим ніж у пацієнтів з генотипом GG (OR = 11,11; 95 % ДІ: 2,70–45,66).

Початковою ланкою фіброзу є загибель гепатоцитів шляхом апоптозу, некрозу чи некроптозу. Загибель гепатоцитів індукує активацію клітин Купфера (Kupffer cells – KCs) та зірчастих клітин печінки (hepatic stellate cells – HSCs) [16–19]. Низкою досліджень показано, що важливу роль у розвитку та прогресуванні фіброзу печінки відіграють рецептори TLR, зокрема TLR4 [20–23].

Роль TLR4 в прозапальній активації клітин Купфера (макрофаги печінки) достатньо вивчена [24]. Останнім часом отримані нові дані щодо важливої ролі TLR4 в фіброгенезі (активація зірчастих клітин печінки). Зв'язування ліпополісахаридів (ЛПС) з TLR4 приводить до активації запального фенотипу зірчастих клітин печінки [23, 25]. Печінкові зірчасті клітини є основними клітинами, які приймають участь у фіброгенезі в печінці [26–28]. Крім того, активовані зірчасті клітини набувають стійкості до проапоптотичних стимулів [17].

В декількох дослідженнях описано генетичні варіанти, пов'язані з прогресуванням фіброзу печінки. Встановлено, що наявність поліморфізму TLR4 D299G і T399I знижує ризик розвитку фіброзу печінки за рахунок зниження запальної та фіброгенної сигналізації та зниження порогу апоптозу зірчастих клітин печінки [1, 29]. Ці поліморфізми також пов'язані зі сприйнятливістю до інфекційних захворювань і сепсису [30]. Також встановлено, що наявність поліморфізму *TLR4* D299G і T399I сприяє більш важкому перебігу хвороби Крона, хелікобактерної інфекції, раку, невиношуваності вагітності та інші [6, 31].

Висновки. За результатами наших досліджень, можна зробити висновок про те, що поліморфізм +3725G/C гена *TLR4* (rs11536889) є фактором підвищеного ризику більш тяжкого фіброзного пошкодження печінки у пацієнтів з гепатитами різної етіології.

Дотримання етичних стандартів. Всі процедури, виконані в дослідженні за участю людей, відповідають етичним стандартам інститу-

ційного та/або національного комітету по дослідницькій етиці та Гельсінкській декларації 1964 р. і її подальших змін або порівнянними нормам етики. Від кожного з включених в дослідження учасників було отримано інформовану добровільну згоду.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють – конфлікт інтересів відсутній.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансують установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

INVESTIGATION OF RS11536889 + 3725G/C POLYMORPHISM OF THE *TLR4* GENE IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE AND CHRONIC VIRAL HEPATITIS C.

A.M. Kucherenko, L.V. Moroz, T.I. Bevz, V.I. Bulavenko, Y.G. Antypkin, V.S. Berezhenko, M.B. Dyba, V.M. Pampukha, O.V. Gorodna, L.A. Livshits

Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, Kiev, Ukraine

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine

SI «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology named after academic Elena M. Lukyanova of NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

E-mail: livshits@imbg.org.ua

Toll-like receptor 4 (encoded by *TLR4* gene) has a variety of functions, including tissue homeostasis, regulation of cell death and survival via activation of signaling pathways which lead to interferon regulatory factor 3 (IRF-3) activation and type I interferon production. *TLR4* may have a crucial role in pathogenesis of complex and infectious diseases. Functional polymorphism *TLR4*+3725G/C substitution (rs11536889) leads to faster transcript degradation and receptors number decrease. The study investigated *TLR4* rs11536889 genotype and allele distribution in healthy volunteers from Ukraine ($n = 155$), autoimmune hepatitis (AH) children ($n = 56$) and chronic hepatitis C (CHC) adult patients with various fibrosis severity stages ($n = 78$). Genotyping was performed by allele-specific PCR. The obtained genotype frequencies in Ukrainian population were: GG genotype – 0,813; GC – 0,168; CC – 0,019 and showed no significant deviation from the ones expected according to Hardy-Weinberg equilibrium. AH and CHC patients were divided according to METAVIR fibrosis score two groups – with stage F1-F2, and – with F3-F4. The frequency of rs11536889 C allele carriers were higher in the group of AH patients with F3-F4 (0,179) comparing to patients with F1-F2 (0,071). This data did

not reach the threshold for significance but showed a trend toward association between C allele carriers and higher fibrosis degree. Moreover, the significantly ($p < 0,05$) higher frequency of C allele carriers was observed in CHC patients with higher fibrosis degree (0,400) compared to patients with lower degree (0,057). Severe liver damage risk in such individuals is 11-fold increased (OR = 11,11, 95 % CI: 2,70–45,66). Thus, *TLR4* rs11536889 C allele is associated with higher level of fibrotic liver damage in patients with chronic hepatitis.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА RS11536889 +3725G/C ГЕНА *TLR4* У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМ И ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

A.H. Kucherenko, L.V. Moroz, T.I. Bevz, V.I. Bulavenko, Y.G. Antypkin, V.S. Berezhenko, M.B. Dyba, V.H. Pampukha, A.V. Gorodna, L.A. Livshits

Toll-like рецептор 4 (кодируемый геном *TLR4*) имеет ряд функций, включая тканевой гомеостаз, регулирование гибели клеток и выживание путем активации сигнальных путей, которые ведут к активации регулятора 3 интерферона (IRF-3) и продуцирования интерферона тип I. *TLR4* может играть решающую роль в патогенезе мультифакторных и инфекционных заболеваний. Функциональный полиморфизм замены *TLR4* + 3725G/C (rs11536889) ведет к ускорению деградации транскрипта и уменьшению количества рецепторов. В работе анализировали распределение генотипов и аллелей *TLR4* rs11536889 среди здоровых добровольцев с Украины ($n = 155$), детей ($n = 56$) с аутоиммунным гепатитом (АГ) и взрослых пациентов с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) и разной степенью тяжести фиброза печени ($n = 78$). Генотипирование проводили с использованием метода аллель-специфической ПЦР. Полученные частоты генотипов в украинской популяции: генотип GG – 0,813; GC – 0,168; CC – 0,019 не выявили статистически достоверного отклонения от ожидаемых, в соответствии равновесию Харди-Вайнберга. Пациенты АГ и ХВГС были распределены на две группы – со стадией F1-F2, и F3-F4, в соответствии с оценкой фиброза по шкале METAVIR. Частота носителей аллеля rs11536889 C была выше в группе больных АГ с F3-F4 (0,179), в сравнении с пациентами F1-F2 (0,071). Эти различия не достигли порога достоверности, но вместе с тем указывают на тенденцию ассоциации между носительством C аллеля и развитием фиброза большей степени тяжести. В свою очередь, у больных ХВГС с фиброзом более высокой степени тяжести (0,400), в сравнении с пациентами менее тяжелого поражения печени (0,057) на-

блюдалась достоверно более высокая ($p < 0,05$) частота носителей аллеля С. Риск тяжелого поражения печени у пациентов с таким генотипом увеличивается в 11 раз ($OR = 11,11$, 95 % ДІ: 2,70–45,66). Таким образом, аллель С *TLR4* rs11536889 ассоциирован с более высокой степенью фиброзного поражения печени у пациентов с хронической формой гепатита.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Huang, H., Shiffman, M.L., Friedman, S., Venkatesh, R., Bzowej, N., Abar, O.T., et al. A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2007, vol. 46, no. 2, pp. 297–306. doi: 10.1002/hep.21695.
- Li, Yonghong, Monica, Chang, Olivia, Abar, Veronica, Garcia, Charles, Rowland, Joseph, Catanese, David, Ross, Samuel, Broder, Mitchell, Shiffman, Ramsey, Cheung, Teresa, Wright, and Scott, L. Friedman, and John Sninsky. Multiple variants in toll-like receptor 4 gene modulate risk of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *J. Hepatol.*, 2009, vol. 51, no. 4, pp. 750–7. doi:10.1016/j.jhep.2009.04.027.
- Hishida, A., Matsuo, K., Goto, Y., Naito, M., Wakai, K., Tajima, K., and Hamajima, N. Combined effect of miR-146a rs2910164 G/C polymorphism and Toll-like receptor 4 +3725 G/C polymorphism on the risk of severe gastric atrophy in Japanese. *Digestive diseases and sciences*, 2011, vol. 56, no. 4, pp. 1131–7. doi: 10.1007/s10620-010-1376-1.
- Mollen, K.P., Anand, R.J., Tsung, A., Prince, J.M., Levy R.M., and Billiar, T.R., Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock*, 2006, vol. 26, pp. 430–7. doi: 10.1097/01.shk.0000228797.41044.08.
- Ashham, Mansur, Luisa, von Gruben, Aron F., Popov, Maximilian, Steinau, Ingo, Bergmann, Daniel, Ross, Michael, Ghadimi, Tim, Beissbarth, Martin, Bauer, and José, Hinz, The regulatory toll-like receptor 4 genetic polymorphism rs11536889 is associated with renal, coagulation and hepatic organ failure in sepsis patients. *J. Translat. Med.*, 2014, vol. 12, pp. 177–85. doi:10.1186/1479-5876-12-177.
- Murillo, G., Nagpal, V., Tiwari, N., Benya, R.V., and Mehta, R.G., Actions of vitamin D are mediated by the TLR4 pathway in inflammation-induced colon cancer. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2010, vol. 121, no. 1–2. Pp. 403–10. doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.009.
- Penas-Steinhardt, A., Barcos, L.S., Belforte, F.S., de Sereday, M., Vilarico, J., Gonzalez, C.D., Martínez-Larrad, M.T., Tellechea, M.L., Serrano-Rhos, M., Poskus, E., Frechtel, G.D., and Coluccio Leskow, F. Functional Characterization of TLR4 +3725 G/C Polymorphism and Association with Protection against Overweight. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 12, pp. 1–8. doi.org/10.1371/journal.pone.0050992.
- Tolstopyatova, M.A., Buslaeva, G.A., Kozlov, I.G. The role of receptors of innate immunity in development of infectious disease and newborn babies. *Pediatrics*. 2009, vol. 87, no. 1, pp. 115–20.
- Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997, vol. 349, pp. 825–32. PMID: 9121257.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. publ., 1982, 545 p.
- Hishida, A., Matsuo, K., and Goto, Y., Toll-Like Receptor 4 +3725 G/C Polymorphism, Helicobacter pylori Seropositivity, and the Risk of Gastric Atrophy and Gastric Cancer in Japanese. *Helicobacter*. 2009, vol. 14, no. 1, pp. 47–53. doi: 10.1111/j.1523-5378.2009.00659.x.
- Rousset, F., Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.*, 2008, vol. 8, no. 1, pp. 103–6. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x.
- Clarke, G.M., Anderson, C.A., Pettersson, F.H., Cardon, L.R., Morris, A.P., and Zondervan, K.T., Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat. Protoc.*, 2011, vol. 6, no. 2, pp. 121–33. doi: 10.1038/nprot.2010.182.
- Szumilas, M., Explaining odds ratios. *J. Can. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*. 2010, vol. 19, no. 3, pp. 227–9. PMID: 20842279.
- Sullivan, K., Dean, A., and Soe, M., OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. *Public. Heal. Rep.*, 2009, vol. 124, no. 3, pp. 471–4. doi: 10.1177/003335490912400320.
- Asselah, T., Bieche, I., Paradis, V., Bedossa, P., Vidaud, M., and Marcellin, P., Genetics, genomics, and proteomics: implications for the diagnosis and the treatment of chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis*. 2007, vol. 27, pp. 13–27. doi: 10.1055/s-2006-960168.
- Novo, E., Marra, F., Zamara, E., Valfre di Bonzo, L., Monitillo, L., Cannito, S., Petrai, I., Mazzocca, A., Bonacchi, A., De Franco, R.S., Colombatto, S., Autelli, R., Pinzani, M., and Parola, M., Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. *Gut*, 2006, vol. 55, pp. 1174–82. doi: 10.1136/gut.2005. 082701.
- Xu, L., Hui, A.Y., Albanis, E., Arthur, M.J., O'Byrne, S.M., Blaner, W.S., Mukherjee, P., Friedman, S.L., Eng, F.J., Human hepatic stellate

- cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut.*, 2005, vol. 54, pp. 142–51. doi: 10.1136/gut.2004.042127.
19. Guo, J., Friedman, S., Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis.* 2007, vol. 27, no. 4, pp. 413–26. doi: 10.1055/s-2007-991517.
 20. Lorenz, E., Mira, J.P., Frees, K.L., and Schwartz, D.A., Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch. Intern. Med.* 2002, vol. 162, no. 9, pp. 1028–32. PMID: 11996613.
 21. Agnese, D.M., Calvano, J.E., Hahm, S.J., Coyle, S.M., Corbett, S.A., Calvano, S.E., and Lowry, S.F., Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J. Infect. Dis.*, 2002, vol. 186, no. 10, pp. 1522–5. doi: 10.1086/344893.
 22. Beutler, B., Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. *Nature*, 2004, vol. 430, pp. 257–63. doi: 10.1038/nature02761.
 23. Paik, Y.H., Schwabe, R.F., Bataller, R., Russo, M.P., Jobin, C., and Brenner, D.A., Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology.*, 2003, vol. 37, no. 5, pp. 1043–55. doi: 10.1053/jhep.2003.50182.
 24. Su, G.L., Klein, R.D., Aminlari, A., Zhang, H.Y., Steintraesser, L., Alarcon, W.H., Remick, D.G., and Wang, S.C., Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. *Hepatology*, 2000, vol. 31, pp. 932–6. doi: 10.1053/he.2000.5634.
 25. Seki, E., De Minicis, S., Osterreicher, C.H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D.A., and Schwabe, R.F., TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat. Med.*, 2007, vol. 13, pp. 1324–32. doi: 10.1038/nm1663.
 26. Elsharkawy, A.M., Oakley, F., Mann, D.A., The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis*, 2005, vol. 10, no. 5, pp. 927–39. doi: 10.1007/s10495-005-1055-4.
 27. Thacher, T.D., Clarke, B.L., Vitamin D insufficiency. *Mayo Clin. Proc.*, 2011, vol. 86, no. 1, pp. 50–60. doi: 10.4065/mcp.2010.0567.
 28. Friedman, S.L., Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.*, 2008, vol. 88, no. 1, pp. 125–72. doi: 10.1152/physrev.00013.2007.
 29. Guo, J., Loke, J., Zheng, F., Hong, F., Yea, S., Fukata, M., Tarocchi, M., Abar, O.T., Huang, H., Sninsky, J.J., and Friedman, S.L., Functional Linkage of Cirrhosis-Predictive Single Nucleotide Polymorphisms of Toll-like Receptor 4 to Hepatic Stellate Cell Responses. *Hepatology*, 2009, vol. 49, no. 3, pp. 960–8. doi: 10.1002/hep.22697.
 30. Abreu, M.T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L.S., Arnold, E.T., and Arditi, M., Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 2001, vol. 167, no. 3, pp. 1609–16. doi.org/10.4049/jimmunol.167.3.1609.
 31. Paula, Picero, Oriol, Juanola, Esther, Caparrys, Pedro, Zapater, Paula, Giménez, José, M., González-Navajas, José, Such, and Rubén, Francés, Toll-like receptor polymorphisms compromise the inflammatory response against bacterial antigen translocation in cirrhosis. *Nature Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, pp. 46425. doi: 10.1038/srep46425.

Надійшла в редакцію 07.11.18
Після доопрацювання 29.12.18
Прийнята до друку 18.07.19