

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Останкова Ю.В.¹, Серикова Е.Н.¹, Ануфриева Е.В.¹, Басина В. В.², Машков И.А.³, Ширшова Н. Ю.⁴, Кусевская М. Б.⁵, Горская О. А.⁶, Тотолян А.А.^{1,7}

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РАЗВИТИЯ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ЧЕЛОВЕКА IFNAR-1 И/ИЛИ ЕГО ЭКСПРЕССИИ

¹ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, 197191, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», 194100, Санкт-Петербург, Россия;

³СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 99», 194358, Санкт-Петербург, Россия;

⁴СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 32», 197022, Санкт-Петербург, Россия;

⁵СПб ГУЗ «Городская клиническая больница № 31», 197110, Санкт-Петербург, Россия;

⁶ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», 199034, Санкт-Петербург, Россия;

⁷ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия

Для прогностической оценки прогрессирования заболевания при хроническом вирусном гепатите, в том числе развития гепатоцеллюлярной карциномы, разработан способ параллельного определения уровня относительной экспрессии гена человека IFNAR-1 и его полиморфизма. Используются биоптаты и/или образцы цельной крови, полученные от 659 пациентов с хроническими вирусными гепатитами с различной тяжестью течения и уровнем развития заболевания, в том числе лица без тяжелой патологии печени, больные с установленными диагнозами ГЦК, острая печёночная недостаточность, развившаяся на фоне хронической. В качестве контрольной группы обследовали 319 условно здоровых лиц без заболеваний печени и вирусных гепатитов в анамнезе. В ходе работы получали кДНК, определяли уровень экспрессии целевого гена IFNAR-1 и двух эталонных нормировочных генов «домашнего хозяйства» HPRT и RPP30 методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Относительный уровень экспрессии целевого гена IFNAR-1 определяли с использованием метода ΔΔСТ путём пересчёта полученных в ходе работы значений на калибровочных графиках с использованием в качестве калибраторов серии последовательных разведений контрольного образца. Дополнительно осуществляли амплификацию в двух ёмкостях фрагментов транскрипта гена IFNAR-1 с последующим секвенированием по Сэнгеру, совместно составляющих фрагмент протяжённостью 6157 нт. Разработанный метод расширяет арсенал способов, предназначенных для оценки на доклиническом этапе генетической предрасположенности человека к развитию гепатоцеллюлярной карциномы при вирусном гепатите, и может быть использован для фундаментальных исследований, посвящённых оценке значимости конкретных мутаций в развитии заболевания и пониманию механизма канцерогенеза.

Ключевые слова: хронические вирусные гепатиты; гепатоцеллюлярная карцинома, полиморфизм; экспрессия; IFNAR-1; прогностический анализ; персонализированная медицина

Для цитирования: Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Ануфриева Е.В., Басина В.В., Машков И.А., Ширшова Н.Ю., Кусевская М.Б., Горская О.А., Тотолян А.А. Прогностическая оценка развития гепатоцеллюлярной карциномы на основе определения полиморфизма гена человека IFNAR-1 и/или его экспрессии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (7): 349-357. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-7-349-357>

Для корреспонденции: Останкова Юлия Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. мол. иммунологии, зав. лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции; e-mail: shennal@yandex.ru

Финансирование. Отраслевая НИР «Парентеральные вирусные гепатиты: скрытая форма хронических гепатитов В и С при моно- и коинфекции в популяции и в группах риска, а также в зависимости от генетического полиморфизма генов хозяина» № АААА-А21-121021600219-5.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.05.2024

Принята к печати 29.05.2024

Опубликовано 25.06.2024

Ostankova Yu.V.¹, Serikova E.N.¹, Anufrieva E.V.¹, Basina V.V.², Mashkov I.A.³, Shirshova N.Yu.⁴, Kusevitskaya M.B.⁵, Gorskaya O.A.⁶, Totolian A.A.^{1,7}

PROGNOSTIC ASSESSMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA DEVELOPMENT BASED ON THE DETERMINATION OF HUMAN IFNAR-1 GENE POLYMORPHISM AND/OR ITS EXPRESSION

¹Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, St. Petersburg, Russia;

²Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 194100, St. Petersburg, Russia;

³St. Petersburg State Budgetary Institution of Health «City Polyclinic № 99», 194358, St. Petersburg, Russia;

⁴St. Petersburg State Budgetary Institution of Health «City Polyclinic № 32», 197022, St. Petersburg, Russia;

⁵St. Petersburg State Institution of Health «City Clinical Hospital № 31», 197110, St. Petersburg, Russia;

⁶D.O.Ott Research Institute of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, 199034, St. Petersburg, Russia;

⁷First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, 197022, St. Petersburg, Russia

For prognostic assessment of disease progression in chronic viral hepatitis, including the development of hepatocellular carcinoma, a method was developed for parallel determination of the level expression IFNAR-1 gene and its polymorphism. The work used biopsies and/or whole blood samples obtained from 659 patients with chronic viral hepatitis with varying severity and level of disease development, including persons without severe liver pathology, patients with established diagnoses of HCC, acute liver failure that developed in background of chronic. As a control group, 319 apparently healthy people without a history of liver disease or viral hepatitis were examined. During the work, cDNA was obtained, the expression level of the target gene IFNAR-1 and two reference normalizing housekeeping genes HPRT and RPP30 was determined using PCR with hybridization-fluorescence detection in real time. The relative expression level of the target gene IFNAR-1 was determined using the $\Delta\Delta CT$ method by recalculating the values obtained during the work on calibration graphs using a series of serial dilutions control sample as calibrators. Additionally, amplification of IFNAR-1 gene transcript fragments was carried out in two containers, followed by Sanger sequencing, which together constituted a fragment of 6157 nt in length. The developed method expands the arsenal of methods designed to assess, at the preclinical stage, a person's genetic predisposition to the development of hepatocellular carcinoma in viral hepatitis, and can be used for fundamental research aimed at assessing the significance of specific mutations in the development of the disease and understanding the mechanism of carcinogenesis.

Key words: chronic viral hepatitis; hepatocellular carcinoma, polymorphism; expression; IFNAR-1; prognostic analysis; personalised medicine

For citation: Ostankova Y.V., Serikova E.N., Anufrieva E.V., Basina V.V., Mashkov I.A., Shirshova N.Yu., Kusevitskaya M.B., Gorskaya O.A., Totolian A.A. Prognostic assessment of hepatocellular carcinoma development based on the determination of human IFNAR-1 gene polymorphism and/or its expression. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (7): 349-357 DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-7-349-357>

For correspondence: Ostankova Yu.V., PhD senior researcher at the Laboratory of Molecular Immunology, Head at the Laboratory of Immunology and Virology HIV Infection; e-mail: shennal@yandex.ru

Information about authors:

Ostankova Yu.V., <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>;
Serikova E.N., <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>;
Anufrieva E.V., <https://orcid.org/0009-0002-1882-529X>;
Basina V.V., <https://orcid.org/0000-0001-8095-1428>;
Mashkov I.A., <https://orcid.org/0009-0009-5442-657X>;
Shirshova N.Yu., <https://orcid.org/0009-0005-6188-3825>;
Kusevitskaya M.B., <https://orcid.org/0000-0002-7196-2595>;
Gorskaya O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5008-7437>;
Totolian A.A., <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>.

Acknowledgment. Branch research work «Parenteral viral hepatitis: occult form of chronic hepatitis B and C with mono- and coinfection in the population and in risk groups, as well as depending on the genetic polymorphism of the host's genes».

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Received 13.05.2024

Accepted 29.05.2024

Published 25.06.2024

Введение. Вирусные гепатиты (ВГ), предпосылкой которых являются вирусы гепатита В (ВГВ), С (ВГС), D (ВГD), широко распространены во всем мире, как среди групп риска (потребители инъекционных наркотиков, ВИЧ-инфицированные лица, пациенты гемодиализных центров, заключённые, медицинские работники и т. д.) [1-4], так и среди ключевых групп населения (доноры крови, беременные женщины и др.) [5, 6]. Несмотря на различные меры профилактики распространения патогенов, вирусные гепатиты относятся к наиболее значимым причинам заболеваемости и смертности [7]. Смертность связана преимущественно

с последствиями цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК), представляющих осложнения хронических гепатитов, их количество достигает 1,4 млн человек в год [8, 9].

ГЦК является четвёртой по значимости причиной смертности от рака во всем мире и ведущей причиной смерти при циррозе печени. Прогноз при ГЦК неблагоприятный, во всем мире смертность приближается к показателям заболеваемости [10]. Ранняя диагностика с постоянным наблюдением демонстрирует лучшие результаты, чем диагностика на основе симптомов, с соответствующими объединёнными показателями

3-летней выживаемости 50,8% и 27,9%. Большинство случаев ГЦК диагностируется на поздних стадиях, что приводит к росту и метастазированию злокачественной опухоли и высокой смертности [11]. Рентгеновская компьютерная томография (КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ), ультразвуковое исследование (УЗИ) позволяют визуализировать солидные опухоли глубоко в тканях, однако их чувствительности недостаточно для обнаружения очагов ГЦК размером около 1 мм. Оптическая визуализация ГЦК представляет огромный интерес из-за безопасности, превосходной чувствительности и возможности молекулярной визуализации, но она не может обеспечить высокое разрешение в глубоких тканях. Ранняя диагностика ГЦК по-прежнему представляет собой клиническую проблему [12].

Диагностика и наблюдение за ГЦК развиваются с появлением новых биомаркёров и разработкой рекомендаций по персонализированному скринингу, основанных на причине и факторах риска заболевания. К таким факторам относятся как инфицирование гепатотропными патогенами, прежде всего ВГВ, ВГС, ВГД, так и нарушение обмена веществ и/или особенности метаболизма индивидуума. Неинвазивное прогнозирование долгосрочного риска ГЦК при прогрессирующей фиброзе печени, инфекции вирусами гепатитов и других факторах риска крайне необходимо для скрининга ГЦК [13]. К биомаркёрам, способным дать прогностические сведения о риске развития ГЦК, следует отнести мутации ряда генов человека. В том числе генов, потенциально влияющих на конверсию острой инфекции ВГ в хроническую, развитие цирроза печени и ГЦК. Особенно важным это становится в связи с тем, что не всегда при лечении удается добиться полной элиминации вируса. Особенности жизненного цикла ВГВ могут приводить к развитию HBsAg-негативного (скрытого) гепатита В, то есть, отсутствию выявляемых уровней HBsAg и ДНК ВГВ в периферической крови но не элиминации вируса [14], а высокая частота встречаемости мутаций ВГВ, ассоциированных с прогрессированием заболевания [15], способствует к ускоренному развитию ГЦК. Возможность полной элиминации патогена показана для ВГС, однако у больных хроническим гепатитом С при лечении могут развиваться мутации лекарственной устойчивости, становящиеся причиной отсутствия чувствительности вируса к препаратам или прорыва терапии [16, 17]. Полная элиминация вируса не гарантирует окончательного заживления повреждения печени и не устраняет риск декомпенсации печени или развития ГЦК, особенно на поздних стадиях заболевания [18].

Изменчивость различных генов иммунной системы может объяснить различия в исходе инфекции. Известна связь семи однонуклеотидных замен в генах *IL-28B* (rs12979860), *JAK1* (rs11576173 и rs1497056), *TYK2* (rs280519), *OAS1* (rs2057778), *SOCS1* (rs33932899) и *RNASEL* (rs3738579) с тяжёлой степенью некровоспалительной активности печени у пациентов с ХГС [19].

Интерфероны (IFN)- α/β являются цитокинами, участвующими во врождённом и в адаптивном иммунном ответе. Интерферон типа 1 (IFN₁) представляет первую линию иммунной защиты хозяина, играет значимую роль во врождённом иммунном ответе и является важным цитокином, опосредующим противовирусный ответ хозяина. Индуцированные интерфероном пути

передачи сигнала - точно настроенная сеть взаимодействий, которые запускаются при связывании IFN с его рецептором (IFNR). Поскольку IFN являются противоопухолевыми и противовирусными цитокинами, можно предположить, что генетические профили генов, участвующих в этих путях передачи сигнала (например, *IFNR*), способны влиять на восприимчивость пациентов к раку и, при вовлечении ВГВ, к хроническому вирусному гепатиту В и связанной с ВГВ ГЦК [20]. *IFNAR-1* является одним из генов, чья экспрессия связана с канцерогенезом печени [21], ряд полиморфных вариантов *IFNAR-1* ассоциированы с хронизацией и прогрессированием ВГ [22].

Определение мутаций гена *IFNAR-1* и уровня его экспрессии у инфицированных ВГВ, ВГС, ВГД лиц может дать ценную прогностическую информацию в отношении возможного развития ГЦК, что позволит выявлять пациентов для углублённого обследования, своевременного назначения адекватной терапии, проведения комплекса профилактических мероприятий.

Цель работы: разработка способа прогностической оценки развития ГЦК на основе определения полиморфизма гена человека *IFNAR-1* и/или его экспрессии.

Материал и методы. В работе использованы биоптаты и/или образцы цельной крови, полученные от 659 пациентов с хроническими вирусными гепатитами с различной тяжестью течения и уровнем развития заболевания, в том числе лица без тяжёлой патологии печени, больные с установленными диагнозами ГЦК, острая печёночная недостаточность, развившаяся на фоне хронической. В качестве контрольной группы обследовали 319 условно здоровых лиц без заболеваний печени и вирусных гепатитов в анамнезе.

Экстракцию тотального препарата ДНК/РНК проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции производителя. С применением набора «Реверта-Л» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва) осуществляли обратную транскрипцию, получая кДНК. В полученном образце кДНК определяли уровень экспрессии целевого гена *IFNAR-1* и двух эталонных нормировочных генов «домашнего хозяйства» - ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы человека (*HPRT*) и ген белковой субъединицы р30 рибонуклеазы Р (*RPP30*) - методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием олигонуклеотидов и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов (табл.1). Регистрировали полученные результаты посредством гибридационно-флуоресцентной детекции в режиме «реального времени» с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР.

Состав амплификационной смеси представлял собой буферный раствор, содержащий Трис-НСl pH 8,8 (при 25° С), KCl, 6-7 мМ MgCl₂, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20, Taq+Phusion-полимеразы.

ПЦР и детекцию результатов проводили при следующих условиях, представленных в табл. 2.

Анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по трём каналам: по каналу для флуорофора JOE/HEX – сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента гена *IFNAR-1*, по

каналу для флуорофора ROX/Orange сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента гена *RPP30*, по каналу для флуорофора Cy5/Red сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента гена *HPRT*. Анализ экспрессии *IFNAR-1* проводили с нормализацией на эталонные гены, при этом вводится «нормировочный коэффициент», вычисляемый как среднее геометрическое или среднее арифметическое от значения всех эталонных нормировочных генов. Относительный уровень экспрессии целевого гена *IFNAR-1* определяли с использованием метода $\Delta\Delta CT$ [23] путём пересчёта полученных в ходе работы значений на калибровочных

графиках с использованием в качестве калибраторов серии последовательных разведений контрольного образца, представляющего собой ранее охарактеризованный образец кДНК, в котором представлен ген *IFNAR-1* дикого типа. На основании полученных результатов делали выводы о нормальном или сниженном уровне экспрессии целевого гена.

Дополнительно осуществляли амплификацию в двух ёмкостях фрагментов транскрипта гена *IFNAR-1* с последующим секвенированием по Сэнгеру, совместно составляющих фрагмент протяжённостью 6157 нт., с использованием праймеров, представленных в табл. 3.

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованные для определения уровня экспрессии целевого гена *IFNAR-1* и двух эталонных нормировочных генов *HPRT* и *RPP30*

Праймер/Зонд	Нуклеотидная последовательность
IFNAR-1F	5'-CAGCACCTGATGGCCTATCAC-3'
IFNAR-1R	5'-TGGAGCATGAAGAAGCTGGATG-3'
IFNAR-1zondHEX	5'-HEX-GGCCAGCAAGCGCATCTCCAG-BHQ1-3'
HPRTF	5'-CTTGCTCGAGATGTGATGAAGG-3'
HPRTR	5'-CAGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAG-3'
HPRT-zondCy5	5'-Cy5-ATCACATTGTAGCCCTCTGTGTGCTCAAGG-RTQ2/BHQ2-3'
RPP30F	5'-TTTGGACCTGCGAGCG-3'
RPP30R	5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'
RPP30-zondROX	5'-ROX-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-RTQ2/BHQ2-3'

Таблица 2

Параметры программы амплификации на планшетном амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США)

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин		1
2	95	10 с		5
	61	30 с		
3	72	15 с	JOE/HEX, Cy5/Red, ROX/Orange	35
	95	10 с		
	60	30 с *		
	72	15 с		

Примечание. * – Детекция флуоресцентного сигнала.

Таблица 3

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованные для амплификации и последующей секвенирующей реакции фрагментов транскрипта гена *IFNAR-1*

Праймер	Нуклеотидная последовательность
IFNAR-1F1	5'-GCTCTCGCTCTGCACACAG-3'
IFNAR-1R1	5'-TGAAGAGCCTCCTTGAACG-3'
IFNAR-1F2	5'-GAGATGCATCAATTATGTCTTCTTTC-3'
IFNAR-1R2	5'-TGGAAGTTACTGGTATTTTGTATTAC-3'
IFNAR-1F3	5'-TCTGTGTTCCCTGTCCATCACTG-3'
IFNAR-1R3	5'-GCCTTCAACCTTTCTTCCACC-3'
IFNAR-1F4	5'-GGTGAAGAAAAGGTTGAAGGC-3'
IFNAR-1R4	5'-GAGTGAATGCAACTGCCTTTT-3'
IFNAR-1F5	5'-TTTTCAAGTGAACAAGCGCTGAG-3'
IFNAR-1R5	5'-GAGCCTCCTTGAACGAACTAA-3'

ПЦР проводили при следующих условиях: после денатурации при 95 °С в течение 15 минут устанавливают 45 циклов амплификации в режиме: 95 °С - 30 секунд, 52 °С - 30 секунд, 72 °С - 6 мин 30 с; после 15-го и 30-го циклов элонгация при 72 °С - 8 минут; затем финальная элонгация при 72 °С - 10 минут. Качество амплификации определяли визуально в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1xTBE), окрашенном бромистым этидием, с использованием системы гель-документации и последующим анализом на предмет наличия целевых фрагментов и их длины.

Продукты амплификации, как и в дальнейшем продукты секвенирующей реакции, очищали методом спиртового осаждения. Очищенный фрагмент с концентрацией 50-100 нг, в зависимости от нуклеотидного состава анализируемого участка, использовали для постановки секвенирующих реакций с прямыми и обратными праймерами, указанных в табл. 3. Секвенирующую реакцию осуществляли с использованием набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США), согласно инструкции производителя. Секвенировали полученные фрагменты анализируемых образцов при помощи генетического анализатора ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ MS Excel, Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc., <https://www.graphpad.com/support/prism-5-updates/>). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. В качестве порога достоверности от-

личий определено значение вероятности $p < 0,05$.

Результаты. В работе, согласно разработанному нами способу, параллельно осуществляется оценка относительного уровня экспрессии *IFNAR-1* и выявление полиморфных вариантов указанного гена, потенциально способных приводить к прогрессированию заболевания.

Согласно предложенному нами методу, полученную кДНК использовали для одновременной амплификации в одной ёмкости участка целевого гена *IFNAR-1* и эталонных нормировочных генов *RPP30* и *HPRT* с использованием трёх пар олигонуклеотидных праймеров и соответствующих им олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов, несущих на 5'-конце флуорофоры, на 3'-конце не флуоресцентные тушители (см. табл. 1). Основой для возникновения флуоресценции является амплификация целевых и эталонных фрагментов ДНК на специфических олигонуклеотидах. Для детекции накопления специфических продуктов ПЦР используются флуоресцентно меченые олигонуклеотидные зонды, что позволяет проводить одновременную регистрацию флуоресценции по трём каналам амплификатора с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени. По каналам, соответствующим флуорофору HEX, детектировали уровень экспрессии гена *IFNAR-1*, а по каналам, соответствующим флуорофорам Cy5 и ROX – генов *HPRT* и *RPP30*, соответственно. Кривые флуоресценции трёх последовательных разведений кДНК контрольного образца-калибратора, в котором определён ген *IFNAR-1* дикого типа, отражающие динамику образования продукта реакции в ходе амплификации всех анализируемых генов представлены на рис. 1.

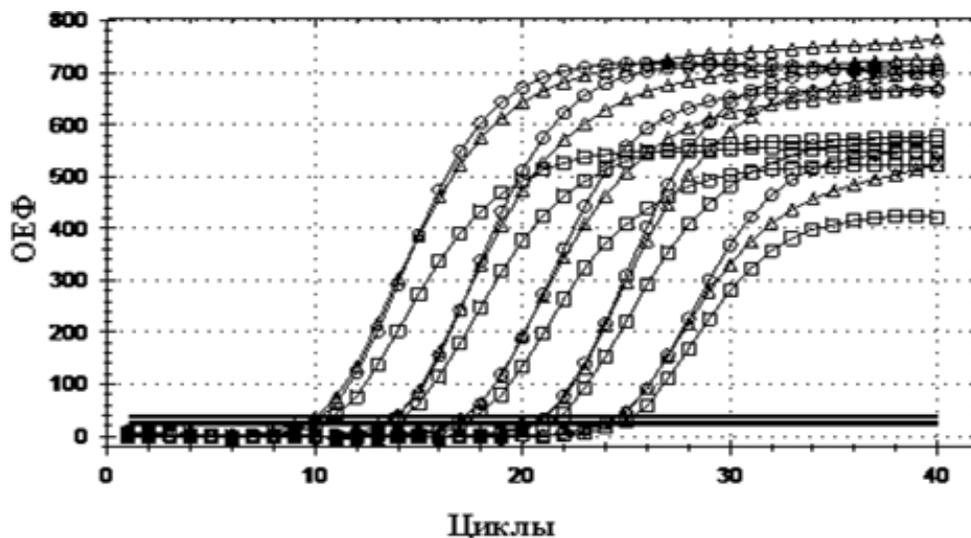


Рис. 1. Кривые флуоресценции последовательных разведений кДНК контрольного образца-калибратора, в котором определен ген *IFNAR-1* дикого типа, отражающие динамику образования продукта реакции в ходе амплификации всех анализируемых генов, включая целевой ген *IFNAR-1* (HEX – кружки) и два нормировочных *HPRT* (Cy5 – квадраты), *RPP30* (ROX – треугольники) при «диком» генотипе. ОЕФ - относительные единицы флуоресценции.

Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продукта реакции в ходе амплификации всех анализируемых генов при значительно сниженном уровне экспрессии *IFNAR-1*, представлены на рис. 2.

В ходе апробации этапа разработанного способа, на-

правленного на оценку экспрессии *IFNAR-1*, показано значительное снижение уровня экспрессии *IFNAR-1* у пациентов с развившейся на фоне вирусного гепатита ГЦК по сравнению с больными ХГВ без осложнений и по сравнению со здоровыми людьми – $\chi^2=8,472$, $p < 0,05$.

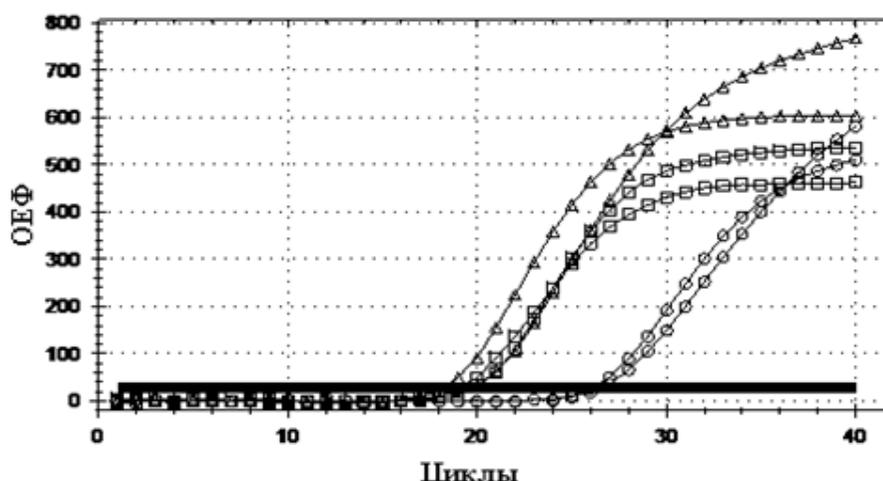


Рис. 2. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продукта реакции в ходе амплификации всех анализируемых генов при значительно сниженном уровне экспрессии *IFNAR-1*. Обозначены: целевой ген *IFNAR-1* (HEX – кружки) и два нормировочных *HPRT* (Cy5 – квадраты), *RPP30* (ROX – треугольники) при «диком» генотипе. ОЕФ - относительные единицы флуоресценции.

Показан высокий риск развития ГЦК при снижении уровня экспрессии *IFNAR-1*: OR=3,8 df=1, 95% ДИ: 1,610-8,970%, $p=0,0024$.

Выявление только уровней экспрессии недостаточно для прогнозирования прогрессирования заболевания и риска развития ГЦК, поскольку есть мутации, не влияющие на уровень экспрессии основного транскрипта *IFNAR-1*, однако играющие регулируемую роль в экспрессии вторичного, укороченного, специфичного для ГЦК транскрипта, что, в свою очередь, совпадает с нарушениями сигнальных путей, связанных с раком, и модификациями экспрессии IFN-1 [20]. При определении нуклеотидной последовательности полного транскрипта гена *IFNAR-1* для амплификации и последующей секвенирующей реакции разработан набор олигодезоксирибонуклеотидных праймеров, комплементарных участкам выявляемых фрагментов, при этом в одной ёмкости для ПЦР используют пару праймеров IFNAR-1F1/R1, фланкирующую фрагмент протяжённостью 5944 нуклеотидов, область 1-5944 нт, согласно представленной в международной базе данных GenBank референсной последовательности (NM_001384504.1), в другой ёмкости используют пару праймеров IFNAR-1F2/R2, фланкирующих фрагмент протяжённостью 4607 нуклеотидов, область 1551-6157 нт, для секвенирующих реакций используют уже упомянутые праймеры, а также праймеры IFNAR-1F3/R3, IFNAR-1F4/R4, IFNAR-1F5/R5 (см. табл. 3).

При апробации этапа разработанного способа, направленного на выявление значимых для прогрессирования заболевания печени полиморфных вариантов *IFNAR-1* обнаружена ассоциация полиморфизма L168V-C/G в 4 экзоне (rs2257167) с острой печеночной недостаточностью, развившейся на фоне хронической, и ГЦК: $\chi^2=4,287$ OR=3,7, df=1, 95% ДИ: 1,185-1,913%, $p<0,0384$. Показана ассоциация полиморфизма I499T-T/C в 11 экзоне (rs113181057) с ОХПН: $\chi^2=6,44$ OR=3,008, df=1, 95% ДИ: 1,352-6,694%, $p=0,0111$, а также с ГЦК: $\chi^2=13,492$ OR=5,207, df=1, 95% ДИ: 2,194-

12,355%, $p<0,0002$.

Обсуждение. Разработаны методы определения уровня экспрессии гена *IFNAR-1* в цельной крови [24, 25]. Недостатком предложенного метода является необходимость для работы предварительного выделения мононуклеаров из периферической крови, использование только одного нормировочного гена. Метод М. Акбаги и соавт. [25] позволял проводить анализ в цельной крови без выделения мононуклеаров, но подразумевал использование только одного нормировочного гена для нормирования данных. Недостатком способа нормирования данных с использованием одного эталонного гена является вариабельность результатов анализа, поскольку не существует идеального нормировочного гена, постоянного в независимости от ткани и состояния клеток в анализируемом образце. Выбор эталонного гена является одним из самых ответственных этапов при проведении анализа. Оптимальным можно считать подход, при котором анализируется одновременно несколько эталонных генов. Ряд генов домашнего хозяйства традиционно используется в качестве эталонных, однако, как и другие гены, они могут быть вариабельны при некоторых патологических состояниях из-за своей мультифункциональности. Не существует идеального нормировочного гена, однако правильно подобранный эталонный ген может уменьшить вариации, вызванные разным количеством и качеством исходного биологического материала, разной эффективностью выделения нуклеиновых кислот и разной эффективностью ПЦР. Оптимальным является одновременное использование двух эталонных нормировочных генов. В качестве таковых выбраны гены «домашнего хозяйства» - *RPP30* и *HPRT*. Если *HPRT* используется в качестве нормировочного гена при оценке экспрессии достаточно давно и широко, то выбор *RPP30* обоснован анализом данных литературы, свидетельствующих о применимости данного гена в качестве контрольного для определения эффективности экстракции геномной ДНК человека, в качестве эндогенного контроля для диагностики и ко-

личественной оценки бактериальной и вирусной нагрузки для нормализации количества копий инфекционных агентов с количеством клеток, основанным на наличии двух копий *RPP30* в каждой клетке, в качестве эталонного гена для определения вариаций числа копий целевых генов в геноме человека [26, 27]. Мультиплексная амплификация *IFNAR-1* и нормировочных генов в одной реакции устраняет вариабельность, связанную с ошибками пипетирования, позволяя более точно оценивать уровень экспрессии целевого анализата. При этом необходимо с особым вниманием отнестись к выбору нормировочных генов, необходимых для оценки и корректировки эффективности экстракции ДНК и последующей ПЦР из разных клинических образцов [27], что и сделано в настоящем исследовании. Необходимость же параллельного анализа как относительного уровня экспрессии *IFNAR-1*, так и его полиморфных вариантов, связана с недостаточностью оценки только одного параметра. Так как, с одной стороны, изменение уровня экспрессии может быть связано не только с собственными мутациями гена, но и с мутациями иных генов, участвующих в общих с *IFNAR-1* сигнальных путях [28] и наличием вирусной инфекции [29]. Наряду с известными полиморфными вариантами *IFNAR-1* в кодирующих областях (C/G в интроне 3 и C/G в экзоне 4), связанными с предрасположенностью к хронизации вирусного гепатита и его прогрессированию [22], описаны мутации, не влияющие на уровень экспрессии основного транскрипта гена, но выступающие регуляторами экспрессии вторичного, характерного для развития ГЦК [20].

Необходимость разработки и внедрения предложенного нами способа для прогноза предрасположенности к быстрому прогрессированию заболевания при вирусных гепатитах косвенно подтверждается тем, что низкие уровни экспрессии белка и/или мРНК *IFNAR-1* и/или *IFNAR-2* характерны для различных злокачественных новообразований, причём не только ГЦК, но и меланомы, мезотелиомы, карциномы панкреатического и желудочного происхождения [30]. Уровень экспрессии *IFNAR* коррелировал, по некоторым данным, не только с чувствительностью клеток к заражению вирусом, но и со степенью опухоли: содержание *IFNAR* относительно высоко в более дифференцированных опухолях и относительно низко в менее дифференцированных опухолях [31]. Нарушение врождённой противовирусной защиты, связанное с дисфункцией на путях интерферона, способствуют развитию онкологии, поскольку даёт опухолевым клеткам дополнительные преимущества. Эти дефекты одновременно способствуют выживанию и ускоренной пролиферации злокачественных клеток, облегчают репликацию вируса и, таким образом, повышают эффективность вирусного онколиза, нового метода, представляющего собой многообещающее дополнение к существующим подходам терапии рака [30, 32]. Определение уровня экспрессии *IFNAR-1* может быть использовано не только для выявления лиц, склонных к развитию ГЦК, но и для отбора онкологических больных, которым с наибольшей вероятностью будет полезна онколитическая виротерапия [30, 32], чему, несомненно, будет способствовать предложенный нами метод.

Следует понимать, что *IFNAR-1*, очевидно, является не единственным геном, полиморфизм и/или из-

менения экспрессии которого связаны с прогрессированием заболевания печени, в том числе с развитием ГЦК. Известны ассоциированные с развитием ГЦК полиморфные варианты в генах, кодирующих рецептор витамина D (rs7975232, rs2228570), фактор роста эндотелия сосудов (rs699947, rs3025039), интерлейкин-18 (rs1946518), маннозосвязывающий лектин (rs7096206), пататиноподобный фосфолипидный домен-содержащий белок 3 (rs2281135, rs2896019, rs4823173), белок гомолог 50 компонента механизма сортировки и сборки (rs3761472, rs3827385) и др. [33, 34]. Очевидна необходимость дальнейшей работы в этом направлении исследований, в том числе касающихся разработки прогностических методов для выявления предрасположенности к развитию ГЦК.

Заключение. Разработанный метод прогностической оценки развития ГЦК на основе определения полиморфизма гена человека *IFNAR-1* и/или его экспрессии расширяет арсенал способов, предназначенных для оценки на доклиническом этапе генетической предрасположенности человека к развитию ГЦК при вирусном гепатите. Представленный способ может быть использован для фундаментальных исследований, посвященных оценке значимости конкретных мутаций в развитии заболевания и пониманию механизма канцерогенеза.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4, 7-13, 18-26, 28-34 с.м. REFERENCES)

1. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.Б., Тотолян А.А. Распространенность оккультного гепатита В среди HBsAg-негативных лиц с ВИЧ в Великом Новгороде. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2019; 11(1): 64-70. DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-1-64-70.
2. Ануфриева Е.В., Серикова Е.Н., Останкова Ю.В., Щемелев А.Н., Давыденко В.С., Рейнгардт Д.Э. и др. Структура распределения маркеров некоторых гемоконтактных инфекций среди лиц из пенитенциарных учреждений. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2023; 15(3): 97-106. DOI: 10.22328/2077-9828-2023-15-3-95-104.
3. Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Банцевич М.Д., Филипович-Вигнъевич С.Б., Зуева Е.Б. и др. Характеристика связанных с HBsAg-негативной формой заболевания мутаций вируса гепатита В у пациентов гемодиализных центров. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4: 96-104. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-96-104.
5. Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Ширшова Н.Ю., Кусевцикая М.Б., Горская О.А., Басина В.В. и др. Распространенность скрытой формы хронического гепатита В у доноров крови в Санкт-Петербурге. *Инфекция и иммунитет*. 2023; 13(6): 1129-40. DOI: 10.15789/2220-7619-РОО-14480.
6. Балде Т.А.Л., Бумбали С., Серикова Е.Н., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Останкова Ю.В. и др. Сравнительный анализ вертикального риска передачи некоторых гемоконтактных инфекций в Гвинейской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 1: 87-94. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-87-94.
14. Семенов А.В., Останкова Ю.В., Файзуллаев Х.Н., Казакова Е.И., Козлов А.В., Мусабаев Э.И. и др. Кольцевая ковалентно замкнутая ДНК ВГВ как маркер распространенности оккультного гепатита В у пациентов с ВГВ, ВГД и ВГС инфекцией в Узбекистане. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 93(5): 43-9. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-5-43-49.
15. Останкова Ю.В., Семёнов А.В., Зуева Е.Б., Ногойбаева К.А., Касымбекова К.Т., Тобакалова С.Т. и др. Распространённость клинически значимых мутаций вируса у больных хроническим вирусным гепатитом В. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(1): 61-6. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-1-61-66.
16. Валутите Д.Э., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Козлов К.В., Борисов А.Г., Назаров В.Д. и др. Выявление мутаций лекарственной

- устойчивости вируса гепатита С у пациентов с неэффективной терапией препаратами прямого противовирусного действия. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(1): 18-27. DOI: 10.36233/0372-9311-47.
17. Рейнгардт Д.Э., Останкова Ю.В., Лялина Л.В., Ануфриева Е.В., Семенов А.В., Тотолян А.А. Распространенность мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита С среди пациентов с рецидивом заболевания на терапии препаратами прямого противовирусного действия. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2023; 15(4):86-93. DOI: 10.22328/2077-9828-2023-15-4-86-93.
27. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Модифицированный метод количественного определения уровней TREC и KREC в периферической крови у больных с иммунодефицитными состояниями. *Инфекция и иммунитет*. 2022; 12(5): 981-96. DOI: 10.15789/2220-7619-MMF-2039.
-
- REFERENCES
1. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Totolian A.A. The prevalence of occult hepatitis B among HBsAg-negative persons with HIV in Veliky Novgorod. *VICH- infektsiya i immunosupressii*. 2019; 11(1):64-70. DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-1-64-70. (in Russian)
2. Anufrieva E.V., Serikova E.N., Ostankova Yu.V., Shchemelev A.N., Davydenko V.S., Reingardt D.E. et al. The structure of some blood-borne infections distribution among persons from penitentiary institutions the markers. *VICH infektsiya i immunosupressii*. 2023; 15(3): 95-104. DOI: 10.22328/2077-9828-2023-15-3-95-104. (in Russian)
3. Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Semenov A.V., Bancevic M.D., Filipovic-Vignjevic S.B., Zueva E.B. et al. Profile of Hepatitis B Virus Mutations Associated with HBsAg-Negative Disease in Patients of Hemodialysis Centers. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; (4): 96-104. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-96-104. (in Russian)
4. Ostankova Yu.V., Shchemelev A.N., Boumbaly S., Balde T.A.L., Zueva E.B., Valutite D.E. et al. Prevalence of HIV and viral hepatitis markers among healthcare workers in the Republic of Guinea. *Diagnostics*. 2023; 13: 378. DOI: 10.3390/diagnostics13030378.
5. Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Shirshova N.Yu., Kusevitskaya M.B., Gorskaya O.A., Basina V.V. et al. Prevalence of occult hepatitis B infection among blood donors in Saint Petersburg. *Infektsiya I immunitet*. 2023; 13(6): 1129-40. DOI: 10.15789/2220-7619-POO-14480. (in Russian)
6. Balde T., Boumbaly S., Serikova E.N., Valutite D.E., Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V. et al. Comparative analysis of the vertical risk of transmission of some blood-borne infections in the Republic of Guinea. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; (1):87-94. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-87-94. (in Russian)
7. Hui R.W., Fung J. World Hepatitis Day 2023: Are we close to the target? *Indian J. Med. Res.* 2023; 158(1):1-4. DOI: 10.4103/ijmr.ijmr_1250_23.
8. Robinson A., Wong R., Gish R.G. Chronic hepatitis B virus and hepatitis D virus: new developments. *Clin. Liver. Dis.* 2023; 27(1): 17-25. DOI: 10.1016/j.cld.2022.08.001.
9. Van Nguyen D., Van Nguyen C., Bonsall D., Ngo T.T., Carrique-Mas J., Pham A.H. et al. Detection and characterization of homologues of human hepatitis viruses and pegiviruses in rodents and bats in Vietnam. *Viruses*. 2018; 10(3):102. DOI: 10.3390/v10030102.
10. Ganesan P., Kulik L.M. Hepatocellular Carcinoma: New Developments. *Clin. Liver. Dis.* 2023; 27(1): 85-102. DOI: 10.1016/j.cld.2022.08.004.
11. Li Q., Chen K., Huang W., Ma H., Zhao X., Zhang J. et al. Minimally invasive photothermal ablation assisted by laparoscopy as an effective preoperative neoadjuvant treatment for orthotopic hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2021; 496: 169-178. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.09.024.
12. Qi S., Zhang Y., Liu G., Chen J., Li X., Zhu Q. et al. Plasmonic-doped melanin-mimic for CXCR4-targeted NIR-II photoacoustic computed tomography-guided photothermal ablation of orthotopic hepatocellular carcinoma. *Acta Biomater.* 2021; 129: 245-57. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.05.034.
13. Fujiwara N., Kobayashi M., Fobar A.J., Hoshida A., Marquez C.A., Koneru B. et al. A blood-based prognostic liver secretome signature and long-term hepatocellular carcinoma risk in advanced liver fibrosis. *Med. (N Y)*. 2021; 2(7): 836-850.e10. DOI: 10.1016/j.medj.2021.03.017.
14. Semenov A.V., Ostankova Y.V., Faizullaev K.N., Kazakova E.I., Kozlov A.V., Musabaev E.I. et al. HBV covalently closed circular DNA as a marker of prevalence of occult hepatitis B in patients with HBV, HDV and HCV infection in Uzbekistan. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2016; 93(5): 43-9. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-5-43-49. (in Russian)
15. Ostankova Y.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Nogoybaeva K.A., Kasymbekova K.T., Tobokalova S.T. et al. The prevalence clinically significant virus mutations among patients with chronic viral hepatitis B. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(1): 61-6. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-1-61-66. (in Russian)
16. Valutite D.E., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Kozlov K.V., Borisov A.G., Nazarov V.D. et al. Detection of drug resistance mutations of hepatitis C virus in patients with failure of the treatment with direct acting antivirals. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021; 98(1):18-27. DOI: 10.36233/0372-9311-47. (in Russian)
17. Reingardt D.E., Ostankova Yu.V., Lyalina L.V., Anufrieva E.V., Semenov A.V., Totolian A. A. Distribution of hepatitis C virus drug resistance mutations among patients with recurrence of the disease during therapy with direct antiviral drugs. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2023; 15(4):86-93. DOI: 10.22328/2077-9828-2023-15-4-86-93. (in Russian)
18. Wirth T.C., Manns M.P. The impact of the revolution in hepatitis C treatment on hepatocellular carcinoma. *Ann. Oncol.* 2016; 27: 1467-74. DOI: 10.1093/annonc/mdw219.
19. López-Rodríguez R., Hernández-Bartolomé Á., Borque M.J., Rodríguez-Muñoz Y., Martín-Vilchez S., García-Buey L. et al. Interferon-related genetic markers of necroinflammatory activity in chronic hepatitis C. *PLoS One*. 2017; 12(7): e0180927. DOI: 10.1371/journal.pone.0180927.
20. Karamitros T., Papatheodoridis G., Paraskevis D., Hatzakis A., Mbisa J.L., Georgopoulou U. et al. Impact of interferon- α receptor-1 promoter polymorphisms on the transcriptome of the hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Front. Immunol.* 2018; 9: 777. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00777.
21. Bellodi-Privato M., Kubrusly M.S., Stefano J.T., Soares I.C., Wakamatsu A., Oliveira A.C. et al. Differential gene expression profiles of hepatocellular carcinomas associated or not with viral infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2009; 42(12): 1119-27. DOI: 10.1590/s0100-879x2009005000037.
22. Rehman S.U., Rauf M., Abbas Z., Hamed M.H., Qadri I. Role of Some Predominant Host Immunomodulators' Single Nucleotide Polymorphisms in Severity of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Infection. *Viral. Immunol.* 2016; 29(10): 536-45. DOI: 10.1089/vim.2016.0062.
23. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
24. Lalle E., Bordi L., Caglioti C., Garbuglia A.R., Castilletti C., Taibi C. et al. IFN-Alpha receptor-1 upregulation in PBMC from HCV naive patients carrying cc genotype. possible role of IFN-lambda. *PLoS One*. 2014; 9(4): e93434. DOI: 10.1371/journal.pone.0093434.
25. Akbari M., Akhavan-Bahabadi M., Shafiq N., Taheriazam A., Husen B.M., Sayad A. et al. Expression analysis of IFNAR1 and TYK2 transcripts in COVID-19 patients. *Cytokine*. 2022; 153: 155849. DOI: 10.1016/j.cyto.2022.155849.
26. Dyavar S.R., Ye Z., Byrareddy S.N., Scarsi K.K., Winchester L.C., Weinhold J.A. et al. Normalization of cell associated antiretroviral drug concentrations with a novel RPP30 droplet digital PCR assay. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 3626. DOI: 10.1038/s41598-018-21882-0.
27. Saitgalina M.A., Ostankova Y.V., Liubimova N.E., Semenov A.V., Kuznetsova R.N., Totolian A.A. Modified quantitative approach for assessing peripheral blood TREC and KREC levels in immunodeficient patients. *Infektsiya I immunitet*. 2022; 12(5): 981-96. DOI: 10.15789/2220-7619-MMF-2039. (in Russian)
28. Chen J., Xu W., Chen Y., Xie X., Zhang Y., Ma C. et al. Matrix metalloproteinase 9 facilitates hepatitis B virus replication through binding with type I interferon (IFN) receptor 1 to repress IFN/JAK/STAT signaling. *J. Virol.* 2017; 91(8): e01824-16. DOI: 10.1128/

- JVI.01824-16.
29. Sedeño-Monge V., Santos-López G., Rocha-Gracia R.C., Meléndez-Mena D., Ramírez-Mata A., Vallejo-Ruiz V. et al. Quantitative analysis of interferon alpha receptor subunit 1 and suppressor of cytokine signaling 1 gene transcription in blood cells of patients with chronic hepatitis C. *Virology*. 2010; 7: 243. DOI: 10.1186/1743-422X-7-243.
 30. Matveeva O.V., Chumakov P.M. Defects in interferon pathways as potential biomarkers of sensitivity to oncolytic viruses. *Rev. Med. Virology*. 2018; 28(6): e2008. DOI: 10.1002/rmv.2008.
 31. Zhang K.X., Matsui Y., Hadaschik B.A., Lee C., Jia W., Bell J.C. et al. Down-regulation of type I interferon receptor sensitizes bladder cancer cells to vesicular stomatitis virus-induced cell death. *Int. J. Cancer*. 2010; 127(4): 830-8. DOI: 10.1002/ijc.25088.
 32. Li Q., Tan F., Wang Y., Liu X., Kong X., Meng J. et al. The gamble between oncolytic virus therapy and IFN. *Front Immunol*. 2022; 13: 971674. DOI: 10.3389/fimmu.2022.971674.
 33. Quan Y., Yang J., Qin T., Hu Y. Associations between twelve common gene polymorphisms and susceptibility to hepatocellular carcinoma: evidence from a meta-analysis. *World J. Surg. Oncol*. 2019; 17(1): 216. DOI: 10.1186/s12957-019-1748-8.
 34. Wang Z., Budhu A.S., Shen Y., Wong L.L., Hernandez B.Y., Tiirikainen M. et al. Genetic susceptibility to hepatocellular carcinoma in chromosome 22q13.31, findings of a genome-wide association study. *JGH Open*. 2021; 5(12): 1363-72. DOI: 10.1002/jgh3.12682.