

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное
учреждение высшего образования
«Южный федеральный университет»**

**Академия биологии и биотехнологии им. Д.И.
Ивановского**

кафедра генетики

Веропаха Дарья Дмитриевна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ
ГЕПАТИТА В**

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
по направлению 060301 - Биология**

**Научный руководитель
Профессор кафедры генетики
Академии биологии и биотехнологии им. Д.И.
Ивановского, д.б.н.,
Машкина Елена Владимировна**

Ростов-на-Дону - 2019

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 52 с., введение, 3 главы, выводы, список литературы, список опубликованных работ, 5 таблиц, 13 рисунков, 65 источников, в том числе 22 отечественных, 41 зарубежный и 2 базы данных.

ВИРУС ГЕПАТИТА В, ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ, *MBL2*, *STAT3*

Целью работы было выявление ассоциации полиморфизмов в генах *MBL2* и *STAT3* с риском развития гепатита В у жителей Ростовской области.

Исходя из поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- исследование частоты регистрации полиморфизмов *rs1800451* и *rs1800450* гена *MBL2* в образцах ДНК людей, инфицированных гепатитом В, и контрольной группы;
- анализ частоты регистрации полиморфизма *rs2293152* гена *STAT3* в образцах ДНК, полученных из крови людей, инфицированных гепатитом В, и контрольной группы.
- Проведение анализа межгенного взаимодействия исследуемых аллельных вариантов генов.

В работе использованы молекулярно-генетические и статистические методы исследования. В качестве материала для исследования были использованы образцы ДНК,

выделенные из крови 99 людей в возрасте от 20 до 80 лет. Из них - 47 человек, инфицированных ВГВ и 52 человека без вирусной нагрузки, составивших контрольную группу. Образцы крови были предоставлены клинико-диагностической лабораторией «Наука».

По результатам исследования было установлено, что аллель *A* по полиморфизму *rs1800450* гена *MBL2* ассоциирована с высоким риском развития гепатита В, а наличие генотипа *GG* снижает такой риск, обладая защитным эффектом; взаимодействие полиморфных вариантов гена *STAT3* с гомозиготным по норме вариантом гена *MBL2* снижает риск развития гепатита В.

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
РЕФЕРАТ.....
.2	
ОГЛАВЛЕНИЕ....3
СПИСОК СОКРАЩЕНИ.....4
ВВЕДЕНИЕ.....6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....9
1.1 Особенности строения и жизненного цикла вируса гепатита В.....	9
1.2 МСЛ и его роль в восприимчивости организма к вирусу гепатита В.....	1
4	
1.3 Роль <i>STAT3</i> в иммунном ответе организма на ВГВ-инфекцию.....	18

2	МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	
.....24		
2.1	Материал	
исследования.....		24
2.2	Методы	
исследования.....		24
2.2.1	Выделение ДНК термо-коагуляционным	
методом.....		24
2.2.2	Анализ полиморфизмов в генах. Проведение	
ПЦР.....		25
2.2.3	Анализ полиморфизма длин рестрикционных	
фрагментов.....		27
2.2.4	Электрофоретическое разделение в агарозном	
геле продуктов		
рестрикции.....		
.28		
2.3	Методы статистического анализа	
результатов.....		31
3	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ	
ОБСУЖДЕНИЕ.....		33
3.1	Анализ частот генотипов по полиморфизму <i>rs2293152</i>	
гена		
<i>STAT3</i>		
.....33		
3.2	Анализ частот генотипов по полиморфизму <i>rs1800451</i>	
гена		
<i>MBL2</i>		
35		
3.3	Анализ частот генотипов по полиморфизму <i>rs1800450</i>	
гена		
<i>MBL2</i>		
37		
3.4	Анализ межгенного взаимодействия манноз-	
связывающего лектина и транскрипционного фактора <i>STAT3</i>		
при ВГВ-инфекции.....		39
ВЫВОДЫ.....		
.....43		

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	44
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ.....	52

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВГВ** – вирусный гепатит В, вирус гепатита В
- ГЦК** – гепатоцеллюлярная карцинома
- ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота
- МСЛ** – манноз-связывающий лектин
- ОГВ** – острая форма гепатита В
- ПАМП** – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
- ПЦР** – полимеразная цепная реакция
- РНК** – рибонуклеиновая кислота
- сссДНК** – комплементарно закрученная спиральная ДНК
- ХГВ** – хронический гепатит В
- ЭДТА** – этилендиаминтетрауксусная кислота
- dNTP** – deoxyribonucleotide triphosphate – дезоксирибонуклеотид трифосфат
- HBcAg** – коровый антиген гепатита В
- HBеAg** – е-антиген гепатита В; анти- HBеAg – антитела к е-антигену гепатита В
- HBsAg** – поверхностный антиген гепатита В
- HBV** – hepatitis B virus – вирус гепатита В
- HBxAg** – х-антиген гепатита В

HLA - human leucocyte antigen - антигены тканевой совместимости, главный комплекс гистосовместимости

Hsp - heat shock proteins - белки теплового шока

Ig - immunoglobulin - иммуноглобулин

IL - interleukin - интерлейкин

IFN - interferon - интерферон

JAК - Janus kinase - Янус киназа

MASP - mannose-associated serine protease - манноз-ассоциированная сериновая протеаза

NTCP - Na-таурохолат котранспортирующий пептид

pgPHK - прегеномная рибонуклеиновая кислота

SNP - single nucleotide polymorphism - однонуклеотидный полиморфизм

STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription - активатор транскрипции, участвующий в передаче сигнала

Тақ-полимераза - термостабильная ДНК-зависимая-ДНК-полимераза бактерии *Thermus aquaticus*

ВВЕДЕНИЕ

Гепатит В является одним из самых распространенных заболеваний печени. Известно, что около 5,5 млрд. человек имели контакт с ВГВ-инфекцией. По данным ВОЗ около 2 млрд. человек в мире имеют хотя бы один маркер ВГВ (Демиденко Т.П., Неверов В.А., 2011). Ежегодно регистрируется порядка 4-5 млн. случаев заболевания данной инфекцией и 1-2 млн. смертей, связанных с ВГВ. При этом в РФ и СНГ от ВГВ ежегодно погибает около 5 тыс. человек от острой формы гепатита В (ОГВ) и 4,5 тыс. – от хронического гепатита В (ХГВ). 10% перенесших ОГВ становятся носителями ВГВ. Риск возникновения гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) у инфицированных ВГВ в 223 раза превышает риск развития рака печени при отсутствии вируса в организме (Ратникова Л.И. и др., 2013).

Восприимчивость людей к ВГВ высока. Наиболее чувствительными являются дети первого года жизни. Чаще вирусом гепатита В заражаются мужчины, что можно объяснить очень высоким уровнем экспрессии гена S вируса под воздействием стероидных гормонов, которых у мужчин больше, чем у женщин (Демиденко Т.П., Неверов В.А., 2011). По результатам мониторинга за 2012 г. в России наибольшие показатели заболеваемости ВГВ регистрировались в возрастных группах населения 30-39 лет (22,8 на 100 тыс. населения) и 20-29 лет (18,5 на 100 тыс. населения) (Ющук Н.Д. и др., 2014). В последнее время наблюдается тенденция снижения заболеваемости в России (рис. 1) ОГВ с 35,3 на 100 тыс. в 2001 году до 1,33 на 100 тыс. в 2013 году и ХГВ с 16 на 100 тыс. в 2001 году до 11,71 на 100 тыс. в 2013 году (Еремеева

Ж.Г. и др., 2015). По данным Роспотребнадзора наименьшие показатели заболеваемости были зарегистрированы для ОГВ в 2017 году – 0,9 на 100 тыс.

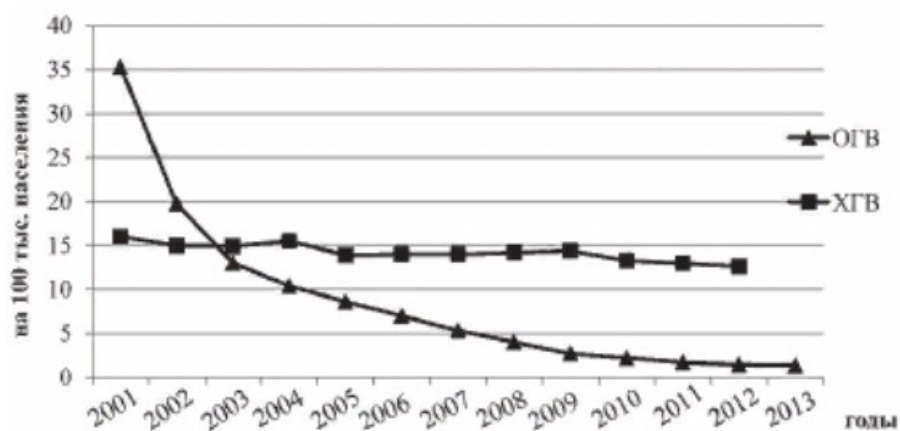


Рисунок 1 – Многолетняя динамика заболеваемости вирусным гепатитом В в РФ за 2001 – 2013 гг. (на 100 тыс. населения) – ОГВ – острый гепатит В, ХГВ – хронический гепатит В. (Еремеева Ж.Г. и др., 2015)

Основными источниками инфекции при гепатите В являются лица с бессимптомными и клинически выраженными острыми и хроническими формами болезни. Однако наибольшее эпидемиологическое значение имеют больные с хроническим течением заболевания. Для заражения достаточно всего 10^{-6} - 10^{-7} мл крови, содержащей вирусные частицы (Демиденко Т.П., Неверов В.А., 2011).

Несмотря на то, что экспрессия вируса происходит, в основном, в гепатоцитах, возбудитель не оказывает прямого цитопатического действия на клетки печени. Цитолиз печёночных клеток происходит под действием цитотоксических иммунных механизмов, мишенями для которых служат антигенные детерминанты вируса гепатита В, ассоциированные с антигенами главного комплекса гистосовместимости (HLA) на поверхности гепатоцитов. Они играют существенную роль в развитии внепечёночных

поражений, которые при хроническом гепатите В встречаются в 22-35% случаев (Лопатина Е.Ю. и др., 2010; Балабина Н.М., 2017).

Таким образом, полиморфизмы в генах различных факторов иммунитета могут повлечь за собой изменение восприимчивости организма к инфекционным заболеваниям, в том числе, гепатиту В, а также повлиять на течение инфекции. Так, одним из важнейших факторов врождённого иммунитета белковой природы является манноз-связывающий лектин (МСЛ). Он синтезируется в печени и связывается с сахарами на поверхности микроорганизмов, запуская лектиновый путь активации системы комплемента, что способствует удалению патогенов с помощью комплемент-опосредованного фагоцитоза (Eisen D.P., Minchinton R.M, 2003, Scorza M. et al., 2015). Другим важным фактором иммунитета является сигнальный белок и активатор транскрипции STAT3. Он участвует в передаче сигнала при действии широкого спектра цитокинов и факторов роста (Ярилин А.А., 2010, Wake M.S., Watson C.J., 2015).

Целью работы было выявление ассоциации полиморфизмов в генах *MBL2* и *STAT3* с риском развития гепатита В у жителей Ростовской области.

Исходя из поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- исследование частоты регистрации полиморфизмов *rs1800451* и *rs1800450* гена *MBL2* в образцах ДНК людей, инфицированных гепатитом В, и контрольной группы;

- анализ частоты регистрации полиморфизма *rs2293152* гена *STAT3* в образцах ДНК, полученных из крови людей, инфицированных гепатитом В, и контрольной группы.
- Проведение анализа межгенного взаимодействия исследуемых аллельных вариантов генов.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Особенности строения и жизненного цикла вируса гепатита В

Вирус гепатита В является представителем семейства *Нepadnaviridae* рода *Orthohepadnavirus*. Генетическая вариабельность генома вируса гепатита В привела к появлению 10 различных географически распространенных генотипов, обозначенных буквами от А до J. Внутри ряда генотипов выделяют субгенотипы, различающиеся между собой на 4-8% полных геномных последовательностей, что проявляется в незначительных аминокислотных заменах в структуре поверхностного антигена вируса HBsAg. Исследования распространения отдельных генотипов по России немногочисленны, однако имеются данные, что в нашей стране существует всего три генотипа ВГВ: D, А и С, среди которых наиболее распространён генотип D (субтипы HBsAg ауw2 и ауw3) и составляет 88% от всех зарегистрированных и генотипированных случаев выявления вируса гепатита В (Герасимова В.В. и др., 2015, Мануйлов В.А. и др., 2015).

Вирус гепатита В имеет сферическую форму диаметром 42-50 нм и состоит из капсида, включающего в себя нуклеопротеид и основной ядерный белок – НbcAg, а также другие белки: НBeAg, НBxAg; и суперкапсида, состоящего из липидной мембраны со встроенными в неё молекулами белков – HBsAg, включающих в себя три домена: S, pre-S1, pre-S2 и рецептор полимеризованного альбумина pAR (рис. 2). Нуклеокапсид представляет собой икосаэдр (имеет гексагональную симметрию) размером

34-38 нм и образован 240 субъединицами корового антигена; меньшая часть вирионов содержит нуклеокапсид диаметром 30 нм, образованный 180 субъединицами корового антигена. Внутри нуклеокапсида также находятся клеточные белки-шапероны, или белки теплового шока, Hsp70 и Hsp90 (Львов Д.К. и др., 2008).

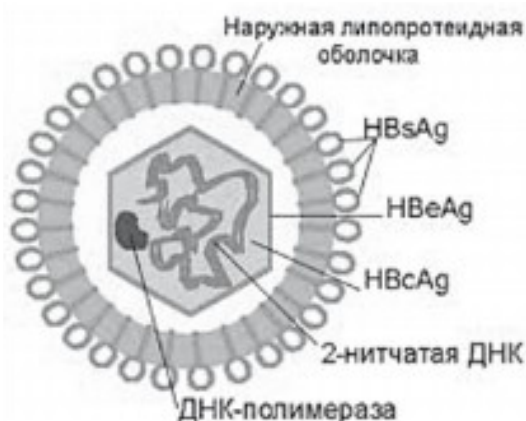


Рисунок 2 – Схема строения вируса гепатита В
(Курманова Г.М. и др., 2013)

Генетический материал вируса представлен двуцепочечной кольцевой молекулой ДНК (включает около 3200 нуклеотидов), плюс-цепь которой на 30% короче минус-цепи. Кольцевая конфигурация молекулы формируется не ковалентным связыванием 5'- и 3'-концов, а наличием нахлёста между 5'-концами цепей ДНК, составляющего 240 н.о. 5'-конец минус-цепи ДНК имеет небольшую избыточность по сравнению со строго кольцевой формой и ковалентно связан с молекулой полимеразы, 5'-конец плюс-цепи ДНК ковалентно связан с 19-членной 5'-кэпированной РНК (Рахманова А.Г., Александров П.А., Шаройко В.В., 2015).

Вирус гепатита В представляет собой ретроидный вирус – имеет в жизненном цикле стадию синтеза

молекулы ДНК на матрице РНК с помощью ревертазы. Имеет собственные ферменты - ДНК-полимеразу и протеинкиназу, находящиеся в нуклеокапсиде вируса. ДНК-полимераза вируса состоит из N-концевого ТР-домена, обладающего способностью инициировать синтез ДНК без нуклеотидного праймера, спейсерного домена и ОТ-домена, обладающего активностью РНКазы (Burrell C.J. et al., 1999). Геном вируса гепатита В включает в себя 4 гена: Р, S, С и Х (рис. 3). Ген Р кодирует РНК-зависимую ДНК-полимеразу вируса, а также участвует в кодировании НВсАg. Ген С кодирует С-белок (НВсАg) и Е-белок (НВеАg). Ген S и предшествующие ему зоны pre-S1 и pre-S2 кодируют 3 белка: S (226 аминокислот), pre-S1 (400 аминокислот) и pre-S2 (281 аминокислота); их также называют S-белок, L-белок и М-белок соответственно. L-белок отвечает за рецепцию вириона с белком плазматической мембраны гепатоцита аннексином V, а также участвует в формировании вириона. М-белок несет информацию об участке связывания с полимеризованным альбуминовым рецептором, который локализован на гепатоците. S-белок определяет формирование НВсАg, кодирует рецептор полиальбумина рAR. Соотношение субъединиц М:L:S определяется как 1:1:4. Ген Х кодирует неструктурный Х-белок (154 аминокислоты), обладающий трансактиваторной функцией и вызывающий нарушение клеточной регуляции, а также выступающий в роли инициатора образования гепатокарцином. В геноме вируса присутствуют также регуляторные последовательности ДНК, контролирующие репликацию вируса и синтез

белков. Информационная ёмкость генома вируса гепатита В крайне высока, что обеспечивается перекрытием открытых рамок считывания генов (Львов Д.К. и др., 2008, Курманова Г.М. и др, 2013).

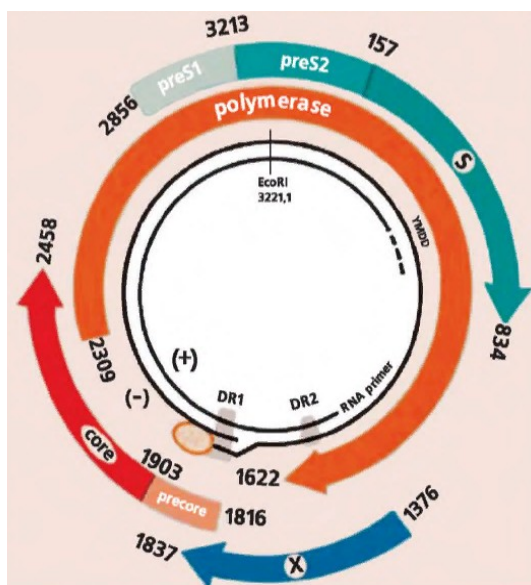


Рисунок 3 – Генетическая карта вируса гепатита В. ECOR1 – рестрикционный сайт, указан как референс-точка начала и конца нуклеотидных последовательностей генома (Герасун Б. А. и др., 2012)

HBsAg и HBcAg синтезируются в избытке, к тому же HBcAg способен к самосборке, поэтому в больших количествах формируются дефектные сферические частицы размером 22 нм, лишённые нуклеокапсида, а также нитевидные частицы. Концентрация инфекционных частиц Дэйна может достигать значительной величины ($10^5 - 10^9$ частиц/мл), однако концентрация дефектных частиц во много раз превосходит эти значения – до 10^{13} частиц/мл (Kim C.Y., Tilles J.G., 1970).

Среди основных путей передачи вируса гепатита В можно выделить: парентеральный (в 15,1% случаев - при переливании крови или плазмы, в 23,8% — при различных

парентеральных манипуляциях, в 20,5% — при оперативных вмешательствах, в 5,3% — при внутривенном введении наркотиков), половой (26%) и трансплацентарный (9,3%) (Колмогорова Е.Л, Красавцева А.В., Мурзина О.Ю., 2016).

ВГВ высокоустойчив к физическим и химическим факторам, сохраняет жизнеспособность в сыворотке крови при комнатной температуре в течение 3 месяцев, в высушенной плазме — до 25 лет, не погибает при действии многих дезинфицирующих средств и консервантов крови. Он инактивируется при автоклавировании (5 мин) и стерилизации сухим жаром (+160 °С), чувствителен к эфиру и не ионным детергентам (Соринсон С.Н., 1997).

В механизме развития патологического процесса при вирусном гепатите В можно выделить несколько основных стадий патогенеза:

1. внедрение возбудителя — заражение - фиксация возбудителя на гепатоците и проникновение внутрь клетки;

2. размножение вируса и «выталкивание» его на поверхность гепатоцита, а также в кровь;

3. включение иммунологических реакций, направленных на элиминацию возбудителя; иммунокомплексное поражение органов и систем;

4. формирование иммунитета, освобождение от возбудителя, выздоровление (Учайкин В.Ф., Чередниченко Т.В., Смирнов А.В., 2012).

Вирусные частицы передаются парентеральным путём - при попадании любых биологических жидкостей

больного на мельчайшие повреждения слизистой оболочки и кожных покровов здорового человека. По кровотоку вирус диссеминирует в печень, фиксируясь на гепатоцитах, которые содержат на своей мембране рецептор для полиальбумина – Na-таурохолат котранспортирующий пептид (NTCP). С помощью рAR вирус гепатита В проникает в гепатоцит. Суперкапсид вируса при этом разрушается. Нуклеокапсид вируса транспортируется вдоль микротрубочек к ядру и в нуклеоплазме ДНК-полимераза вируса достраивает одноцепочечные участки положительной цепи ДНК вируса с образованием РНК-репликативного посредника, проводя одновременно транскрипцию и трансляцию (синтез вирусспецифичных белков). Далее следует обратная транскрипция с помощью вирусспецифичной ДНК-полимеразы, обладающей свойством ревертазы. Прегеномная РНК (pgРНК) разрушается. На отрицательной цепи новосинтезированной ДНК комплементарно синтезируется короткая положительная цепь, образуется неполный дуплекс. Он включается в нуклеокапсид вируса и проникает в цитоплазму гепатоцита. Там формируется суперкапсид. Так происходит репликация вируса гепатита В (рис. 4). Длина положительной цепи варьирует в зависимости от времени выхода вируса из гепатоцита. Однако вновь синтезированная ДНК вируса не обязательно покрывается оболочками и выходит из гепатоцита, но может также встроиться в геном гепатоцита. Кроме того, вирус может синтезироваться не только в клетках печени, но и в

клетках почек, селезенки, поджелудочной железы, кожи, костного мозга и мононуклеарах периферической крови. Тем не менее, максимальная экспрессия генов вируса проходит именно в гепатоцитах (Демиденко Т.П., Неверов В.А., 2011, Рахманова А.Г., Александров П.А., Шаройко В.В., 2015).

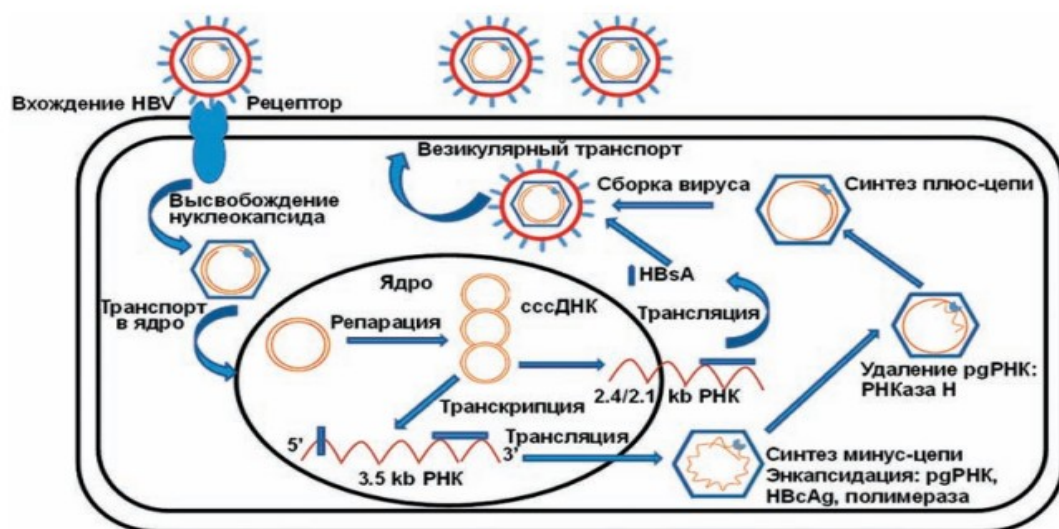


Рисунок 4 - Жизненный цикл вируса гепатита В (Рахманова А.Г., Александров П.А., Шаройко В.В., 2015)

Наличие фазы репликации вируса гепатита В говорит об активном, прогрессирующем течении болезни. При хроническом вирусном гепатите В критерием наличия фазы репликации считается обнаружение в сыворотке крови HBsAg, HBeAg, ДНК вируса гепатита В, ДНК-полимеразы, в ткани печени - HBcAg. Критерием фазы интеграции является определение в сыворотке крови HBsAg, в ряде случаев в сочетании с анти-HBeAg, в ткани печени - HBsAg (Балабина Н.М., 2017).

1.2 МСЛ и его роль в восприимчивости организма к вирусу гепатита В

Манноз-связывающий лектин (МСЛ) является паттерн-распознающей рецепторной молекулой, играющей важную роль в системе врожденного иммунитета. Он представляет собой лектин С-типа и состоит из четырех доменов, которые в свою очередь образуют гликозилированную полипептидную цепь с молекулярной массой 32кДа (Берлов М.Н. и др., 2011, Pradhan V. et al., 2015). N-концевой домен полипептидной цепи обогащен остатками цистеина; коллагенподобный домен отвечает за связывание сериновых протеаз MASP-1 и MASP-2, внося существенный вклад в активацию комплемента по лектиновому пути (Fujita T., Matsushita M., Endo Y., 2004, Beltrame M.H. et al., 2015); шеечный домен выполняет функции стабилизации первичного олигомера и связывания C-концевого домена с остальной молекулой (Malhortra R. et al., 1992); C-концевой домен является углевод-распознающим, именно он отвечает за распознавание и связывание патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП) в присутствии ионов кальция (Берлов М.Н. и др., 2011). Три такие цепи, объединяясь и образуя тройную спираль в области коллагенподобного домена, составляют олигомер первого порядка. От 2 до 6 таких олигомеров формируют сложную структуру, похожую на букет тюльпанов, образуя в области богатого цистеином домена межцепочечные дисульфидные связи. Вся эта структура в конечном счете представляет собой гомоолигомер (рис. 5) (Jensenius H. et al., 2009).

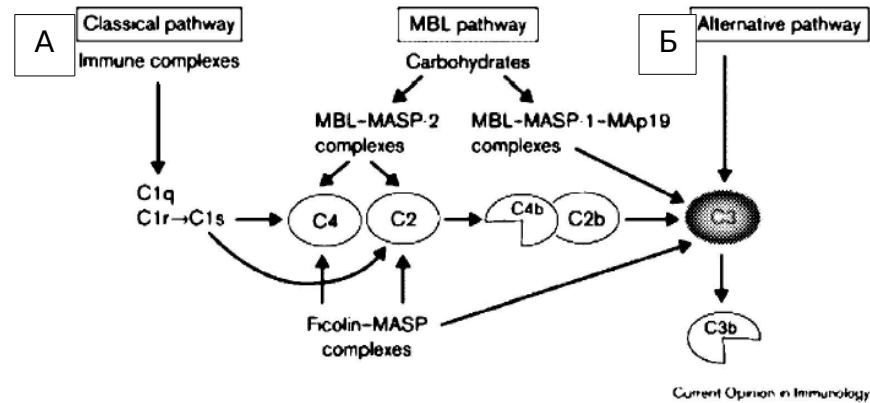
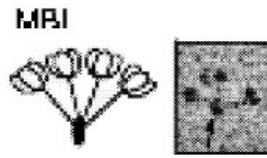


Рисунок 5 - А - общая структура человеческого МСЛ: микрофотография (справа) и схема (слева); Б - Общая схема системы комплемента с фокусировкой на лектиновом пути (Jensenius J. C., 2005)

МСЛ с помощью С-домена способен связывать остатки D-маннозы, а также L-фукозы, N-ацетил-D-глюкозамина и, с меньшей аффинностью, D-глюкозы. Однако этот белок не способен связываться с остатками галактозы и их производными. Его специфичность определяет способность связываться в составе олиго- и полисахаридов только с терминальными остатками моносахаридов. Дело в том, что у млекопитающих олигосахаридные цепи гликопротеидов несут на своих терминалях, как правило, производные остатков галактозы либо сиаловой кислоты, в отличие от клеток микроорганизмов. Связывание МСЛ с любыми ПАМПП

приводит к активации системы комплемента по лектиновому пути (рис. 5). Для этого необходимо поливалентное связывание лектина с патогеном, что обеспечивается наличием 9-18 сайтов связывания в молекуле МСЛ (Jensenius J. C., 2005, Garred P. et al., 2016). Далее комплекс МСЛ-ПАМП подвергается фагоцитозу благодаря рецепторам к коллагеноподобному домену лектина у макрофагов и нейтрофилов. В этом процессе огромную роль играют сериновые протеазы (Zhang X.-L., Ali Mohammed A.M. , 2008, Beltrame M.H. et al., 2015). Таким образом, МСЛ способен повышать эффективность нейтрализации возбудителя хозяином посредством опсонизации и последующего фагоцитоза клеток микроорганизмов нейтрофилами, моноцитами и макрофагами, а также регулировать иммунный ответ за счет снижения продукции провоспалительных цитокинов (Lundbo L.F. et al., 2015). Поэтому от концентрации и стабильности структуры МСЛ в сыворотке крови зависит устойчивость организма к различным возбудителям, в том числе и к вирусу гепатита В. Состояние МСЛ, в свою очередь, зависит от наличия функционально важных полиморфизмов в гене *MBL2*.

У мышей имеется два гомологичных гена МСЛ: *MBL1* и *MBL2*, однако у человека первый из них является псевдогеном и только второй – функциональный ген (Kalia N. et al., 2016). МСЛ человека закодирован единственным геном *MBL2*, расположенным на 10 хромосоме вблизи центромеры, в регионе 10q11.2-q21. Этот ген состоит из четырех экзонов и трех интронов (рис. 6). В первом экзоне

закодирован сигнальный пептид, а также N-концевой и часть коллагенподобного домена; во втором экзоне – оставшаяся часть коллагенподобного домена; в третьем экзоне – шеечный домен; в четвертом – С-концевой домен (Pradhan V., Surve P., Ghosh K., 2010).

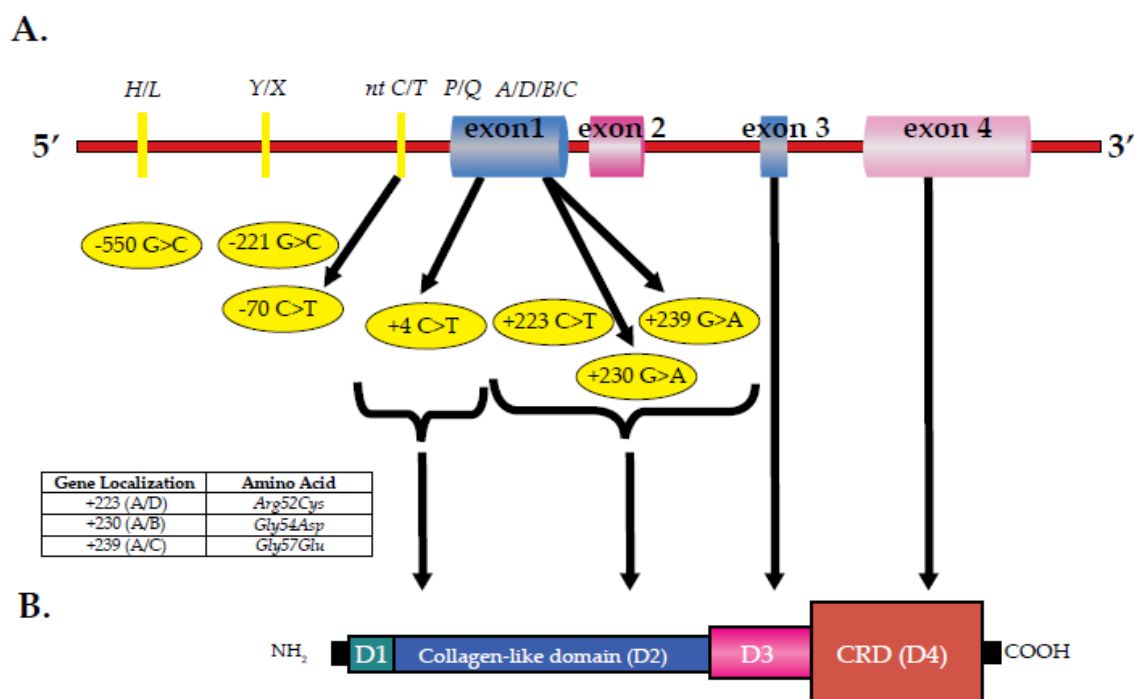


Рисунок 6 – А – Структура гена *MBL2*; В – SNPs в 1 экзоне (Pradhan V., Surve P., Ghosh K., 2010)

На сегодняшний день найден всего 661 полиморфизм в гене *MBL2*, 12 из которых являются функционально важными SNPs. Так, например, полиморфизм *Gly54Asp* негативно влияет на экспрессию *MBL2* и стабильность синтезируемого им белка (Kalia N. et al., 2016), а полиморфизм *Gly57Glu* воздействует на структуру коллагеновой области МСЛ таким образом, что она генерирует дефектные взаимодействия с MASP, доменом распознавания углеводов и его мишенью, вследствие чего уровень циркулирующего МСЛ снижается (Moura T.C. et al., 2017). К тому же, 4 SNPs в области 3'-UTR играют роль

в связывании микроРНК, 7 SNPs на 5' конце и в области интрона предположительно связаны с регулированием присоединения фактора транскрипции и экспрессии гена *MBL2* (Kalia N. et al., 2016).

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) выявлены в следующих точках экзона 1: в позиции +223 замена С>Т в кодоне 52 (*Arg52Cys*); в позиции +230 замена G>A в кодоне 54 (*Gly54Asp*); в позиции +239 замена G>A в кодоне 57 (*Gly57Glu*). Данные мутации соответствуют аллелям D, B и C или же все могут быть обозначены как аллель O, нормальным аллелем является A. SNPs в промоторной области *MBL2* расположены в позициях: -550 замена G>C (H/L вариант), -221 замена G>C (Y/X вариант), а также в 5'-нетранслируемом регионе +4 замена С>Т (P/Q вариант). Они формируют различные гаплотипы, среди которых LX гаплотип ассоциирован с низким уровнем МСЛ в плазме крови (Pradhan V., Surve P., Ghosh K., 2010).

В данной работе исследованы полиморфизмы *Gly54Asp* (*rs1800450*) и *Gly57Glu* (*rs1800451*). Частота первого полиморфизма наиболее высока для жителей Южной Америки (22%) и наиболее низка для жителей Африки (1%). Для европеоидов она составляет 14% (База данных 1000 Genomes – <http://www.internationalgenome.org/>). Для второго полиморфизма частота высока среди жителей Африки (26%) и крайне низка среди европеоидов (1%), азиатов и инуитов (Zhang N. et al., 2013). Крайне редкая встречаемость полиморфизма *rs1800451* также описана для коренных жителей арктических регионов и

европеоидов в РФ (Смольникова М.В., Епанешникова В.Б., Терещенко С.Ю., 2017).

1.3 Роль STAT3 в иммунном ответе организма на ВГВ-инфекцию

Белки семейства STAT являются транскрипционными факторами, которые в цитоплазме находятся в неактивном состоянии. Впервые они были обнаружены в ходе исследования передачи сигнала от рецепторов IFN (Levy D.E., Lee C., 2002). Впоследствии оказалось, что они участвуют в передаче сигнала от многих факторов роста и цитокинов. На данный момент насчитывается всего семь белков данного семейства: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b и STAT6. Каждый из них имеет специфичные для него рецепторы цитокинов и факторов роста, которые активируют именно этот белок. Гены, кодирующие белки семейства STAT расположены на разных хромосомах: на хромосоме 2 находятся гены белков STAT1 и STAT4, на хромосоме 12 – гены STAT2 и STAT6, гены остальных белков семейства STAT располагаются на 17 хромосоме. Все белки STAT сходны по аминокислотной последовательности и молекулярной массе, имеют общую структуру, что выражается в наличии нескольких консервативных доменов, общих для всех белков семейства (Шапошников А. В., 2013).

Белок STAT3 интересен тем, что он является ключевой молекулой сигнального пути Janus kinase/STAT (Гук К. Д., Купраш Д. В., 2010, Шапошников А. В., 2013, Chanthra N. et al., 2015), активируется самым широким

спектром цитокинов и факторов роста, включая IL-6 и фактор роста гепатоцитов (Xie J. et al., 2013), а также, в отличие от остальных белков семейства, немаловажную роль выполняет при воспалительных процессах и канцерогенезе печени (Li M. et al., 2018). Важное исследование было проведено Киоши Такеда с сотрудниками в 1997 году (Takeda K. et al., 1997), в котором было показано, что мыши, нокаутные по гену *STAT3* на 6,5 - 7,5 день эмбрионального развития погибали. Это позволяет в очередной раз подчеркнуть важность белка *STAT3*, а также сделать предположение о том, что он является первичным белком семейства *STAT*, а также многофункциональным белком (Levy D.E., Lee C., 2002).

По строению *STAT3* схож с остальными белками семейства. В его структуре можно выделить всего шесть доменов: N-концевой, биспиральный, ДНК-связывающий, линкерный, SH₂- и C-концевой домены. N-концевой домен включает с 1 по 130 аминокислотные остатки, он ответственен за образование ди- и тримеров *STAT3*, а также за его взаимодействие с другими белками. Биспиральный домен включает со 130 по 320 аминокислотные остатки и обеспечивает связывание *STAT3* с рецептором, а также облегчает фосфорилирование тирозина (Tyr-705). ДНК-связывающий домен включает с 320 по 465 аминокислотные остатки, он определяет уровень специфичности *STAT3* к ДНК и осуществляет регуляцию транспорта данного белка в ядро. Линкерный домен включает с 465 по 585 аминокислотные

остатки и является связкой между ДНК-связывающим и SH₂-доменом. SH₂-домен включает с 585 по 688 аминокислотные остатки и способствует связыванию STAT3 с активированными рецепторами и последующему образованию димеров благодаря средству к фосфорилированному тирозину. С-концевой домен включает с 688 по 770 аминокислотные остатки, он неструктурирован и приобретает стабильную пространственную структуру только связавшись с другими молекулами, в его функции входит обеспечение взаимодействия STAT3 с другими участниками транскрипционного комплекса. Важно отметить также, что именно этот домен содержит остатки тирозина (Tyr-705) и серина (Ser-727), по которым происходит фосфорилирование при активации STAT3 (Subramaniam A. et al., 2013). Белок STAT3 может находиться по меньшей мере в четырех изоформах: STAT3 α (92 кДа), которая включает в себя С-концевой домен и несет остаток серина в 727 положении, и STAT3 β (83 кДа), которая представляет собой укороченную форму белка и не имеет части С-концевого домена с 723 по 770 аминокислотные остатки, что, однако, не препятствует возможности фосфорилирования по тирозину, находящемуся в 705 положении, и активации белка (рис. 7), а также STAT3 γ (72 кДа) и STAT3 δ (64 кДа) (Arora L. et al., 2018, Shi Y. et al., 2018, Wang X. et al., 2018).

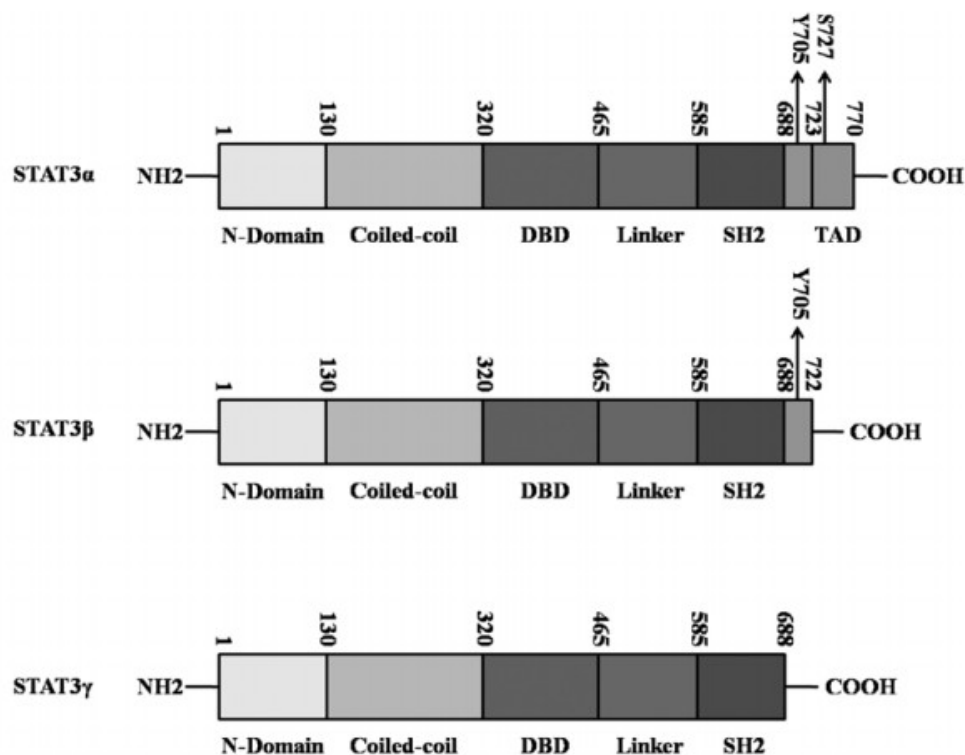


Рисунок 7 – Доменное строение различных изоформ STAT3 (Shi Y. et al., 2018)

Как уже было указано выше, STAT3 является основной молекулой сигнального каскада JAK/STAT. Каскад запускается взаимодействием цитокина с рецептором. При этом цитокин должен обладать высоким сродством к рецептору, в противном случае, каскад не запустится и передача сигнала будет невозможна. Инициация индукции сигнала начинается димеризацией рецепторов и аутокаталитическим фосфорилированием ассоциированных с ними Jак-киназ, они активируются и способствуют фосфорилированию субъединиц рецепторов по остаткам тирозина. Затем сформировавшийся комплекс “JAK-рецептор” фосфорилирует STAT, находящийся в цитоплазме в неактивном мономерном состоянии. Фосфорилирование STAT способствует их димеризации и дальнейшему транспорту в ядро, где они связываются с

промоторами генов-мишеней и запускают их транскрипцию (рис. 8) (Гук К. Д., Купраш Д. В., 2010, Шапошников А. В., 2013).

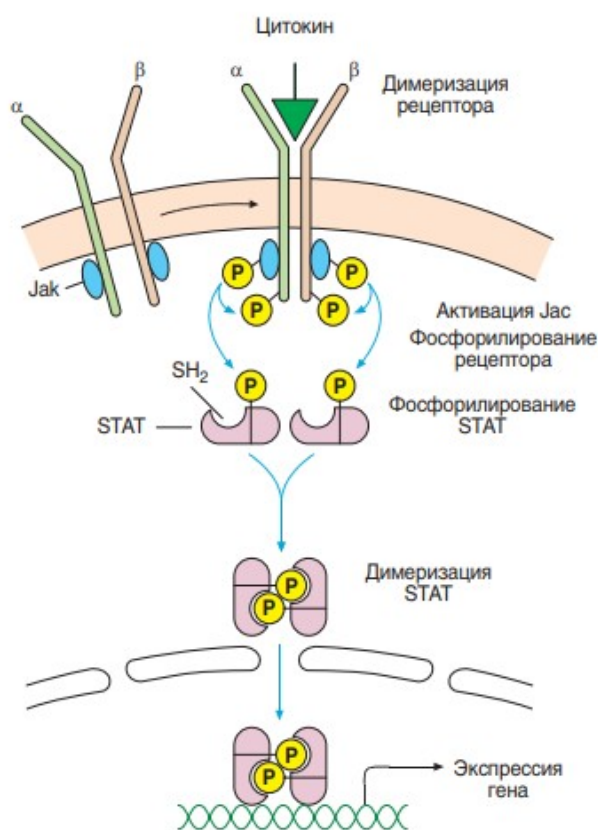


Рисунок 8 – Сигнальный каскад JAK/STAT (Гук К. Д., Купраш Д. В., 2010)

При инфицировании организма ВГВ возможно нарушение сигнального пути STAT3, что ведет к неэффективности иммунного ответа на ВГВ-инфекцию, при этом снижается цитопротекторное воздействие фактора роста гепатоцитов и эпидермального фактора роста на CD95-маркер, опосредующий апоптоз, а также на активность цитотоксических Т-лимфоцитов. Было также показано, что STAT3 участвует в усилении ответа Th17-лимфоцитов при острой хронической печеночной недостаточности. Исходя из этого можно предположить, что полиморфизмы в гене *STAT3* могут стать причиной

повышения восприимчивости организма к вирусу гепатита В и риска развития связанных с ним заболеваний печени (Li M. et al., 2018). Активация STAT3 постоянно должна находиться под контролем, потому как его конститутивная активация ведет к транскрипции онкогенов. Так, например, полиморфизм *rs2293152* гена *STAT3* ассоциирован с нарушением сигнального пути JAK/STAT, ведущим к дисбалансу иммунитета, что способствует генерации мутаций вируса гепатита В и, соответственно, связано с повышенным риском развития ГЦК. В таком случае белок STAT3 может быть активирован НВх белком вируса, причем мутантные белки обладают повышенной активационной способностью по сравнению с белками НВх дикого типа. Активированный STAT3 специфично присоединяется к энхансеру 1 ВГВ, что ведет за собой запуск экспрессии всех генов вируса (Xie J. et al., 2013, Chanthra N. et al., 2015).

Кодирующий ген *STAT3* находится на 17 хромосоме (17q21.1). Он включает в себя всего 24 экзона и 23 интрона и является высококонсервативным: для человека и мыши различие состоит всего в одной аминокислоте (Fathi N. et al., 2018). В гене *STAT3* обнаружено на данный момент всего 55 полиморфизмов (База данных – SNPedia – <https://www.snpedia.com/index.php/SNPedia>). Полиморфизм *rs2293152* этого гена располагается в 13 интроне и представляет собой замену С>G в положении 1145 (Siegel A.M. et al., 2011), причем генотип GG ассоциирован с повышенным риском развития ГЦК, особенно для женщин. Кроме повышенного риска развития ГЦК,

полиморфизм *rs2293152* связан также обычно с высокой вирусной нагрузкой и высоким риском развития цирроза печени (Xie J. et al., 2013).

Стоит отметить, что данных о частоте полиморфизма *rs2293152* для жителей России практически нет; исследование данного полиморфизма было проведено только для жителей Республики Башкортостан (Заплахова О.В. и др., 2017). Известно, что частота данного полиморфизма наиболее высока для восточно-азиатской популяции (48%) и для латиноамериканцев (49%) и наиболее низка для африканцев (11%). Для европеоидов она составляет 40% (База данных 1000 Genomes – <http://www.internationalgenome.org/>).

2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

В качестве материала были использованы образцы ДНК, выделенные из крови людей двух групп: 47 человек с положительным результатом ПЦР на *HBV* и 52 человека без вирусной нагрузки – контрольная группа. Образцы крови были предоставлены клинико-диагностической лабораторией «Наука». Среди пациентов, у которых осуществлялся забор крови, были как мужчины, так и женщины в возрасте от 20 до 80 лет.

Стоит отметить, что в персистировании вируса гепатита В и хронизации заболевания ключевую роль играет образование внутриядерного пула комплементарно закрученной спиральной ДНК (сссДНК), на которой затем синтезируется матричная РНК вируса. ДНК вируса можно выявить уже на ранних стадиях заражения, а именно в поздний инкубационный период, также в продромальный период и в разгар заболевания. Также она определяется при хроническом гепатите В репликативного типа. И только в период реконвалесценции ее обнаружить не удастся (в этот период определяются другие серологические маркеры: анти-НВс IgG и анти-НВс и анти-НВе). При острой форме заболевания концентрация ДНК вируса обычно больше, чем при хронической (Малеев В.В., Ситников И.Г., Бохонов М.С., 2016).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение ДНК термо-коагуляционным методом

Выделение ДНК производили из лейкоцитов цельной крови по термокоагуляционному принципу.

Этапы выделения ДНК:

1. Кровь в вакуумной пробирке с ЭДТА аккуратно перемешать (покачиванием пробирки).

2. В микропробирку с защелкой объемом 1,5 мл внести 600 мкл цельной крови. Подписать микропробирку.

3. Закрывать пробирку и центрифугировать со скоростью 3000 об/мин в течение 5 минут. После центрифугирования кровь разделится на плазму и форменные элементы. На поверхности осадка форменных элементов расположен тонкий слой лейкоцитов (белого цвета).

4. Аккуратно удалить плазму пипеткой, не захватывая при этом лейкоциты.

5. Закрывать пробирку и выдерживать ее при -20 °С (в морозилке) до полного замораживания форменных элементов (не менее 1 часа).

6. Полностью разморозить содержимое пробирки при комнатной температуре.

7. Внести в пробирку реактив «ДНК-экспресс». Его объем должен быть равен объему оставшихся в пробирке форменных элементов и плазмы. Закрывать пробирку.

8. Содержимое пробирки тщательно перемешать на вортексе.

9. Установить пробирку в предварительно нагретый до 99 °С твердотельный термостат и выдерживать 15 минут.

10. После охлаждения пробирку центрифугировать при 12000 об/мин в течение 1 минуты.

11. Полученный супернатант (раствор ДНК) перенести в чистую микропробирку.

2.2.2 Анализ полиморфизмов в генах. Проведение ПЦР

В отобранных образцах ДНК проводили анализ полиморфизмов *rs1800451* и *rs1800450* в гене *MBL2* и полиморфизма *rs2293152* в гене *STAT3*. Анализ основан на проведении реакции амплификации с парой праймеров (прямой и обратный) (табл. 1). Анализ позволяет наработать необходимый фрагмент ДНК в высокой концентрации.

Таблица 1. Праймеры для проведения ПЦР на полиморфизмы *rs1800451* и *rs1800450* в гене *MBL2* и полиморфизм *rs2293152* в гене *STAT3*

Праймеры для проведения ПЦР на полиморфизмы в гене <i>MBL2</i>	
Прямой	5'-АТАГССТГСАСССАГАТТГТАГ-3'
Обратный	5'-АГАГАСАГААССАССААССА-3'
Праймеры для проведения ПЦР на полиморфизм в гене <i>STAT3</i>	
Прямой	5'-ТССССТГТГАТТ САГАТССС-3'
Обратный	5'-САТТСССАСАТСТСТГСТС С-3'

Этапы проведения ПЦР:

1. Подготовить и подписать пробирки.
2. Подготовить рабочую смесь реагентов для проведения амплификации из расчета на 1 пробу: 2,5 мкл 2,5 мМ dNTP; 2,5 мкл 10×ПЦР буфера Б; 2,5 мкл 25 MgCl₂; 15,2 мкл ddH₂O; 0,3 мкл Таq-полимеразы (5 Е/мкл); по 1,0 мкл прямого и обратного праймеров в рабочей концентрации (разведенных в 10 раз).

3. Полученную реакционную смесь перемешать и разлить по 25 мкл в каждую пробирку.

4. В каждую пробирку добавить по 20 мкл минерального масла.

5. В каждую пробирку, кроме контроля, добавить по 3 мкл образца исследуемой ДНК. В контрольную пробирку добавить такое же количество буфера.

6. Поставить пробирки в амплификатор «Терцик» (ДНК-технология, Россия) для проведения амплификации. Используется горячий старт: пробирки вносят в нагретый до 94-95 °С амплификатор. Режим амплификации участка гена *MBL2*: 94°C – 5 минут; далее 34 цикла, где денатурация – 94°C по 30 секунд, отжиг – 60°C по 1 минуте и элонгация – 72°C по 1 минуте; финальная элонгация – 72°C в течение 5 минут. Режим амплификации для гена *STAT3*: 95°C – 5 минут; далее 40 циклов, где денатурация – 95°C по 30 секунд, отжиг – 59°C по 30 секунд и элонгация – 72°C по 30 секунд; финальная элонгация – 72°C в течение 5 минут.

2.2.3 Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Продукты амплификации подвергали воздействию рестриктаз: *BanI* для *rs1800450*, *MboII* для *rs1800451* гена *MBL2* и *HpaII* для *rs2293152* гена *STAT3*. Принцип метода состоит в «узнавании» рестриктазой определенного сайта при его наличии в продукте амплификации и разрезании нуклеиновой кислоты по этому сайту. При этом сайт рестрикции специфичен для каждого полиморфизма и, таким образом, можно проводить анализ полиморфизмов при

дальнейшем электрофоретическом разделении в агарозном геле полученных продуктов.

Этапы проведения рестрикции:

Для рестриктазы *MBOII*:

1. Приготовить реакционную смесь: 18,5 мкл H₂O, 2 мкл 10× буфера В и 1,5 мкл рестриктазы из расчета на 1 пробу. Легко перемешать.

2. К 10 мкл ПЦР-продукта из каждой пробирки добавить полученную реакционную смесь.

3. Провести инкубацию пробирок в твердотельном термостате при 37 °С в течение 3 часов.

4. Для инактивации рестриктазы инкубировать образцы в термостате при 65 °С ещё 20 минут.

Для рестриктазы *HPAII*:

1. Приготовить реакционную смесь: 17 мкл H₂O, 2 мкл 10× FastDigest Green Buffer и 1 мкл рестриктазы из расчета на 1 пробу. Легко перемешать.

2. К 10 мкл ПЦР-продукта из каждой пробирки добавить полученную реакционную смесь.

3. Провести инкубацию пробирок в твердотельном термостате при 37 °С в течение 5 минут, затем для инактивации рестриктазы инкубировать в термостате при 65 °С ещё 5 минут.

Для рестриктазы *BanI*:

5. Приготовить реакционную смесь: 18,5 мкл H₂O, 2 мкл 10× буфера В и 1,5 мкл рестриктазы из расчета на 1 пробу. Легко перемешать.

6. К 10 мкл ПЦР-продукта из каждой пробирки добавить полученную реакционную смесь.

7. Провести инкубацию пробирок в твердотельном термостате при 37 °С в течение 3 часов.

8. Для инактивации рестриктазы инкубировать образцы в термостате при 65 °С ещё 20 минут.

После проведения рестрикции образцы готовы к помещению в агарозный гель для проведения электрофореза.

2.2.4 Электрофоретическое разделение в агарозном геле продуктов рестрикции

Разделение продуктов рестрикции проводили методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле в течение 30 минут.

Этапы проведения электрофореза:

1. В колбу Эрленмейера внести 3 г агарозы, 2 мл 50× ТАЕ буфера и 100 мл дистиллированной воды.

2. Нагреть смесь до полного растворения агарозы и поставить на магнитную мешалку.

3. Добавить 10 мкл бромистого этидия в колбу.

4. Подготовить заливочный столбик, залить в него агарозу, установить гребенки и оставить на 15 минут до полного застывания агарозы.

5. Приготовить раствор буфера для электрофоретической камеры, смешав 6 мл 50× ТАЕ буфера и 300 мл дистиллированной воды, и добавить в камеру.

6. Застывшую агарозу поместить в камеру для горизонтального электрофореза (Хеликон, Россия). В каждую лунку внести по 10 мкл продуктов рестрикции.

7. Подключить камеру для электрофореза к источнику питания Эльф-8 (ДНК-Технология, Россия) и оставить для электрофореза на 30 минут.

Выявление результатов электрофореза проводили в УФ с помощью трансиллюминатора Gel Doc (BioRad, США).

После проведения рестрикции возможно получение трех типов продуктов для каждого полиморфизма. Для полиморфизма *rs1800451* гена *MBL2*: гомозиготы по нормальному аллелю (генотип *GG*) дают продукт длиной 315 п.н., гомозиготы по мутантному аллелю (генотип *AA*) дают два типа продуктов – 272 п.н. и 43 п.н. и гетерозиготы (генотип *GA*) дают три типа продуктов – 315 п.н., 272 п.н. и 43 п.н. (рис. 9).

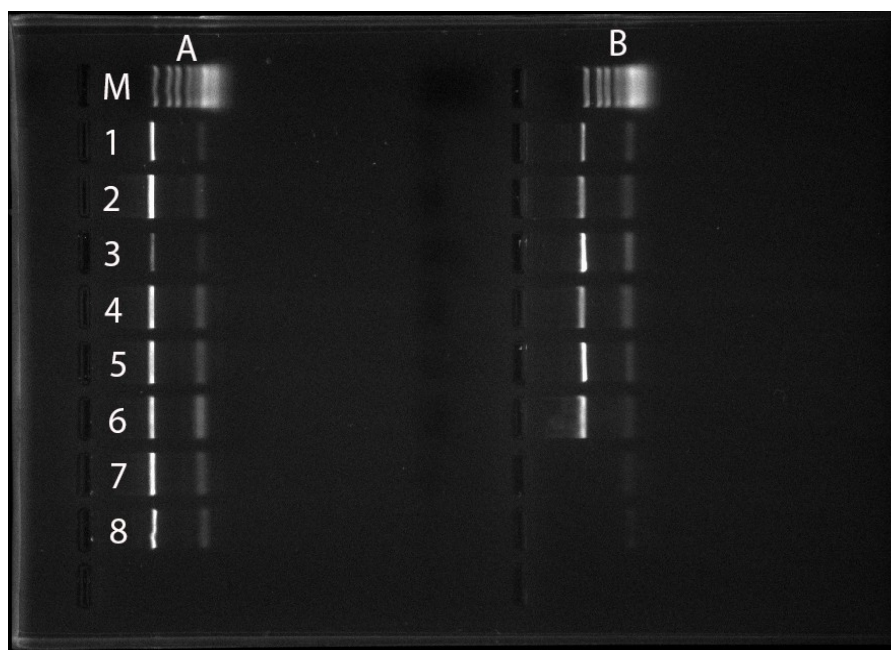


Рисунок 9 – Результат электрофоретического разделения продуктов рестрикции (на полиморфизм *rs1800451*) ампликонов, полученных при проведении ПЦР гена *MBL2*: А, В – обозначения дорожек; цифрами обозначены: нечетными – ПЦР-продукты, четными – продукты после рестрикции; М – маркер (слева направо: 300; 200; 150; 100; 75; 50; 35; 25; 20; 15;

10 п.н.); лунки 7 и 8 дорожки В – контроль; в остальных лунках с цифровыми обозначениями выявлены фрагменты ДНК размером 315 п.н., что соответствует генотипу *GG*

Для полиморфизма *rs1800450* гена *MBL2* после рестрикции возможно получение следующих результатов: гомозиготы по нормальному аллелю (генотип *GG*) дают два типа продуктов – 263 п.н. и 52 п.н., гомозиготы по мутантному аллелю (генотип *AA*) дают продукт длиной – 315 п.н. и гетерозиготы (генотип *GA*) дают три типа продуктов – 315 п.н., 263 п.н. и 52 п.н. (рис. 10).

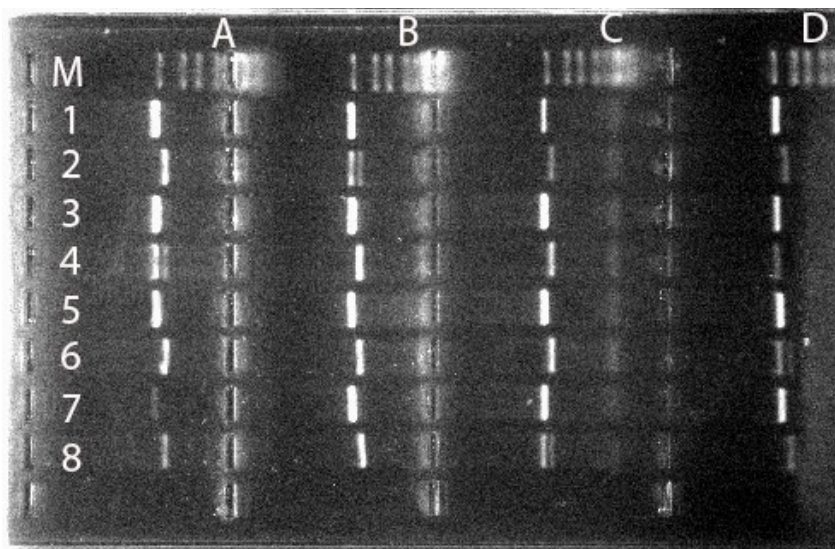


Рисунок 10 – Результат электрофоретического разделения продуктов рестрикции (на полиморфизм *rs1800450*) ампликонов, полученных при проведении ПЦР гена *MBL2*: А, В, С и D – обозначения дорожек; цифрами обозначены: нечетными – ПЦР-продукты, четными – продукты после рестрикции; М – маркер (слева направо: 300; 200; 150; 100; 75; 50; 35; 25; 20; 15; 10 п.н.); в лунках 2, 6 и 8 дорожки А, 4, 6 и 8 дорожки В, 2, 4 и 6 дорожки С, 2 и 8 дорожки D – генотип *GG*; в лунках 4 дорожки А, 2 дорожки В, 8 дорожки С, 6 дорожки D – генотип *GA*; в лунке 4 дорожки D – генотип *AA*

Гомозиготы по нормальному аллелю (генотип *GG*) по полиморфизму *rs2293152* гена *STAT3* не имеют сайта рестрикции для рестриктазы *HpaII*, соответственно на электрофореграмме выявляется один фрагмент размером 233 п.н. Гомозиготы по мутантному аллелю (генотип *CC*) в обеих копиях гена имеют сайт рестрикции - на электрофореграмме выявляются два рестрикционных фрагмента. Гетерозиготы по *rs2293152* гена *STAT3* (генотип *GC*) дают три типа продуктов (рис. 11).

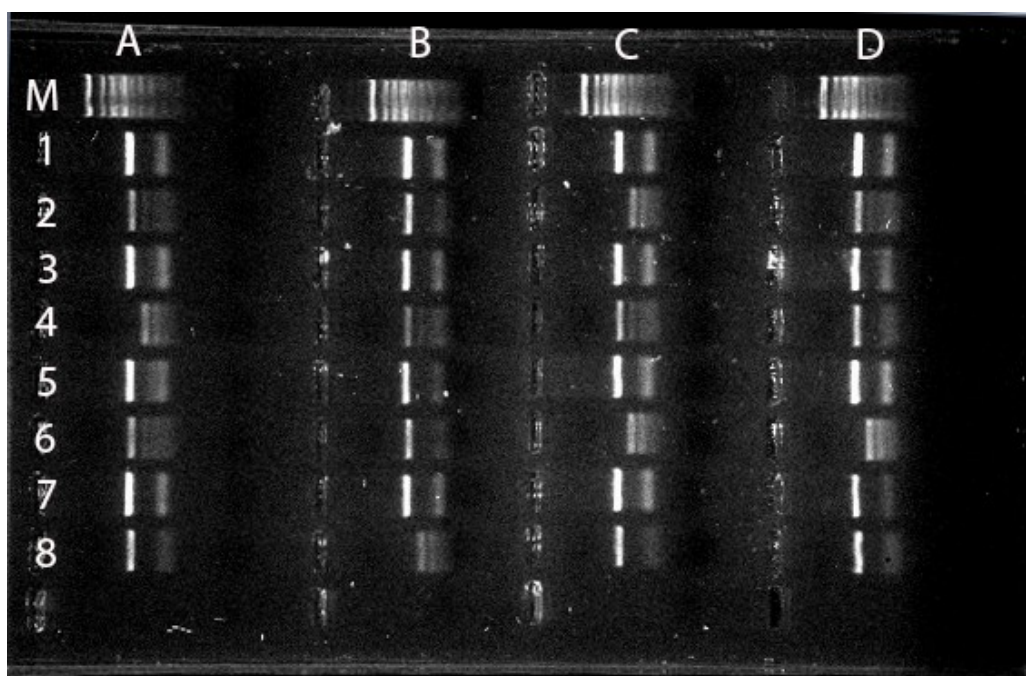


Рисунок 11 - Результат электрофоретического разделения продуктов рестрикции (на полиморфизм *rs2293152*) ампликонов, полученных при проведении ПЦР гена *STAT3*: А, В, С и D - обозначения дорожек; цифрами обозначены: нечетными - ПЦР-продукты, четными - продукты после рестрикции; М - маркер (слева направо: 700; 500; 400; 350; 300; 250; 200; 150; 100; 50); в лунках 8 дорожки А, 2 и 6 дорожки В, 8 дорожки С, 4 и 8 дорожки D - генотип *GG*; в лунках 2 и 6 дорожки А, 4 дорожки В, 4 дорожки С, 2 дорожки D - генотип

GS; в лунках 4 дорожки A, 8 дорожки B, 2 и 6 дорожки C, 6 дорожки D – генотип CC

2.3 Методы статистического анализа результатов

Данные обрабатывали статистически с помощью закона Харди-Вайнберга и критерия χ^2 . Полученные результаты обрабатывали, применяя программы для статистической обработки данных с использованием электронных калькуляторов «Харди-Вайнберг калькулятор» (<http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>) и «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях случай-контроль» (<http://gen-exp.ru/index.html>).

Анализ межгенных взаимодействий был проведен с помощью метода сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR). Данный метод основан на изучении и оценке взаимодействий полиморфизмов и выведении новых собирательных переменных на основе суммарных сочетаний генотипов, связанных с повышенным либо пониженным риском развития заболевания. В результате строятся модели, показывающие взаимодействия между всеми возможными вариантами генотипов анализируемых полиморфизмов. Для каждой модели рассчитываются воспроизводимость модели и точность предсказания, по значениям которых выбирается наилучшая модель.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анализ частот генотипов и аллелей по полиморфизму *rs2293152* гена *STAT3*

Белок *STAT3* является транскрипционным фактором, играющим ключевую роль в сигнальном пути JAK/STAT. Он участвует в передаче сигнала от широкого спектра факторов роста и цитокинов. Полиморфизмы в гене *STAT3* могут привести к нарушениям в работе иммунной системы, а также повлиять на транскрипционную активность генов многих молекул, в том числе, онкогенов.

Распределение частот генотипов и аллелей по полиморфизму *rs2293152* гена *STAT3* в обеих группах

обследуемых соответствует равновесию Харди-Вайнберга (табл. 2).

Таблица 2 - Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *rs2293152* в гене *STAT3* среди обследуемых, инфицированных ВГВ и без вируса (контрольная группа)

Аллели	ВГВ	Контроль	χ^2	p	OR	
	n = 47	n = 52			знач.	95 % CI
Аллель С	0.660	0.587	1.12	0.29	1.37	0.77 - 2.43
Аллель G	0.340	0.413			0.73	0.41 - 1.31
Генотипы						
C/C	0.489	0.404	0.90	0.64	1.41	0.64 - 3.14
C/G	0.340	0.365			0.90	0.39 - 2.05
G/G	0.170	0.231			0.68	0.25 - 1.85
PXB	2.75	3.16	-			

Примечание: PXB - Равновесие Харди-Вайнберга

В таблице 2 представлены частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *rs2293152* гена *STAT3* среди обследуемых, инфицированных ВГВ, и без вируса. Исходя из данных таблицы видно, что в исследуемых группах преобладают гомозиготы по аллели С. В группе инфицированных ВГВ частота генотипа C/C составляет 49 %, а в контрольной группе - 40 %. Частота гетерозигот в группе инфицированных ВГВ составляет 34 %, а в контрольной группе - 36,5 %. Частота встречаемости генотипа G/G в группе инфицированных ВГВ составляет 17 %, а в

контрольной группе - 23 %. При этом, частота аллеля G в группе инфицированных ВГВ составляет 34%, в контрольной группе - 41%; частота аллеля C в группе инфицированных ВГВ составляет 66%, в контрольной группе - 59% (табл. 2).

Таким образом, в ходе исследования статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей по полиморфизму *rs2293152* гена *STAT3* между двумя группами обследуемых не было обнаружено. Следовательно, взаимосвязи полиморфизма *rs2293152* в гене *STAT3* с риском развития гепатита В у жителей Ростова-на-Дону не обнаружено.

В исследовании Дж. Кси с соавторами (Xie J. et al., 2013) была показана положительная корреляция полиморфизма *rs2293152* гена *STAT3* с высокой вирусной нагрузкой при гепатите В, а также с развитием ГЦК. В данном исследовании было проанализировано всего 3023 образца, среди которых 2011 образцов пациентов, инфицированных ВГВ, включая пациентов с ГЦК (1021), остальные составили контроль. Всего было исследовано три полиморфизма гена *STAT3*, включая *rs2293152*. Полиморфизмы были генотипированы с помощью ПЦР в реальном времени. Было установлено, что *rs2293152* присутствует в значительно большем количестве у пациентов с ГЦК, чем без карциномы, причем его влияние было намного выше для женщин.

Однако в других исследованиях показано, что такая зависимость встречается не во всех популяциях. Так, Н. Чантра с коллегами (Chanthra N. et al., 2015) проводили исследование сначала для китайской популяции и обнаружили, что полиморфизм *rs2293152* гена *STAT3* ассоциирован с хроническим ВГВ и риском развития ГЦК. Однако в

последующем исследовании связи данного полиморфизма с ВГВ и ГЦК для тайской популяции были получены другие результаты. Всего было исследовано 582 образца, среди которых 392 образца пациентов, инфицированных ВГВ, у 200 к тому же присутствует ГЦК. Исследуемые полиморфизмы были генотипированы с использованием методов полимеразной цепной реакции - полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. Статистическая обработка данных показала, что распределение различных генотипов для полиморфизма *rs2293152* соответствовало равновесию Харди-Вайнберга ($P > 0,05$). При этом никакой существенной корреляции между данным полиморфизмом и ГЦК не наблюдалось.

В работе Дж.-В. Као (Сао G.-W., 2017) также упоминается ассоциация полиморфизма *rs2293152* с высокой вирусной нагрузкой при гепатите В, а также развитием ГЦК.

Для популяций европеоидов исследований, направленных на выявление связи ВГВ с вышеуказанным SNP, не проводилось.

3.2 Анализ частот генотипов и аллелей по полиморфизму *rs1800451* гена *MBL2*

МСЛ - главный белок-активатор системы комплемента по лектиновому пути. Он играет важную роль в уничтожении патогенов различной природы. Наличие полиморфизмов в гене *MBL2* приводит к нарушению экспрессии гена и снижению концентрации белка в сыворотке крови, что может привести к повышению уязвимости организма по отношению к различного рода патогенам.

Распределение частот генотипов и аллелей по полиморфизму *rs1800451* гена *MBL2* среди обеих групп обследуемых соответствует равновесию Харди-Вайнберга (табл. 3).

Таблица 3 - Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *rs1800451* гена *MBL2* среди обследуемых, инфицированных ВГВ, и без вируса (контрольная группа)

Аллели	ВГВ	Контроль	χ^2	p	OR	
	n = 47	n = 52			знач.	95 % CI
Аллель G	1.000	1.000	0.00	1	0.90	0.02 - 46.03
Аллель A	0.000	0.000			1.11	0.02 - 56.29
Генотипы						
G/G	1.000	1.000	0.00	1	0.90	0.02 - 46.50
G/A	0.000	0.000			1.11	0.02 - 56.81
A/A	0.000	0.000			1.11	0.02 - 56.81
PXB	0.00	0.00	-			

Примечание: PXB - Равновесие Харди-Вайнберга

В таблице 3 представлены частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *rs1800451* гена *MBL2* среди обследуемых, инфицированных ВГВ, и без вируса. Исходя из данных таблицы видно, что в исследуемых группах представлены только гомозиготы по нормальной аллели. Следовательно, ассоциации полиморфизма *rs1800451* гена *MBL2* с риском развития гепатита В у жителей Ростова-на-Дону не обнаружено.

Результаты нашего исследования подтверждают крайне низкую частоту полиморфизма *rs1800451* гена *MBL2* среди европеоидов, показанную в исследованиях других авторов. Так, ещё в 1994 году Х. Мэдсен с соавторами (Madsen H.O. et al., 1994) показали, что частота мутации в кодоне 57 гена *MBL2* в европейской популяции составляет всего 0.02.

Однако в России проводились только единичные исследования данного полиморфизма, что делает необходимость анализа его частоты и связи с различными патологическими состояниями актуальным. По данным Р. Липскомб (Lipscombe R.J. et al., 1993) с коллегами полиморфизм *rs1800451*, вероятнее всего, приводит к нарушению вторичной структуры тройной спирали коллагенподобного домена МСЛ. Соответственно, как гомозиготы, так и гетерозиготы в таком случае будут иметь сниженную концентрацию МСЛ в сыворотке крови, что было подтверждено иммуноанализом. Поэтому данный полиморфизм связан с различными заболеваниями, такими как туберкулез, гепатиты В и С, ревматоидный артрит и другие.

3.3 Анализ частот генотипов и аллелей по полиморфизму *rs1800450* гена *MBL2*

Распределение частот генотипов и аллелей по полиморфизму *rs1800450* гена *MBL2* в обеих группах обследуемых соответствует равновесию Харди-Вайнберга (табл. 4).

Таблица 4 – Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *rs1800450* гена *MBL2* среди обследуемых, инфицированных ВГВ, и без вируса (контрольная группа)

Аллели	ВГВ	Контроль	χ^2	p	OR	
	n = 47	n = 52			знач.	95 % CI
Аллель G	0.745	0.885	6.50	0.01	0.38	0.18 - 0.81
Аллель A	0.255	0.115			2.63	1.23 - 5.62
Генотипы						
G/G	0.574	0.769	6.86	0.03	0.41	0.17 - 0.96
G/A	0.340	0.231			1.72	0.71 - 4.16
A/A	0.085	0.000			10.86	0.57 - 207.39
PXB	0.52	0.88	-			

Примечание: PXB - Равновесие Харди-Вайнберга

В таблице 4 представлены частоты генотипов и аллелей по полиморфизму *rs1800450* гена *MBL2* среди обследуемых, инфицированных ВГВ, и без вируса. Исходя из данных таблицы видно, что в исследуемых группах преобладают гомозиготы по аллели G. В группе инфицированных ВГВ частота генотипа G/G составляет 57 %, а в контрольной группе - 78 %. Частота гетерозигот в группе инфицированных ВГВ составляет 34 %, а в контрольной группе - 23 %. Частота встречаемости генотипа A/A в группе инфицированных ВГВ составляет 8,5 %, в контрольной же группе данный генотип не обнаружен. При этом частота аллеля G в группе инфицированных ВГВ составляет 74,5%, в контрольной группе - 88,5%; частота аллеля A в группе инфицированных ВГВ составляет 25,5%, в контрольной группе - 11,5% (табл. 4).

В ходе исследования обнаружены статистически значимые различия частот аллелей по полиморфизму *rs1800450* гена *MBL2* в двух представленных группах. Причем для аллели А наблюдается ассоциация с повышенным риском развития ВГВ, поскольку OR составил для нее 2.63, а для аллели G OR составляет 0.38, так что данная аллель ассоциирована со снижением риска развития ВГВ.

Статистически значимые различия обнаружены и для частот генотипов по исследуемому полиморфизму гена *MBL2* между двумя сравниваемыми группами лиц. Если в контрольной группе не было выявлено ни одного человека, гомозиготного по аллели А, то среди больных гепатитом В данный генотип встречается с частотой 8,5% (табл. 4). Можно также отметить, что генотип *G/G* снижает риск развития гепатита В – OR имеет значение 0.41. Таким образом, данный генотип обладает защитным эффектом.

В 2016 году К. Гу (Gu X. et al., 2016) с коллегами было проведено исследование двух полиморфизмов гена *MBL2*, включая *rs1800450*, среди лиц азиатской популяции с целью выявления связи SNP с патологиями МСЛ и, как следствие, с предрасположенностью к развитию гепатита В. Исследование проводилось на 735 образцах, из которых 171 образец составил контрольную группу, остальные были взяты у людей с различными формами ВГВ и заболеваниями печени, вызванными этим вирусом. Генотипирование проводили с помощью метода ПЦР с последующей лигазной детекцией. При этом репрезентативные ПЦР-продукты подвергались также прямому секвенированию. В результате исследования была установлена четкая связь данного полиморфизма с низким

уровнем МСЛ, а также с риском развития цирроза печени и ГЦК после ВГВ инфекции.

Подобные исследования проводились для африканской популяции (Bellamy R. et al., 1998), где ассоциации полиморфизма *rs1800450* гена *MBL2* выявлено не было. Для популяции европеоидов исследования, направленные на выявление связи данного полиморфизма с риском развития гепатита В, проводились, однако их количество слишком мало, а результаты требуют дальнейших уточнений (Comuzzi F., 2017; Moura T.C.F. et al., 2017).

Кроме того, четко установлена ассоциация полиморфизма *rs1800450* гена *MBL2* с туберкулезом в различных популяциях (Da Cruz H.L.A. et al., 2013; Hijikata M. et al., 2014; Areeshi M.Y. et al., 2016), есть единичные данные, свидетельствующие об ассоциации данного полиморфизма с волчанкой и гепатитом С (Lee Y.H. et al., 2005; Gauthiez E. et al., 2017).

3.4 Анализ межгенного взаимодействия манноз-связывающего лектина и транскрипционного фактора STAT3 при ВГВ-инфекции

При сравнении инфицированной ВГВ группой пациентов и контрольной группой для полиморфизмов *rs1800450* и *rs1800451* гена *MBL2* статистически значимых различий выявлено не было, для полиморфизма *rs2293152* гена *STAT3* были выявлены статистически значимые различия в частотах аллелей и генотипов между этими двумя группами. Для анализа суммарного вклада аллельных вариантов вышеупомянутых генов был проведен анализ межгенных взаимодействий с помощью метода сокращения

многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR). Причем проанализированы были только два полиморфизма: *rs1800450* гена *MBL2* и *rs2293152* гена *STAT3*, так как при исследовании полиморфизма *rs1800451* гена *MBL2* все пациенты оказались гомозиготными по нормальной аллели.

По результатам проведенного анализа межгенного взаимодействия при ВГВ-инфекции была получена статистически значимая двухлокусная модель «*STAT3_rs2293152, MBL2_rs1800450*» с максимальной воспроизводимостью – 10/10 и точностью предсказания 0,6 (табл. 5).

Таблица 5 – Модель межгенного взаимодействия среди исследуемых групп пациентов с ВГВ-инфекцией и без нее, полученная с помощью программы MDR

Комбинации генов в модели	Тестируемое взаимодействие генов	Воспроизводимость модели	χ^2 (p)	OR
<i>STAT3_rs2293152, MBL2_rs1800450</i>	0.6	10/10	4,2 (0,04)	2,36 (1,03-5,39)

Исходя из модели распределения частот двухлокусного взаимодействия генов *STAT3* и *MBL2*, можно сделать вывод, что полиморфные варианты гена *STAT3* понижают риск развития ВГВ при сочетании с гомозиготностью по норме *rs1800450* гена *MBL2* (рис. 12).

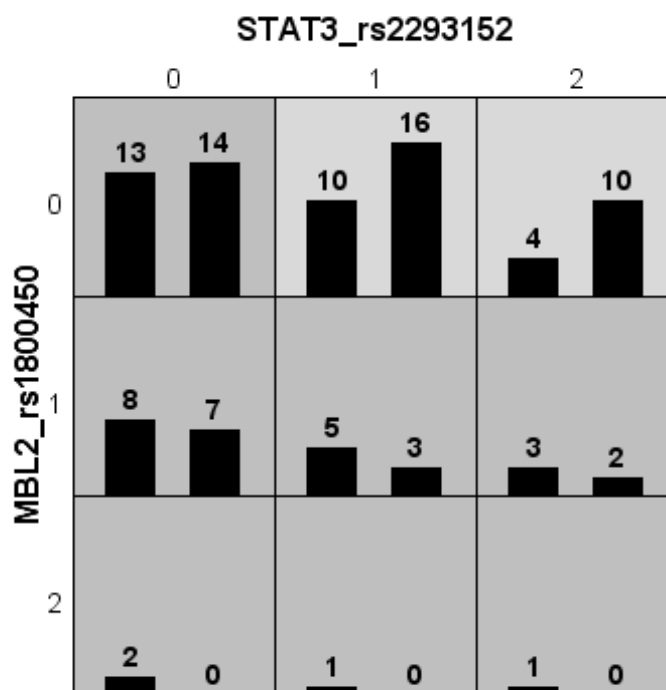


Рисунок 12 – Распределение частот двухлокусных сочетаний генотипов генов *STAT3* и *MBL2* в группе инфицированных ВГВ и контрольной: темно-серые ячейки демонстрируют генотипы повышенного риска, светло-серые – пониженного риска, левые столбики в ячейках – инфицированные ВГВ, правые столбики – контроль, 0 – гомозиготы по нормальной аллели, 1 – гетерозиготы, 2 – гомозиготы по мутантной аллели

Комбинированные генотипы *G/G* и *C/G* *rs2293152* *STAT3* / *G/G* *rs1800450* *MBL2* являются потенциальными генотипами с защитным эффектом при гепатите В. Остальные комбинации генотипов повышают риск развития гепатита В.

Анализ уровня энтропии показал, что полиморфизм *rs1800450* гена *MBL2* вносит основной вклад в повышение риска развития гепатита В при комбинации генотипов исследуемых генов (энтропия 6,12%), причем, как видно из графика межгенных взаимодействий, характер взаимосвязи внутри модели – антагонизм (рис. 13).

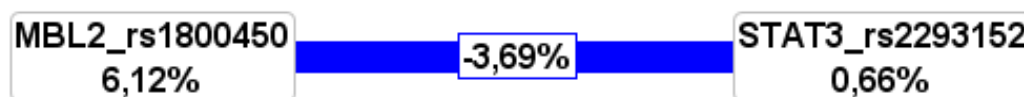


Рисунок 13 – Графическое изображение взаимодействия полиморфизмов изучаемых генов при ВГВ: в центральной ячейке в процентах указано значение межфакторной энтропии, а в боковых ячейках – уровень энтропии для соответствующего полиморфизма; знак перед числом в центральной ячейке указывает на характер взаимосвязей внутри модели (синергизм/ антагонизм)

Таким образом, в результате исследования установлен снижающий эффект риска развития ВГВ полиморфизма гена *STAT3* при комбинированном взаимодействии с геном *MBL2*.

Известно, что *STAT3* способен специфически связываться с геном сериновой протеазы *MASP2*, способствуя его экспрессии (Unterberger C. et al., 2007). *MASP2* является эффекторным компонентом лектинового пути, способствует опсонизации комплекса МСЛ-ПАМП. При наличии полиморфизма *rs1800450* в гене *MBL2* экспрессия белка нарушается и, соответственно, снижается эффективность лектинового пути. Этот эффект, по-видимому, можно снизить при повышенной экспрессии сериновых протеаз, в том числе и *MASP2*. Так как полиморфизм *rs2293152* гена *STAT3* приводит к неконтролируемой транскрипции онкогенов (Chanthra N. et al., 2015), то, возможно, повышается его транскрипционная активность и по отношению к *MASP2*, что ведет к повышению концентрации данной сериновой протеазы. Можно предположить, что объяснением межгенного взаимодействия

STAT3 и *MBL2* со снижением риска развития гепатита В является описанный механизм.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены статистически значимые различия в частотах генотипов и аллелей по полиморфизму *rs1800450* гена *MBL2* при сравнении группы инфицированных ВГВ и контрольной группы. Исходя из полученных данных, аллель А ($p=0.01$; $OR=2.63$ (1.23 - 5.62)) ассоциирована с высоким риском развития гепатита В, а наличие генотипа *GG* снижает такой риск, обладая защитным эффектом ($OR=0.41$ (0.17 - 0.96)).

2. Ассоциации полиморфизма *rs2293152* гена *STAT3* с риском развития гепатита В в исследуемых группах выявлено не было.

3. Ассоциации полиморфизма *rs1800451* гена *MBL2* с риском развития гепатита В в исследуемых группах выявлено не было. Во всех проанализированных образцах были обнаружены только гомозиготы по нормальной аллели.

4. По результатам анализа межгенных взаимодействий установлено, что взаимодействие полиморфных вариантов гена *STAT3* с гомозиготным по норме вариантом гена *MBL2* снижает риск развития гепатита В.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. База данных 1000 Genomes –
<http://www.internationalgenome.org/>
2. База данных – SNPedia –
<https://www.snpedia.com/index.php/SNPedia>
3. Балабина Н.М. Цирроз печени: диагностика, лечение, профилактика и экспертиза трудоспособности в амбулаторной практике. - Иркутск: ИГМУ, 2017. - 134 с.
4. Берлов М.Н., Шехова Е.А., Соколов А.В., Филимонов В.Б., Кокряков В.Н. Взаимодействие маннозо-связывающего лектина и миелопероксидазы // Вестник Санкт-Петербургского университета. - 2011. - Сер. 3 Вып. 4. - С. 63-72.
5. Герасимова В.В., Левакова И.А., Бичурина М.А., Максимова Н.Р. Молекулярно-эпидемиологические особенности вирусного гепатита В // Инфекция и иммунитет. - 2015. - Т. 5 № 4. - С. 297-302.
6. Герасун Б.А., Грицко Р.Ю., Герасун А.Б., Малинникова Е.Ю., Михайлов М.И. Вирусные гепатиты в схемах, таблицах и рисунках. Руководство по проблеме вирусных гепатитов для врачей-интернов и слушателей ФПДО. - Львов: Кварт, 2012. - 122 с.
7. Гук К. Д., Купраш Д. В. Интерлейкин-11, член семейства IL-6-подобных цитокинов // Молекулярная биология. - 2011. - Т. 45 № 1. - С. 44-55.
8. Демиденко Т.П., Неверов В.А. Вирусные гепатиты: Пособие для врачей. - СПб.: 2011. - 229 с.

9. Еремеева Ж.Г., Минуллин И.К., Платонова О.В., Богданова Е.В., Фазылов В.Х. Диагностика и специфическая профилактика вирусного гепатита в в условиях специализированного лечебно-профилактического учреждения // Казанский медицинский журнал. - 2015. - №Том 96, № 6 . - С. 923-929.

10. Заплахова О.В., Тимашева Я.Р., Бахтиярова К.З., Туктарова И.А., Мустафина О.Е. Клинический и молекулярно-генетический анализ случая семейного рассеянного склероза в Республике Башкортостан // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2017. - №117 (2). - С. 31-41.

11. Колмогорова Е.Л., Красавцева А.В., Мурзина О.Ю. Острый вирусный гепатит в (краткий литературный обзор) // Сборник научных трудов по материалам I международной научно-практической конференции: «Современные технологии в науке и образовании: проблемы, достижения, перспективы», 15 декабря 2016 г.: сборник трудов конференции. - Караганда: ООО «Вектор науки» , 2016. - С. 43-55.

12. Курманова Г.М. и др. Серологическая диагностика вирусных гепатитов В, С и D // Медицина. - 2013. - № 6. - С. 18-26.

13. Лопатина Е.Ю., Забозлаев Ф.Г., Верхотин А.А., Юдинцева Е.В., Бондаренко Н.Л. Внепеченочные поражения при хронических вирусных заболеваниях печени // Клиническая практика. - 2010. - №Том 1, № 2. - С. 47-51.

14. Львов Д.К. и др. Медицинская вирусология: Руководство / Под ред. Д.К. Львова. - М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2008. - 253-259 с.

15. Малеев В.В., Ситников И.Г., Бохонов М.С. Вопросы гепатологии: учебное пособие / под ред. В.В. Малеева – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2016. – 367 с.

16. Мануйлов В.А., Осипова Л.П., Нетесова И.Г., Чуб Е.В., Безуглова Л.В., Norder H., Magnus L.O., Нетесов С.В. Распространенность различных генотипов и субтипов HBs-антигена вируса гепатита В в группах коренного населения Сибири // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2015. - №1. – С. 28-34.

17. Ратникова Л.И., Миронов И.Л., Лаврентьева Н.Н., Конькова-Рейдман А.Б., Пермитина М.И., Елисеев В.А., Тер-Багдасарян Л.В., Ермакова Н.В., Бондаренко В.В., Дубовикова Т.А., Шип С.А. Вирусные гепатиты. - Челябинск: 2013. – 67 с.

18. Рахманова А.Г., Александров П.А., Шаройко В.В. Оккультный гепатит В, его роль в распространении инфекции и развитии гепатоцеллюлярной карциномы (обзор) // Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Emergency Situations. – 2015. - № 3. – С. 78-87.

19. Смольникова М.В., Епанешникова В.Б., Терещенко С.Ю. Этнически ассоциированные факторы риска высокого уровня младенческой смертности у детей коренного населения крайнего севера: исследование генетической предрасположенности (MBL2, FCN2) к инфекционным заболеваниям // Медицинская иммунология. - 2017. - Т. 19. - С. 82-83.

20. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. – Спб., 1997. – 42 с.

21. Учайкин В.Ф., Чередниченко Т.В., Смирнов А.В. Инфекционная гепатология: Руководство для врачей — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 155 с.
22. Шапошников А.В., Комарьков И.Ф., Лебедева Л.А., Шидловский Ю.В. Строение сигнального пути JAK/STAT и его взаимосвязь с аппаратом транскрипции // Молекулярная биология. - 2013. - Т. 47 № 3. - С. 388-397.
23. Ющук Н.Д., Климова Е.А., Знойко О.О., Кареткина Г.Н., Максимов С.Л., Маев И.В. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 160 с.
24. Ярилин А.А. Основы иммунологии: Учебник. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 752 с.
25. Areeshi M.Y., Mandal R.K., Akhter N., Dar S.A., Jawed A., Wahid M., Mahto H., Panda A.K., Lohani M., Haque S. A Meta-analysis of MBL2 Polymorphisms and Tuberculosis Risk // Scientific Reports. - 2016. - №6. - P. 1-22.
26. Arora L., Kumar A.P., Arfuso F., Chng W.J., Sethi G. The Role of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) and Its Targeted Inhibition in Hematological Malignancies // Cancers. - 2018. - Vol. 10 № 9. - P. 1-17.
27. Bellamy R., Ruwende C., McAdam K.P., Thursz M., Sumiya M., Summerfield J., Gilbert S.C., Corrah T., Kwiatkowski D., Whittle H.C., Hill A.V. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. // QJM. - 1998. - №Vol. 91 №1. - P. 13-18.
28. Beltrame M.H., Boldt A.B.W., Catarino S.J., Mendes H.C., Boschmann S.E., Goeldner I., Messias-Reason I. MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases // Molecular Immunology. - 2015. - Vol. 67 № 1. - P. 85-100.

29. Burrell C.J., Chisari F.V., Gerlich W.H. et al. Hepadnaviridae. // In: Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. - San Diego: Academic Press, 1999. - p. 325-374.

30. Cao G.-W. Cancer Evo-Dev, a novel hypothesis derived from studies on hepatitis B virus-induced carcinogenesis // Hepatoma Research . - 2017. - №3. - C. 241-259.

31. Chanthra N., Payungporn S., Chuaypen N., Piratanantatavorn K., Pinjaroen N., Poovorawan Y., Tangkijvanich P. Single Nucleotide polymorphisms in STAT3 and STAT4 and risk of hepatocellular carcinoma in Thai patients with chronic hepatitis B // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. - 2015. - Vol. 16 № 18. - P. 8405-8410.

32. Comuzzi F. Host genetic polymorphisms and chronic hepatitis B: a systematic review and metaanalysis: Master thesis N°3373 Medicine - Lausanne, 2017. - 23 p.

33. Da Cruz H.L.A., Da Silva R.c., Segat L., Carvalho M.S.Z.M.G., Brandão L.A.C., Guimarães R.L., Santos F.C.F., Lira L.A.S., Montenegro L.M.L., Schindler H.C., Crovella S. MBL2 gene polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in a northeastern Brazilian population // Infection, Genetics and Evolution . - 2013. - №19. - P. 323-329.

34. Eisen D.P., Minchinton R.M. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases // Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America . - 2003. - Vol. 37 № 11. - P. 1496-1505.

35. Fathi N., Rashdi G., Khodadadi A., Shahi S., Sharifi S. STAT3 and apoptosis challenges in cancer // International Journal of Biological Macromolecules. - 2018. - №117. - P. 993-1001.

36. Fujita T., Matsushita M., Endo Y. The lectin-complement pathway - its role in innate immunity and evolution // Immunological Reviews. - 2004. - Vol. 198 № 1. - P. 185-202.

37. Garred P., Genster N., Pilely K., Bayarri-Olmos R., Rosbjerg A., Ma Y.J., Skjoedt M.-O. A journey through the lectin pathway of complement - MBL and beyond // Immunological Reviews. - 2016. - Vol. 274 № 1. - P. 74-97.

38. Gauthiez E., Habfast-Robertson I., Rüeger S., Kutalik Z., Aubert V., Berg T., Cerny A., Gorgievski M., George J., Heim M.H., Malinverni R., Moradpour D., Müllhaupt B., Negro F., Semela D., Semmo N., Villard J., Bibert S., Bochud P.-Y. A systematic review and meta-analysis of HCV clearance // Liver International. - 2017. - Vol. 37 № 10. - P. 1431-1445.

39. Gu X., Ji Q., Wang H., Jiang M., Yang J., Fang M., Wang M., Gao C. Genetic variants of mannose-binding lectin 2 gene influence progression and prognosis of patients with hepatitis B virus infection in China // CLINRE. - 2016. - Vol. 40 № 5. - P. 614-621.

40. Hijikata M., Matsushita I., Hang N.T.L., Maeda S., Thuong P.H., Tam D.B., Shimbo T., Sakurada S., Cuong V.C., Lien L., Keicho N. Age-dependent association of mannose-binding lectin polymorphisms with the development of pulmonary tuberculosis in Viet Nam // Human Immunology. - 2014. - Vol. 72 № 8. - P. 840-846.

41. Jensenius H., Klein D.C.G., van Hecke M., Oosterkamp T.H., Schmidt T., Jensenius J.C. Mannan-binding lectin: structure, oligomerization and flexibility studied by atomic force microscopy // JMB. - 2009. - Vol. 391 № 1. - P. 246-259.

42. Jensenius J. C. The mannan-binding lectin (MBL) pathway of complement activation: biochemistry, biology and

clinical implications // *Glycobiology and Medicine*. - 2005. - P. 21-22.

43. Kalia N., Sharma A., Kaur M., Kamboj S.S., Singh J. A comprehensive in silico analysis of non-synonymous and regulatory SNPs of human MBL2 gene // *SpringerPlus*. - 2016. - №5:811. - P. 1-14.

44. Kim C.Y., Tilles J.G. Purification and biophysical characterization of hepatitis B antigen // *J. Clin. Invest.* - 1970. - №52. - p. 1176-1186

45. Lee Y.H., Witte T., Momot T., Schmidt R.E., Kaufman K.M., Harley J.B., Sestak A.L. The mannose-binding lectin gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: Two case-control studies and a meta-analysis // *Arthritis and Rheumatology*. - 2005. - Vol. 52 № 12. - C. 3966-3974.

46. Levy D.E., Lee C. What does Stat3 do? // *JCI*. - 2002. - Vol. 109 № 9. - P. 1143-1148.

47. Li M., Li F., Li N., Sang N., Fan X., Deng H., Zhang X., Han Q., Lv Y., Liu Z. Association of polymorphism rs1053005 in STAT3 with chronic hepatitis B virus infection in Han Chinese population // *BMC Medical Genetics*. - 2018. - Vol. 19 № 1. - P. 1-8.

48. Lipscombe R.J., Sumiya M., Hill A.V., Lau Y.L., Levinsky R.J., Summerfield J.A., Turner M.W. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. // *Hum Mol Genet*. - 1993. - №2 (3). - P. 342.

49. Lundbo L.F., Sørensen H.T., Clausen L.N., Hollegaard M.V., Hougaard D.M., Konradsen H.B., Harboe Z.B., Nørgaard M., Benfield T. Mannose-Binding Lectin Gene, MBL2, Polymorphisms Do Not Increase Susceptibility to Invasive Meningococcal Disease

in a Population of Danish Children // OFID. - 2015. - Vol. 2 № 4. - P. 1-6.

50. Madsen H.O., Garred P., Kurtzhals J.A., Lamm L.U., Ryder L.P., Thiel S., Svejgaard A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. // Immunogenetics. - 1994. - №40 (1). - P. 37-44.

51. Malhotra R., Haurum, J., Thiel, S., Sim, R.B. Interaction of C1q-receptor (C1qR) with lung surfactant protein A (SP-A) // Eur. J. Immunol. - 1992. - № 22. - P. 1437-1445.

52. Moura T.C.F., Amoras E.S.G., Araújo M.S., Queiroz M.A.F., Conde S.R.S.S., Demachki S., Martins-Feitosa R.N., Machado L.F.A., Cayres-Vallinoto I.M.V., Ishak R., Vallinoto A.C.R. HBV Viral Load and Liver Enzyme Levels May Be Associated with the Wild MBL2 AA Genotype // Hindawi. Mediators of Inflammation. - 2017. - Vol. 2017. - P. 1-11.

53. Pradhan V., Surve P., Ghosh K. Mannose Binding Lectin (MBL) in Autoimmunity and its Role in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) // JAPI. - 2010. - Vol.58. - P. 688-690.

54. Pradhan V., Surve P., Rajadhyaksha A., Rajendran V., Patwardhan M., Umare V., Ghosh K., Nadkarni K. Mannose binding lectin (MBL) 2 gene polymorphisms and its association with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus (SLE) patients from western India // IJMR. - 2015. - Vol. 141 № 2. - p. 199-204.

55. Scorza M., Liguori R., Elce A., Salvatore F., Castaldo G. Biological role of mannose binding lectin: From newborns to centenarians // Clinica Chimica Acta. - 2015. - Vol. 451 Part A. - P. 78-81.

56. Shi Y., Zhang Z., Qu X., Zhu X., Zhao L., Wei R., Guo Q., Sun L., Yin X., Zhang Y., Li X. Roles of STAT3 in leukemia // *International Journal of Oncology*. - 2018. - Vol. 53 № 1. - P. 7-20.

57. Siegel A.M., Heimall J., Freeman A.F., Hsu A.P., Brittain E., Brenchley J.M., Douek D.C., Fahle G.H., Cohen J.I., Holland S.M., Milner J.D. A Critical Role for STAT3 Transcription Factor Signaling in the Development and Maintenance of Human T Cell Memory // *Immunity*. - 2011. - Vol. 35 №5. - P. 806-818.

58. Subramaniam A., Shanmugam M.K., Perumal E., Li F., Nachiyappan A., Dai X., Swamy S.N., Ahn K.S., Kumar A.P., Tan B.K.H., Hui K.M., Sethi G. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. - 2013. - Vol. 1835 № 1. - P. 46-60.

59. Takeda K., Noguchi K., Shi W., Tanaka T., Matsumoto M., Yoshida N., Kishimoto T., Akira S. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality // *PNAS*. - 1997. - Vol. 94 № 8. - P.3801-3804.

60. Unterberger C., Hanson S., Klingenhoff A., Oesterle D., Frankenberger M., Endo Y., Matsushita M., Fujita T., Schwaeble W., Weiss E.H., Ziegler-Heitbrock L., Stover C. Stat3 is involved in control of MASP2 gene expression // *BBRC*. - 2007. - №364. - P. 1022 - 1025.

61. Wake M.S., Watson C.J. STAT3 the oncogene – still eluding therapy? // *The FEBS Journal*. - 2015. - Vol. 282 №14. - P. 2600-2611.

62. Wang X., Du L., Wei H., Zhang A., Yang K., Zhou H. Identification of two Stat3 variants lacking a transactivation

domain in grass carp: New insights into alternative splicing in the modification of teleost Stat3 signaling // *Fish & Shellfish Immunology* . - 2018. - Vol. 77. - P. 13-21.

63. Xie J., Zhang Y., Zhang Q., Han Y., Yin J., Pu R., Shen Q., Lu W., Du Y., Zhao J., Han X., Zhang H., Cao G. Interaction of signal transducer and activator of transcription 3 polymorphisms with hepatitis B virus mutations in hepatocellular carcinoma // *Hepatology*. - 2013. - Vol. 57 № 6. - P. 2369-2377.

64. Zhang N., Zhuang M., Ma A., Wang G., Cheng P., Yang Y., Wang X., Zhang J., Chen X., Lu M. Association of Levels of Mannose-Binding Lectin and the MBL2 Gene with Type 2 Diabetes and Diabetic Nephropathy // *PLoS ONE*. - 2013. - Vol.8 №12. - P. 1-7.

65. Zhang X.-L., Ali Mohammed A.M. Ficolins: structure, function and associated diseases // *AEMB / Current Topics in Complement II*. - 2008. - Vol. 632. - P. 99-109.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Веропаха Д.Д. Исследование полиморфизма rs1800451 в гене MBL2 у больных гепатитом В // Материалы международного молодежного научного форума "Ломоносов-2018". - М.: МАКС Пресс, 2018.

2. Веропаха Д.Д. Ассоциация полиморфизма rs2293152 гена *STAT3* с риском развития гепатита В для жителей Ростова-на-Дону // Неделя науки 2019. - Ростов-на-Дону: Изд-во Южного Федерального Университета, 2019 (в печати).