

АНАЛИЗ СВЯЗИ УРОВНЯ TGF- β 1 В КРОВИ С НОСИТЕЛЬСТВОМ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ И ГАПЛОТИПОВ RS1800469 И RS1800470 ГЕНА *TGFB1* У ДЕТЕЙ – РЕЦИПИЕНТОВ ПЕЧЕНИ

Р.М. Курабекова¹, О.М. Цирульников^{1, 2}, О.Е. Гичкун^{1, 2}, И.Е. Пашкова¹,
О.П. Шевченко^{1, 2}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Цель: определить связь уровня TGF- β 1 в плазме крови детей – реципиентов печени до и после трансплантации с полиморфными аллелями и гаплотипами rs1800469 и rs1800470 гена *TGFB1*. **Материалы и методы.** В исследование включено 135 детей – реципиентов печени в возрасте от 3 до 98,4 мес. (8,2 года), медиана составила 8 месяцев. Группа сравнения состояла из 77 здоровых лиц в возрасте $30,3 \pm 5,2$ года. TGF- β 1 измеряли в плазме крови с помощью ИФА. Полиморфные локусы rs1800469 и rs1800470 гена *TGFB1* определяли в геномной ДНК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью зондов TaqMan. **Результаты.** Содержание TGF- β 1 в крови у детей – реципиентов печени до трансплантации составило 4,6 (1,1–9,5) нг/мл. Через месяц и год после трансплантации уровень цитокина вырос до 6,3 (1,7–15,0), $p = 0,008$ и 7,0 (1,9–13,5) нг/мл, $p = 0,0001$ соответственно. У здоровых взрослых уровень TGF- β 1 был достоверно выше, чем у детей – 11,7 (6,4–16,9) нг/мл, $p = 0,0000$. Частоты распределения каждого из полиморфных аллелей rs1800469 и rs1800470 у детей – реципиентов печени не отличались от таковых у здоровых лиц, тогда как встречаемость редких гаплотипов Т-Т и С-С была достоверно выше у детей-реципиентов. Уровни TGF- β 1 у детей-реципиентов до и через месяц после трансплантации печени не зависели от носительства исследованных аллелей и их гаплотипов. Через год после трансплантации печени более высокий уровень TGF- β 1 у реципиентов был связан с основными аллелями – С (С/С + С/Т) rs1800469 и Т/Т rs1800470, а также с гаплотипом Т-Т. У здоровых лиц содержание TGF- β 1 не зависело от аллелей rs1800469 и rs1800470 по отдельности, высокий уровень цитокина был связан с гаплотипом С-С. **Заключение.** У детей – реципиентов печени высокое содержание TGF- β 1 через год после трансплантации печени связано с носительством основных аллелей – С rs1800469 и Т rs1800470, а также с гаплотипом Т-Т гена *TGFB1*, что позволяет предполагать влияние данных полиморфных локусов на развитие посттрансплантационных осложнений и возможность их использования в качестве маркеров для прогнозирования клинических исходов трансплантации.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, профиброгенный цитокин, врожденные болезни печени, атрезия и гипоплазия желчевыводящих путей.

Для корреспонденции: Курабекова Ривада Мусабековна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 190-53-41. E-mail: kourabr@yandex.ru

Corresponding author: Rivada Kurabekova. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (499) 190-53-41. E-mail: kourabr@yandex.ru

ASSOCIATION OF PLASMA TGF- β 1 LEVELS WITH POLYMORPHIC LOCI AND *TGFB1* HAPLOTYPES RS1800469 AND RS1800470 IN PEDIATRIC LIVER TRANSPLANT RECIPIENTS

R.M. Kurabekova¹, O.M. Tsirulnikova^{1, 2}, O.E. Gichkun^{1, 2}, I.E. Pashkova¹,
O.P. Shevchenko^{1, 2}

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

Objective: to investigate the association between plasma TGF- β 1 levels in pediatric liver transplant (LT) recipients, both pre- and post-transplantation, and the polymorphic alleles and haplotypes at rs1800469 and rs1800470 loci of the *TGFB1* gene. **Materials and methods.** The study cohort comprised 135 pediatric LT recipients, aged 3 to 98.4 months (mean age 8.2 years, median 8 months). The control group consisted of 77 healthy individuals, aged 30.3 $\pm$ 5.2 years. Plasma TGF- β 1 levels were quantified using ELISA. Genomic DNA from participants was analyzed for the polymorphic loci rs1800469 and rs1800470 of the *TGFB1* gene using real-time polymerase chain reaction PCR with TaqMan probes. **Results.** Blood TGF- β 1 level in pediatric LT recipients pre-transplant was 4.6 (1.1–9.5) ng/mL. One month post-transplant, cytokine level increased to 6.3 (1.7–15.0) ng/mL ($p = 0.008$), and after one year, it rose further to 7.0 (1.9–13.5) ng/mL ($p = 0.0001$). Healthy adults had significantly higher TGF- β 1 levels, with a median of 11.7 (6.4–16.9) ng/mL ($p = 0.0000$), compared to pediatric recipients. The distribution frequencies of the rs1800469 and rs1800470 polymorphic alleles in pediatric LT recipients did not significantly differ from those in healthy individuals. However, the occurrence of rare haplotypes (T-T and C-C) was significantly higher in pediatric recipients. Before transplantation and 1 month after the procedure, TGF- β 1 levels in pediatric recipients were not associated with the carriage of the studied alleles or haplotypes. However, at 1-year post-transplant, higher TGF- β 1 levels in pediatric recipients were significantly associated with the major alleles (C/C + C/T) of rs1800469 and the rs1800470 T/T genotype, as well as with the T-T haplotype. In healthy individuals, TGF- β 1 levels were not influenced by the rs1800469 and rs1800470 alleles individually, but high cytokine levels were associated with the C-C haplotype. **Conclusion.** In pediatric LT recipients, elevated TGF- β 1 levels at 1-year post-transplant are associated with the presence of the major alleles C (rs1800469) and T (rs1800470), as well as the T-T haplotype of the *TGFB1* gene. This suggests that these polymorphic loci may influence the development of post-transplant complications and could potentially serve as biomarkers for predicting clinical outcomes in LT.

Keywords: single nucleotide polymorphism, profibrogenic cytokine, congenital liver diseases, biliary atresia and hypoplasia/

ВВЕДЕНИЕ

Единственным эффективным методом лечения детей раннего возраста с терминальной стадией печеночной недостаточности, вызванной врожденными и приобретенными заболеваниями печени, является трансплантация печени. В настоящее время 5-летняя выживаемость после этой операции превышает 85% [1, 2]. Для дальнейшего повышения эффективности лечения важно улучшить прогнозирование и диагностику посттрансплантационных осложнений, что может быть достигнуто с помощью малоинвазивных молекулярно-генетических маркеров.

Уровень трансформирующего фактора роста β 1 (TGF- β 1) – многофункционального цитокина с иммуносупрессивной и профиброгенной активностью – ассоциирован с развитием дисфункции трансплантата, инфекционными осложнениями и режимом иммуносупрессии у детей – реципиентов печени. Это делает TGF- β 1 потенциальным биомаркером,

отражающим клинические характеристики реципиента [3–5].

Синтез TGF- β 1 происходит практически во всех тканях, а его эффекты зависят от концентрации и типа клеток. Считается, что низкий уровень TGF- β 1 способствует воспалению, тогда как высокий уровень может приводить к фиброзу тканей [6, 7]. Регуляция уровня этого цитокина зависит от множества факторов и взаимодействий, включая клеточный путь TGF- β , который состоит из семейства лигандов и их трансмембранных рецепторов, взаимодействующих с другими клеточными сигнальными путями, такими как SMAD и Notch [8, 9]. Секреция TGF- β 1 также может зависеть от полиморфизма гена *TGFB1*. В настоящее время описано восемь однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), которые могут влиять на продукцию TGF- β 1 и быть связаны с различными заболеваниями, включая болезни печени [10, 11].

Анализ публикаций показывает, что при заболеваниях печени наибольшее значение могут иметь два полиморфных локуса – rs1800469 и rs1800470 [12–16]. Полиморфизм rs1800469 представляет собой замену цитозина на тимин (–509C>T) в промоторной области гена *TGFBI*, тогда как вариант rs1800470 – это замена тимина на цитозин (+869T>C), которая приводит к замене лейцина на пролин в молекуле белка [17, 18].

На сегодняшний день нет однозначного ответа на вопрос о влиянии этих локусов на продукцию TGF-β1. Предполагается, что –509C>T может либо повышать, либо не оказывать влияния на уровень TGF-β1, в то время как +869T>C, как считается, увеличивает его секрецию [19, 20]. В экспериментах *in vitro* на культуре клеток HeLa, инфицированных различными векторами, была показана повышенная продукция TGF-β1 при инфицировании конструкцией с минорным вариантом C rs1800470 [20]. Однако известно, что регуляция секреции TGF-β1 в раковых клетках значительно отличается от нормальной [6–9]. Исследования связи генетического полиморфизма *TGFBI* с уровнем TGF-β1 в крови у пациентов с заболеваниями печени проводились преимущественно на взрослых с циррозом, вызванным хроническими инфекциями, гепатитом В или С и стеатозом печени [21–24].

Установлено, что уровень TGF-β1 в плазме крови пациентов с заболеваниями печени выше, чем у здоровых людей, однако данные о связи уровней TGF-β1 с различными полиморфными аллелями остаются противоречивыми. Например, в исследованиях Mohy et al. [22], de Brito et al. [23], а также Felicidade et al. [24] высокое содержание TGF-β1 ассоциировалось с минорным гомозиготным генотипом TT rs1800469, тогда как в работе Wang et al. [21] высокий уровень TGF-β1 был связан с основными аллелями C rs1800469 и T rs1800470.

У детей раннего возраста с терминальной стадией печеночной недостаточности, вызванной врожденными и приобретенными заболеваниями печени, уровень TGF-β1 отличается от такового у здоровых детей и может коррелировать со степенью тяжести фиброза печени [3–5, 25]. Однако до сих пор отсутствуют данные о том, насколько содержание цитокина в крови связано с полиморфизмом гена *TGFBI*. В наших предыдущих исследованиях показано, что распределение полиморфных аллелей rs1800469, rs1800470 и rs1800471 гена *TGFBI* у детей раннего возраста с заболеваниями печени не отличалось от такового у здоровых лиц, тогда как частота распределения редких гаплотипов данных локусов была значительно выше в группе детей – потенциальных реципиентов печени [26].

Цель настоящей работы: определить связь уровня TGF-β1 в плазме крови детей-реципиентов

до и после трансплантации печени с носительством полиморфных аллелей и гаплотипов rs1800469 и rs1800470 гена *TGFBI*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 135 детей, которым выполнили трансплантацию печени (59 мальчиков и 76 девочек) в возрасте от 3 до 98,4 мес. (в среднем 8,2 года), с медианой 8 месяцев.

Для оценки характера связи между уровнем TGF-β1 в крови и его генетическим полиморфизмом у здоровых людей использовали группу сравнения, в которую вошли 77 здоровых человек (35 мужчин и 42 женщины) в возрасте $30,3 \pm 5,2$ года. Считается, что уровень цитокина не зависит от возраста, однако исследований, посвященных данному вопросу, мало, и их результаты неоднозначны [3–5].

Показанием для трансплантации печени у детей служила терминальная стадия заболеваний печени, в исходе следующих заболеваний: атрезия и гипоплазия желчевыводящих путей ($n = 74$ и $n = 10$ соответственно), синдром Алажилля ($n = 9$), болезнь Кароли ($n = 10$), болезнь Байлера ($n = 6$) и другие редкие заболевания печени ($n = 26$), включая синдром Криглера–Найяра, синдром Гирке, дефицит альфа-1 антитрипсина, тирозинемия, фульминантный и аутоиммунный гепатит, криптогенный цирроз и др.

После трансплантации реципиентам назначалась иммуносупрессивная терапия, состоящая из двух или трех компонентов: такролимуса, микофенолата мофетила и кортикостероидов. Обследование и лечение проводились в соответствии с клиническими рекомендациями Российского трансплантологического общества и протоколами НМИЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова.

Концентрацию TGF-β1 в плазме крови измеряли методом количественного иммуноферментного анализа, набор реагентов («Bender MedSystems», Австрия) в соответствии с инструкцией производителя. Оптическую плотность в лунках микропланшета определяли на спектрофотометре Zenyth 340r (Biochrom Anthos, Великобритания) при длине волны 450 нм. Уровень цитокина оценивался до трансплантации, через месяц и год после операции.

Полиморфные локусы rs1800469 и rs1800470 гена *TGFBI* определяли в геномной ДНК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием зондов TaqMan (Applied Biosystems, США) на амплификаторе CFX96™ (Bio-Rad, США) согласно инструкциям производителя. Для анализа использовались зонды TaqMan: C_8708473_10 для rs1800469 и C_22272997_10 для rs1800470. Геномную ДНК получали из венозной крови с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия) и автоматического анализа-

тора QIAcube™ (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколами производителей.

Сбор и анализ данных проводился с использованием программы Microsoft Excel. Статистические расчеты выполнялись в программе STATISTICA (StatSoft Inc., США). Количественные данные представлены как среднее и стандартное отклонение для параметрических величин или как медиана и значения 2–3 квартилей (с диапазоном без выбросов на диаграммах) для непараметрических переменных. Для сравнения двух зависимых переменных использовался критерий Вилкоксона, для двух независимых выборок – U-критерий Манна–Уитни, а для сравнения нескольких независимых переменных – критерий Крускала–Уоллиса. Анализ частот распределения генотипов и гаплотипов проводился с использованием точного критерия Фишера (p) в программе SNPstats. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости менее 0,05.

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НМИЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова. Информированное согласие участников исследования или их опекунов хранится в истории болезни пациента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Медиана уровней TGF-β1 в плазме крови детей – реципиентов печени до трансплантации печени составила 4,6 (1,1–9,5) нг/мл. Через месяц после трансплантации уровень цитокина вырос до 6,3 (1,7–15,0) нг/мл, $p = 0,008$. Через год после трансплантации концентрация TGF-β1 в плазме крови также была достоверно выше, чем до трансплантации – 7,0 (1,9–13,5) нг/мл, $p = 0,0001$ (рис. 1).

Результаты генотипирования ДНК детей – реципиентов печени на наличие полиморфных аллелей rs1800469 и rs1800470 гена *TGFBI* представлены на рис. 2 в виде частот встречаемости различных генотипов.

Встречаемость аллелей исследованных ОНП у детей – реципиентов печени не отличалась от таковой у здоровых индивидов. Частоты встречаемости полиморфных вариантов гена *TGFBI* у здоровых взрослых составили: для rs1800469 – 40% C/C, 44% C/T и 16% T/T; rs1800470 – 43% T/T, 40% T/C и 17% C/C. У здоровых взрослых уровень белка составлял 11,7 (6,4–16,9) нг/мл и был достоверно выше, чем у детей – реципиентов печени до или после трансплантации, $p = 0,0000$.

Сравнительный анализ содержания TGF-β1 в крови детей – реципиентов печени и здоровых лиц с различными генотипами полиморфных аллелей rs1800469 гена *TGFBI* был проведен в соответствии с основными моделями взаимодействия аллельных генов: кодоминантной, доминантной, рецессивной и

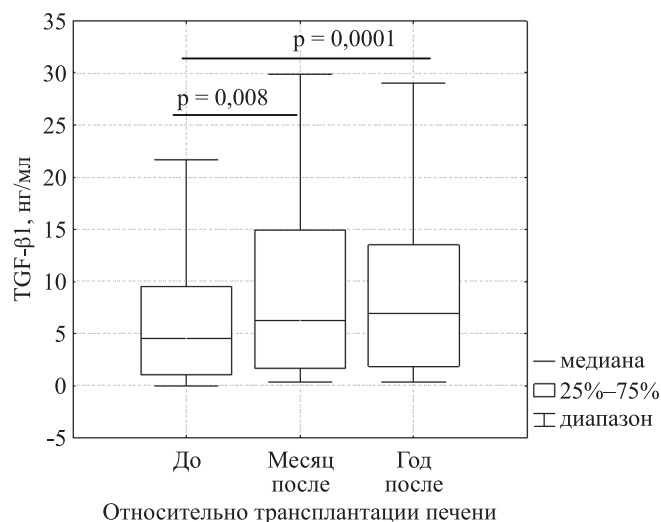


Рис. 1. Уровни TGF-β1 у детей – реципиентов печени до трансплантации, через месяц и год после нее

Fig. 1. Plasma TGF-β1 levels in pediatric liver transplant recipients measured before transplantation, one month after, and one year after transplantation

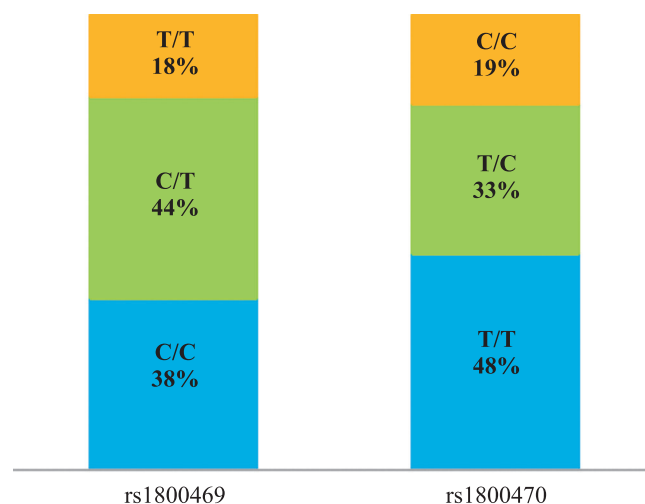


Рис. 2. Частота встречаемости полиморфных вариантов rs1800469 и rs1800470 гена *TGFBI* у детей – реципиентов печени

Fig. 2. Frequencies of polymorphic variants rs1800469 and rs1800470 of the *TGFBI* gene in pediatric liver recipients

сверхдоминантной. У детей-реципиентов содержание TGF-β1 было проанализировано до трансплантации печени, через месяц и через год после нее. Результаты представлены на рис. 3 в виде боксов, отражающих значение медианы, 2–3 квартилей и диапазона без выпадающих значений.

Полученный результат показал, что уровни TGF-β1 в крови детей – реципиентов печени с различными генотипами полиморфных аллелей rs1800469 гена *TGFBI* не различались до или через месяц после трансплантации печени. Но через год

после трансплантации в рецессивной модели взаимодействия аллельных генов уровень цитокина у носителей гомозиготного минорного аллеля – Т/Т был достоверно ниже, чем у носителей С/Т и С/С ($p = 0,045$). У здоровых людей уровни TGF- β 1 не зависели от генотипа полиморфного локуса rs1800469 ($p > 0,05$ во всех случаях).

Содержание TGF- β 1 в крови детей – реципиентов печени с различными генотипами полиморфных аллелей другого ОНП гена *TGFB1* – rs1800470 также было проанализировано в соответствии с моделями взаимодействия аллельных генов (рис. 4).

Уровни TGF- β 1 в крови детей – реципиентов печени с различными генотипами полиморфных аллелей rs1800470 до или через месяц после трансплантации печени не различались, как и в случае с rs1800469. Однако через год после трансплантации в доминантной модели у носителей гомозиготного основного

аллеля – Т/Т уровень TGF- β 1 был достоверно выше, чем у носителей Т/С и С/С ($p = 0,039$). У здоровых людей содержание TGF- β 1 в крови не зависело от типа носительства полиморфного локуса rs1800470 ($p > 0,05$ во всех случаях).

На рис. 5 представлены частоты встречаемости гаплотипов полиморфных вариантов rs1800469 и rs1800470 у детей – реципиентов печени и здоровых взрослых.

У детей-реципиентов и здоровых взрослых встречались 4 варианта гаплотипов, наиболее частым из них был С-Т, состоящий из основных аллелей двух полиморфных локусов. Второй по встречаемости гаплотип у здоровых лиц – Т-С содержал 2 минорных аллеля. Частоты наиболее распространенных гаплотипов у реципиентов и здоровых людей достоверно не различались, тогда как встречаемость гаплотипов Т-Т и С-С была достоверно выше у детей – реципи-

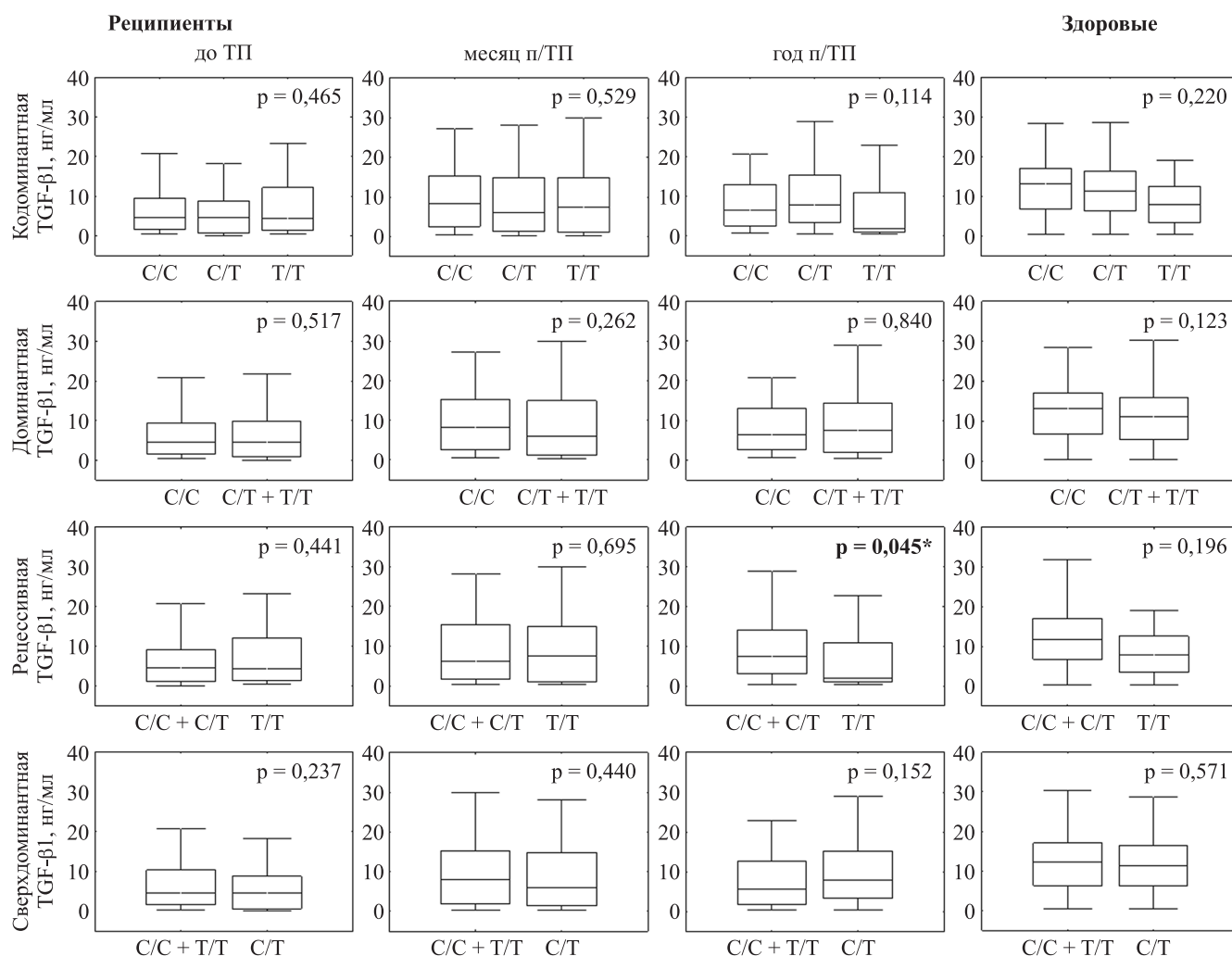


Рис. 3. Сравнение уровней TGF- β 1 у детей – реципиентов печени до, через месяц и год после трансплантации печени (п/ТП) и здоровых взрослых с различными генотипами полиморфных аллелей rs1800469 гена *TGFB1* в моделях взаимодействия аллельных генов, * – $p < 0,05$

Fig. 3. Comparison of plasma TGF- β 1 levels in pediatric liver transplant recipients measured before transplantation, one month after, and one year after transplantation, and in healthy adults, stratified by genotypes of the rs1800469 polymorphic allele of the *TGFB1* gene, analyzed using allelic interaction models, * – $p < 0.05$

ентов печени, чем у здоровых взрослых ($p = 0,007$ и $p = 0,021$ соответственно).

Результаты сравнения уровней TGF- $\beta 1$ в зависимости от носительства различных гаплотипов полиморфных аллелей rs1800469 и rs1800470 у детей-реципиентов и здоровых взрослых представлены на рис. 6.

Полученный результат показал, что уровни TGF- $\beta 1$ в крови детей-реципиентов с носительством различных гаплотипов достоверно не различались между собой до трансплантации или через месяц после нее. Через год же после трансплантации у детей – реципиентов печени с носительством гаплотипа из 2 минорных аллелей – T-C был наиболее низкий уровень цитокина, который достоверно отличался от наиболее высокого – у реципиентов с носительством гаплотипа из минорного и основного аллелей – T-T ($p = 0,019$).

У здоровых лиц, напротив, наиболее низкое содержание TGF- $\beta 1$ было ассоциировано с гаплотипом T-T, а наиболее высокое – с гаплотипом C-C ($p = 0,03$).

ОБСУЖДЕНИЕ

У детей – реципиентов печени уровень TGF- $\beta 1$ может сильно варьировать в зависимости от этиологии заболевания, степени фиброза печени, различных посттрансплантационных осложнений, режима иммуносупрессивной терапии и других факторов [3–5]. Однако нет полного понимания причинно-следственных связей, лежащих в основе такой вариативности. Настоящее исследование позволило оценить, насколько содержание цитокина может быть связано с носительством полиморфных локусов и гаплотипов rs1800469 и rs1800470 гена *TGFB1* у детей – реципиентов печени.

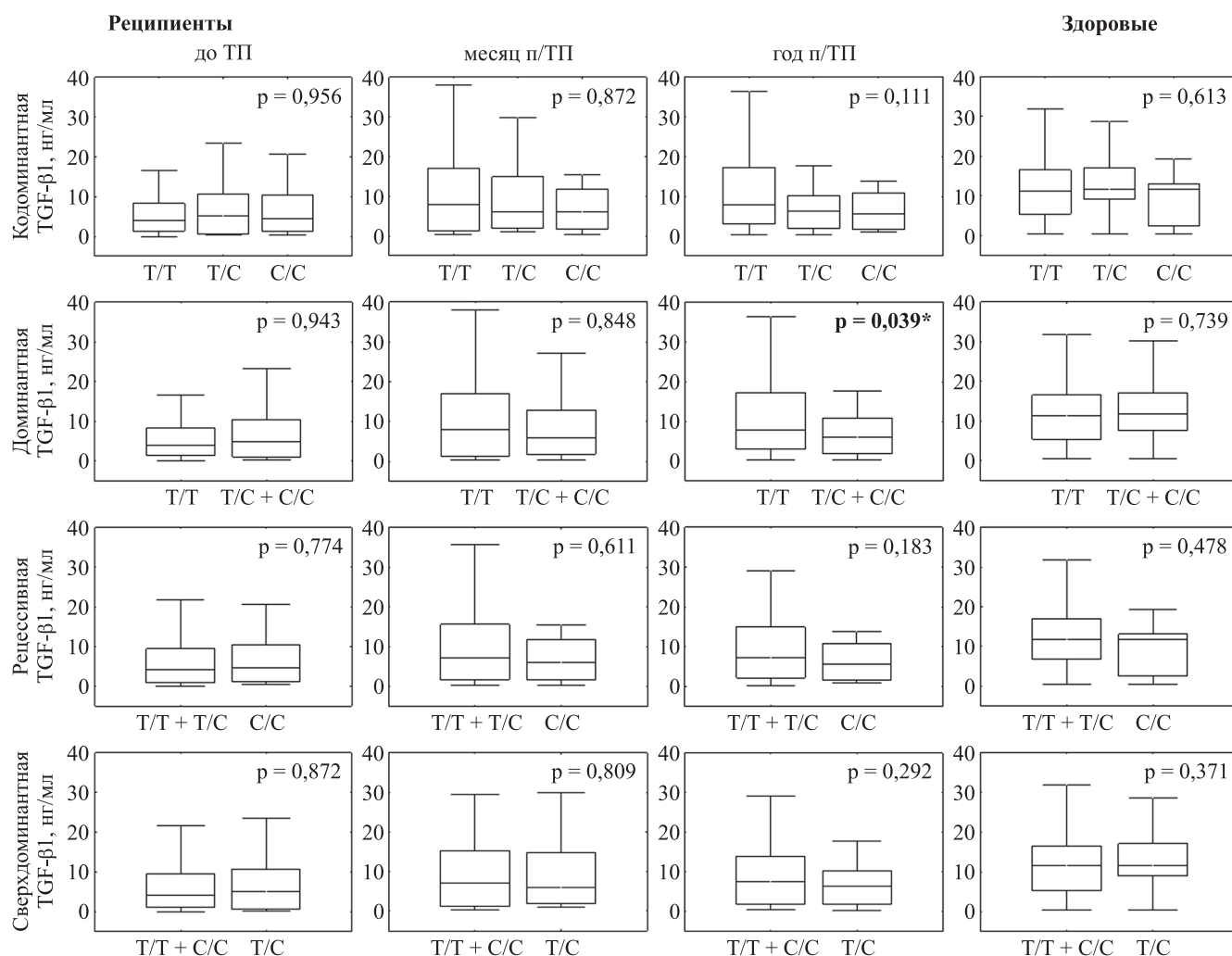


Рис. 4. Сравнение уровней TGF- $\beta 1$ у детей-реципиентов до, через месяц и год после трансплантации печени (п/ТП) и здоровых взрослых с различными генотипами полиморфных аллелей rs1800470 гена *TGFB1* в моделях взаимодействия аллельных генов, * – $p < 0,05$

Fig. 4. Comparison of plasma TGF- $\beta 1$ levels in pediatric liver transplant (LT) recipients measured before transplantation, one month after, and one year after transplantation, and in healthy adults, stratified by genotypes of the rs1800470 polymorphic allele of the *TGFB1* gene, analyzed using allelic interaction models, * – $p < 0.05$

Трансплантация печени сопровождается значительным увеличением содержания TGF- β 1 в крови детей – реципиентов печени, однако его уровень не достигает такого у здоровых взрослых и, как было показано ранее, уровня здоровых детей того же возраста [5]. Частота встречаемости полиморфных локусов rs1800469 и rs1800470 и их наиболее распространенных гаплотипов C-T и T-C значимо

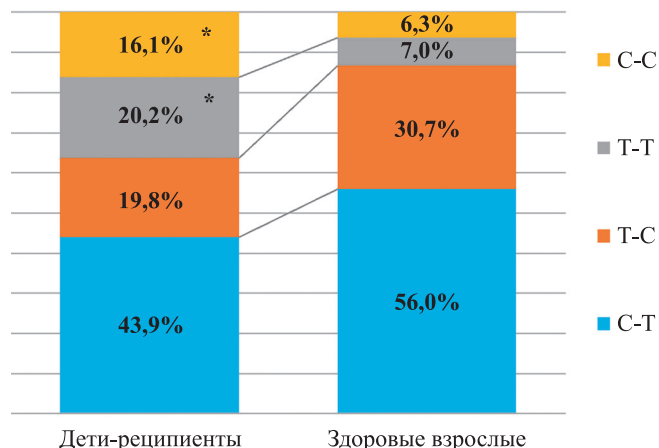


Рис. 5. Частота встречаемости гаплотипов полиморфных вариантов rs1800469 и rs1800470 гена *TGFB1* у детей – реципиентов печени и здоровых взрослых, * – $p < 0,05$

Fig. 5. Haplotype frequencies of the rs1800469 and rs1800470 polymorphic variants of the *TGFB1* gene in pediatric liver transplant recipients and healthy adults, * – $p < 0.05$

не различалась у детей – реципиентов печени и здоровых лиц. Тогда как редкие гаплотипы T-T и C-C встречались достоверно чаще у детей – реципиентов печени, чем у здоровых лиц, что подтверждает результаты, полученные нами ранее [26], и позволяет предполагать возможную связь редких гаплотипов с заболеванием детей – реципиентов печени.

Сравнение уровней TGF- β 1 в крови у детей-реципиентов, носителей различных генотипов исследуемых полиморфных локусов и их гаплотипов, не выявило различий до и через месяц после трансплантации печени. Тогда как через год после трансплантации печени наблюдались достоверные различия: для rs1800469 носительство основного аллеля (C/C + C/T) было ассоциировано с высоким, а носительство гомозиготного минорного генотипа (T/T) – с низким уровнем TGF- β 1 в крови; для rs1800470 гомозигота по основному аллелю (T/T) также была связана с высоким, а минорный аллель (T/C + C/C) – с низким уровнем TGF- β 1. У детей-реципиентов, носителей гаплотипа T-T (минорный и основной аллели), наблюдался высокий, а носителей гаплотипа T-C (оба минорных аллеля) – низкий уровень TGF- β 1 в крови.

У здоровых лиц уровень TGF- β 1 не различался в группах с носительством отдельных локусов rs1800469 и rs1800470, но при сравнении гаплотипов наблюдались различия между редкими гаплотипами: C-C (основной rs1800469 и минорный rs1800470 аллели) ассоциирован с высоким, а T-T (минорный rs1800469 и основной rs1800470 аллели), в проти-

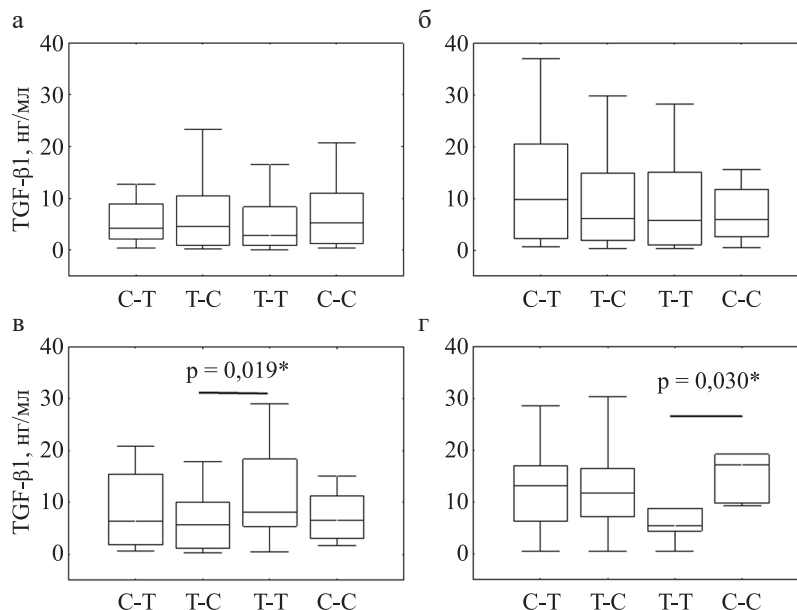


Рис. 6. Уровни TGF- β 1 у детей – реципиентов печени до трансплантации печени (а), через месяц (б), год (в) после трансплантации и здоровых взрослых (г) с носительством различных гаплотипов полиморфных аллелей rs1800469–rs1800470 гена *TGFB1*, * – $p < 0,05$

Fig. 6. TGF- β 1 levels in pediatric liver recipients measured before (a), one month (б), and one year (в) after liver transplantation, as well as in healthy adults (г), stratified by haplotypes of the rs1800469–rs1800470 polymorphic variants of the *TGFB1* gene, * – $p < 0.05$

воположность детям-реципиентам, – с низким содержанием TGF- β 1 в крови. Эти данные позволяют предполагать, что Т-аллель rs1800469 снижает, а С-аллель rs1800470 повышает продукцию TGF- β 1. Разнонаправленное действие данных полиморфизмов может также объяснять более частую встречаемость у здоровых лиц гаплотипа Т-С (оба минорных аллелей), при носительстве которого уровень цитокина компенсирован действием двух изменений и равен нормальному, как при носительстве основных аллелей.

Отсутствие различий в уровне TGF- β 1 у реципиентов до или через месяц после операции можно объяснить нарушением нормальной регуляции многих процессов в эти периоды под действием сопутствующих заболеванию осложнений или лекарственной терапии. Можно также предполагать, что через год после операции состояние пациентов является более стабильным и может приводить к нормализации (до определенной степени, с учетом иммуносупрессивной терапии) регуляции продукции TGF- β 1 в организме. У здоровых взрослых регуляция продукции цитокина может значительно отличаться от таковой у детей-реципиентов, т. к. известно, что в норме TGF- β 1 продуцируется, например, в звездчатых клетках печени на базальном уровне и увеличивается под действием различных активирующих факторов [28].

Таким образом, полученные в нашей работе результаты позволяют предполагать, что уровень TGF- β 1 в крови детей-реципиентов может быть связан с носительством определенных локусов и гаплотипов rs1800469 и rs1800470 гена *TGFB1*.

Как отмечалось во введении, других исследований связи уровня TGF- β 1 и генетического полиморфизма *TGFB1* у детей – реципиентов печени не опубликовано. При сравнении с данными, полученными у взрослых лиц с заболеваниями печени, наши выводы совпадают с таковыми в работе китайских исследователей [21], но отличаются от полученных в бразильской и египетской популяции [22–24]. Есть также работы, в которых не удалось выявить связь уровня цитокина с полиморфизмом его гена [12].

Интересно отметить, что результаты исследований связи уровня TGF- β 1 с генетическим полиморфизмом *TGFB1* при других заболеваниях также неоднозначны и разделились на 2 группы: более высокий уровень цитокина ассоциирован либо с основными аллелями – С rs1800469 или Т rs1800470 (пациенты с вирусом папилломы человека [31], системной красной волчанкой [32], аденокарциномой желудка [33], ревматоидным артритом [34]), либо с минорными аллелями – Т rs1800469 и С rs1800470 (пациенты с раком груди [20, 29] и эктазией коронарных артерий [30]).

Противоречивость приведенных работ можно объяснить плеiotропным характером цитокина TGF- β 1, сложной регуляцией его секреции, различиями в дизайне экспериментов или этнической принадлежности выборок. С другой стороны, учитывая наличие связи уровня белка с полиморфизмом его гена в значительном числе работ, а также разделение выводов независимо от этиологии заболевания на 2 противоположных варианта (высокий уровень TGF- β 1 ассоциирован либо с основными, либо с минорными аллелями), можно предполагать, что такая связь есть, но в силу определенных причин или обстоятельств она может быть как прямой, так и обратной.

Одним из таких обстоятельств может быть стадия развития болезни, когда проводится измерение уровня TGF- β 1: например, уровень цитокина может значительно меняться в зависимости от степени тяжести фиброза печени [5, 23]. То есть исходно низкий или, наоборот, высокий уровень продукции цитокина, участвуя в патогенезе болезни, может значительно увеличиться или снизиться, что будет следствием, а не причиной патологии. Таким образом, приведенные выше исследования показывают наличие ассоциации, но не позволяют ответить на вопрос о причинно-следственной связи уровня TGF- β 1 с его генетическим полиморфизмом.

Определенным ограничением для полученных выводов может являться ретроспективный характер исследования, его дизайн, основанный на методе «случай–контроль», а также генетическая неоднородность выборки. Большая часть фенотипических признаков находится под контролем значительного числа генетических локусов, в связи с чем оценить вклад отдельного локуса сложно. Следует также отметить, что использованный в работе анализ встречаемости гаплотипов является приблизительным, точное определение гаплотипа для гетерозиготных вариантов возможно только с помощью секвенирования. Для подтверждения полученных в работе выводов необходимы дальнейшие исследования.

Несмотря на оговоренные ограничения, полученные в настоящей работе данные о возможной связи уровня TGF- β 1 в крови с носительством полиморфных локусов и гаплотипов rs1800469 и rs1800470 гена *TGFB1*, критически важного регулятора фиброза и иммунного ответа, раскрывают новые аспекты регуляции белка у детей – реципиентов печени и позволяют рассматривать исследованные варианты как потенциальные прогностические маркеры осложнений у детей – реципиентов печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высокий уровень TGF- β 1 в крови детей – реципиентов печени через год после трансплантации печени связан с носительством основных аллелей –

C rs1800469 и T rs1800470, а также с гаплотипом Т-Т гена *TGFBI*. Этот факт позволяет предполагать влияние данных полиморфных локусов на развитие посттрансплантационных осложнений и возможность их использования для прогнозирования результатов трансплантации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Готье СВ, Цирульников ОМ, Мойсюк ЯГ, Ахаладзе ДГ, Цирульникова ИЕ, Силина ОВ и др. Трансплантация печени детям: анализ шестилетнего опыта. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2014; 16 (3): 54–62. Gautier SV, Tsirolnikova OM, Moysyuk YG, Akhaladze DG, Tsirolnikova IE, Silina OV et al. Liver transplantation in children: six-year experience analysis. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2014; 16 (3): 54–62. (In Russ.). <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2014-3-54-62>.
2. Baumann U, Karam V, Adam R, Fondevila C, Dhanwan A, Sokal E et al. Prognosis of Children Undergoing Liver Transplantation: A 30-Year European Study. *Pediatrics*. 2022 Oct 1; 150 (4): e2022057424. doi: 10.1542/peds.2022-057424.
3. Hussein MH, Hashimoto T, Abdel-Hamid Daoud G, Kato T, Hibi M, Tomishige H et al. Pediatric patients receiving ABO-incompatible living related liver transplantation exhibit higher serum transforming growth factor-beta1, interferon-gamma and interleukin-2 levels. *Pediatr Surg Int*. 2011 Mar; 27 (3): 263–268. doi: 10.1007/s00383-010-2784-1.
4. Briem-Richter A, Leuschner A, Krieger T, Grabhorn E, Fischer L, Nashan B et al. Peripheral blood biomarkers for the characterization of alloimmune reactivity after pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant*. 2013 Dec; 17 (8): 757–764. doi: 10.1111/petr.12161.
5. Kurabekova R, Tsirolnikova O, Pashkova I, Gichkun O, Mozheyko N, Gautier S, Shevchenko O. Transforming growth factor beta 1 levels in the blood of pediatric liver recipients: Clinical and biochemical correlations. *Pediatr Transplant*. 2020 May; 24 (3): e13693. doi: 10.1111/petr.13693.
6. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004 May; 18 (7): 816–827. doi: 10.1096/fj.03-1273rev.
7. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudla B. Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol*. 2013; 64 (5): 384–396. doi: 10.5603/EP.2013.0022.
8. Brackowski MJ, Kufel KM, Kulińska J, Czyż D, Dittmann A, Wiertelak M et al. Pleiotropic Action of TGF-Beta in Physiological and Pathological Liver Conditions. *Biomedicines*. 2024 Apr 22; 12 (4): 925. doi: 10.3390/biomedicines12040925.
9. Bakalenko N, Kuznetsova E, Malashicheva A. The Complex Interplay of TGF- β and Notch Signaling in the Pathogenesis of Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2024 Oct 8; 25 (19): 10803. doi: 10.3390/ijms251910803.
10. Martellosi Cebinelli GC, Paiva Trugilo K, Badaró Garcia S, Braço de Oliveira K. TGF- β 1 functional polymorphisms: a review. *Eur Cytokine Netw*. 2016 Nov 1; 27 (4): 81–89. doi: 10.1684/ecn.2016.0382.
11. Fang J, Liu ZW, Han QY. [Polymorphism of codon25 in signal peptide region of transforming growth factor beta 1 and its association with chronic hepatitis C virus infection]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2008 Aug; 16 (8): 586–589.
12. Punia V, Agrawal N, Bharti A, Mittal S, Chaudhary D, Mathur A et al. Association of TGF- β 1 Polymorphism and TGF- β 1 Levels With Chronic Hepatitis C and Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cureus*. 2023 Jun 29; 15 (6): e41157. doi: 10.7759/cureus.41157. eCollection. 2023 Jun.
13. Liu K, Liu X, Gu S, Sun Q, Wang Y, Meng J, Xu Z. Association between *TGFBI* genetic polymorphisms and chronic allograft dysfunction: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Jul 24; 8 (37): 62463–62469. doi: 10.18632/oncotarget.19516.
14. Ge YZ, Wu R, Lu TZ, Jia RP, Li MH, Gao XF et al. Combined effects of *TGFBI* +869 T/C and +915 G/C polymorphisms on acute rejection risk in solid organ transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Apr 4; 9 (4): e93938. doi: 10.1371/journal.pone.0093938.
15. Guo P, Liu S, Sun X, Xu L. Association of TGF- β 1 polymorphisms and chronic hepatitis C infection: a Meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2019 Aug 30; 19 (1): 758. doi: 10.1186/s12879-019-4390-8.
16. Wu XD, Zeng K, Gong CS, Chen J, Chen YQ. Transforming growth factor- β genetic polymorphisms on development of liver cirrhosis in a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2013 Jan; 40 (1): 535–543. doi: 10.1007/s11033-012-2090-1.
17. *Ncbi.nlm.nih.gov* [Internet]. The National Center for Biotechnology Information. Bethesda: National Library of Medicine; [cited. 2024 June 17]. Available from: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=TGFBI>].
18. Shah R, Rahaman B, Hurley CK, Posch PE. Allelic diversity in the *TGFBI* regulatory region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms. *Hum Genet*. 2006 Mar; 119 (1–2): 61–74. doi: 10.1007/s00439-005-0112-y.
19. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet*. 1999 Jan; 8 (1): 93–97. doi: 10.1093/hmg/8.1.93.
20. Dunning AM, Ellis PD, McBride S, Kirschenlohr HL, Healey CS, Kemp PR et al. A transforming growth factor-beta1 signal peptide variant increases secretion *in vitro* and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res*. 2003 May 15; 63 (10): 2610–2615.
21. Wang H, Mengsteab S, Tag CG, Gao CF, Hellerbrand C, Lammert F et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with progression of liver

- fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol*. 2005 Apr 7; 11 (13): 1929–1936. doi: 10.3748/wjg.v11.i13.1929.
22. Mohy A, Fouad A. Role of transforming growth factor- β 1 in serum and –509C>T promoter gene polymorphism in development of liver cirrhosis in Egyptian patients. *Meta Gene*. 2014 Sep 9; 2: 631–637. doi: 10.1016/j.mgene.2014.08.002.
23. De Brito WB, Queiroz MAF, da Silva Graça Amoras E, Lima SS, da Silva Conde SRS, Dos Santos EJM et al. The TGFB1 –509C/T polymorphism and elevated TGF- β 1 levels are associated with chronic hepatitis C and cirrhosis. *Immunobiology*. 2020 Sep; 225 (5): 152002. doi: 10.1016/j.imbio.2020.152002.
24. Felicidade I, Bocchi M, Ramos MRZ, Carlos LO, Wagner NRF, Campos ACL et al. Transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) plasmatic levels and haplotype structures in obesity: a role for TGF β 1 in steatosis development. *Mol Biol Rep*. 2021 Sep; 48 (9): 6401–6411. doi: 10.1007/s11033-021-06640-2.
25. Rosensweig JN, Omori M, Page K, Potter CJ, Perlman EJ, Thorgeirsson SS, Schwarz KB. Transforming growth factor-beta1 in plasma and liver of children with liver disease. *Pediatr Res*. 1998 Sep; 44 (3): 402–409. doi: 10.1203/00006450-199809000-00023.
26. Kurabekova RM, Gichkun OE, Tsurulnikova OM, Pashkova IE, Fomina VA, Shevchenko OP, Gautier SV. Analysis of the Association between the Tgfb1 Gene Haplotype and Liver Diseases in Children. *Acta Naturae*. 2023 Jul-Sep; 15 (3): 75–81. doi: 10.32607/actanaturae.19425.
27. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPS-tats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006 Aug 1; 22 (15): 1928–1929. doi: 10.1093/bioinformatics/btl268.
28. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 May 2; 8 (5): a021873. doi: 10.1101/cshperspect.a021873.
29. Vitiello GAF, Guembarovski RL, Hirata BKB, Amarante MK, de Oliveira CEC, de Oliveira KB et al. Transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) polymorphisms and haplotype structures have dual roles in breast cancer pathogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018 Apr; 144 (4): 645–655. doi: 10.1007/s00432-018-2585-9.
30. Ser ÖS, Çetinkal G, Kiliçarslan O, Dalgıç Y, Batit S, Keskin K et al. The comparison of serum TGF-beta levels and associated polymorphisms in patients with coronary artery ectasia and normal coronary artery. *Egypt Heart J*. 2021 Mar 31; 73 (1): 32. doi: 10.1186/s43044-021-00153-w.
31. Trugilo KP, Cebinelli GCM, Pereira É R, Okuyama NCM, Cezar-Dos-Santos F, Castilha EP et al. Haplotype Structures and Protein Levels of TGFB1 in HPV Infection and Cervical Lesion: A Case-Control Study. *Cells*. 2022 Dec 25; 12 (1): 84. doi: 10.3390/cells12010084.
32. Stadllober NP, Flauzino T, Santos L, Iriyoda TMV, Costa NT, Lozovoy MAB et al. TGFB1 +869T>C (rs1800470) variant is independently associated with susceptibility, laboratory activity, and TGF- β 1 in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2021 Dec; 54 (8): 569–575. doi: 10.1080/08916934.2021.1975680.
33. Juarez I, Gutierrez A, Vaquero-Yuste C, Molanes-López EM, López A, Lasa I et al. TGFB1 polymorphisms and TGF- β 1 plasma levels identify gastric adenocarcinoma patients with lower survival rate and disseminated disease. *J Cell Mol Med*. 2021 Jan; 25 (2): 774–783. doi: 10.1111/jcmm.16131.
34. Iriyoda TMV, Flauzino T, Costa NT, Lozovoy MAB, Reiche EMV, Simão ANC. TGFB1 (rs1800470 and rs1800469) variants are independently associated with disease activity and autoantibodies in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Med*. 2022 Feb; 22 (1): 37–45. doi: 10.1007/s10238-021-00725-9.

Статья поступила в редакцию 17.03.2025 г.
The article was submitted to the journal on 17.03.2025