

---

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ С\*

**Л.И. Николаева, Е.И. Самохвалов, С.В. Альховский**

Лаборатория генно-инженерных препаратов  
ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского»  
ул. Гамалеи, 16, Москва, Россия, 123098

**А.В. Колотвин, Л.М. Самоходская**

ГУНУ факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова  
Ломоносовский пр., 31, стр. 5, Москва, Россия, 119192

**В.В. Макашова**

Клинический отдел инфекционной патологии  
ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии»  
ул. Новогиреевская, 3а, Москва, Россия, 111123

**А.К. Токмалаев**

Кафедра инфекционных болезней с курсом эпидемиологии  
Медицинский факультет  
Российский университет дружбы народов  
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

Цель исследования — выявить роль генетического полиморфизма вируса гепатита С, выражающегося, прежде всего, в существовании генотипов/субтипов вируса, и однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) генов пациентов с хроническим гепатитом С в формировании устойчивого вирусологического ответа (УВО) на противовирусную терапию. Изучены образцы крови от 100 пациентов восточно-славянского происхождения с разным ответом на терапию. Установлено, что на вероятность достижения УВО среди изученных ОНП семи генов влияют отдельные аллельные варианты генов IL-1 $\beta$ , IL-28B, TGF- $\beta$ 1 и генотипы вируса.

**Ключевые слова:** хронический вирусный гепатит С, вирусологический ответ, геном, полиморфизм, генотипы.

Вирусный гепатит С — повсеместно распространенное инфекционное заболевание, вызываемое парентерально передающимся вирусом гепатита С (ВГС). Для этого вируса характерно частое формирование хронической инфекции, которая постепенно прогрессирует, приводя к развитию фиброза, к циррозу печени у трети больных и, реже, к гепатоцеллюлярной карциноме. В последние годы возрастает интерес к изучению влияния полиморфизма генома ВГС и отдельных генов больных людей на формирование устойчивого вирусологического ответа (УВО) при противовирусной терапии (ПВТ).

ВГС относится к сем. *Flaviviridae*, род. *Hepacivirus*. Геном вируса представлен одноцепочечной РНК, которая имеет полиморфные участки, что привело к необ-

---

\* Данное исследование поддержано грантом РФФИ офи-ц 09-04-13853.

ходимости классифицировать вирус на генотипы и субтипы, каждый из которых имеет разную чувствительности к ПВТ. На генетическое разнообразие вируса накладывается полиморфизм генов людей, что тоже вносит свой вклад в вероятность достижения УВО при ПВТ.

В настоящее время выявляют несколько основных групп человеческих генов, для которых показана зависимость между их полиморфизмом и вариантами течения хронического гепатита С (ХГС). Это гены, определяющие особенности иммунного ответа, контролирующие продукцию и деградацию внеклеточного матрикса, кодирующие вазоактивные пептиды, вовлеченные в окислительный стресс, участвующие в метаболизме липидов, контролирующие катаболизм эндогенных и экзогенных молекул [1]. Несмотря на значительное число исследований, посвященных поиску взаимосвязи между аллельными вариантами генов-кандидатов и ответом на ПВТ, убедительные данные установлены для небольшого их числа. При этом в ряде исследований получены противоречивые данные.

Перечисленные причины определяют актуальность проведения исследования. Учитывая влияние иммунных реакций и повышенного содержания железа на эффективность ПВТ, нами были исследованы ОНП генов, продукты которых участвуют в этих процессах, — IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-28B, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 (цитокины) и HFE (белок-регулятор обмена железа)

**Методы исследования.** Исследованы образцы крови от 51 мужчины и 49 женщин восточно-славянского происхождения (средний возраст  $38,8 \pm 1,6$  г.). У всех больных был выявлен ХГС без других гепатитов и ВИЧ-инфекции, стадии фиброза печени перед началом терапии имели значение от минимальной до F3 (по системе METAVIR). Больным был проведен 24- и 48-недельный курс терапии ПЕГ-интерфероном- $\alpha$  в комбинации с рибавирином. Длительность курса терапии зависела от субтипа вируса. Через 6 месяцев после окончания терапии были сформированы группы больных с УВО и без него (БВО).

РНК ВГС выявляли методом ОТ-ПЦР, используя тест-систему «Ампли-Сенс-100-R» («ИнтерЛабСервис», Россия), или по методике, описанной ранее [2]. Генотипирование и определение межгенотипной рекомбинации проводили секвенированием областей генома 5'-NTR-core и NS5b и сопоставлением с референс-последовательностями базы данных GenBank NCBI (США). Вирусную нагрузку определяли с помощью количественных тестов «ОТ-гепатоген-С-количественный» («ДНК-технология», Россия) и «РеалБест РНК ВГС» с чувствительностью 15 МЕ/мл («Вектор-Бест», Россия). Определение количества квазивариантов (КВ) по 1-му гипервариабельному региону (1ГВР) белка E2 проводили методом одноцепочечного конформационного полиморфизма, разделяя продукты ПЦР в градиентном полиакриламидном геле (7—15%) [3].

Выделение геномной ДНК пациентов, условия ПЦР для локусов генов IL-1b (-511 C/T), IL-6 (-174 G/C), IL-10 (-1082 G/A), TNF- $\alpha$  (-238 G/A), TGF- $\beta$ 1 (+915 G/C), (H63D, H282Y), а также праймеры и анализ продуктов реакции проводили, как описано ранее [4].

Генотипирование полиморфных локусов (rs8099917, rs12979860) гена IL-28B осуществляли методом ПЦР в реальном времени, используя «Комплект реагентов

для определения генетических полиморфизмов ПЛ-28В» (НПО «ДНК-Технология», Россия).

Статистически значимые различия в группах больных рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента,  $\chi^2$ -критерия и точного метода Фишера. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Сравнимые группы больных имели почти равное соотношение мужчин и женщин (табл. 1). Ранее во многих публикациях отмечалось, что женщины чаще достигают УВО, чем мужчины. В наших группах доля мужчин молодого возраста, недавно инфицированных ВГС, была больше, чем доля молодых женщин. Группа БВО была старше, и временной период, от первого обнаружения антител к ВГС до начала лечения, в ней был достоверно больше.

Таблица 1

**Характеристика групп больных перед началом терапии**

Показатель	Группа УВО ( <i>n</i> = 50)	Группа БВО ( <i>n</i> = 50)	Достоверность различий, <i>p</i>
Возраст, годы	37,4 ± 1,4	42,2 ± 1,8	$p < 0,05$
Длительность ХГС к началу терапии	6,1 ± 0,7	11,5 ± 1,0	$p < 0,001$
Мужчины	25 (50%)	26 (52%)	$p > 0,05$
Женщины	25 (50%)	24 (48%)	$p > 0,05$
АЛТ, превышение нормы	3,36 ± 0,68	2,54 ± 0,42	$p > 0,05$
АСТ, превышение нормы	1,68 ± 0,34	1,96 ± 0,38	$p > 0,05$

Данные по анализу генетических параметров ВГС у больных двух этих групп представлены в табл. 2. В группе с УВО преобладали субтипы вируса 3а и 1b, в группе БВО — 1b, что согласуется с результатами других исследований [5, 6]. Доля пациентов, инфицированных вирусом субтипа 1b и достигших УВО, составила 38,6% (22 пациента из 57), что не противоречит опубликованным сведениям — 36—48% [5, 6]. Количество пациентов, инфицированных вирусом субтипа 3а, достигших УВО в нашем исследовании, составило 67,6% (23 из 34), что входит в диапазон значений, полученных другими авторами — 65—80% [5, 6].

Таблица 2

**Генетические параметры ВГС в группах больных**

Показатели	Группа с УВО ( <i>n</i> = 50)	Группа с БВО ( <i>n</i> = 50)
Субтипы вируса:		
1а	1 (2%)	1 (2%)
1b	22 (44%)	35 (70%)
2к/1b	0	2 (4%)
2а	4 (8%)	1 (2%)
3а	23 (46%)	11 (22%)
Количество РНК до ПВТ:	(7,53 ± 3,68) · 10 <sup>5</sup>	(8,76 ± 2,86) · 10 <sup>5</sup>
> 10 <sup>6</sup> (МЕ/мл)	30	28
< 10 <sup>6</sup> (МЕ/мл)	20	22
Кол-во РНК через 6 месяцев после ПВТ	не определялась	(8,62 ± 2,53) · 10 <sup>5</sup>
Кол-во КВ: диапазон и среднее значение	2—5 2,83 ± 0,45	2—6 3,27 ± 0,36

В обеих группах больных выявлена вариабельность вирусной нагрузки: от  $2,2 \cdot 10^4$  до  $9,1 \cdot 10^7$ . Однако средние групповые показатели виремии перед на-

чалом ПВТ не имели достоверных различий (см. табл. 2). Подобный факт отмечался и другими авторами [6]. Общеизвестно, что при высокой вирусной нагрузке (более  $6 \cdot 10^5$  МЕ/мл) вероятность достижения УВО меньше, чем при более низких значениях. Как представлено в табл. 2, различие в количестве пациентов с низкой и высокой вирусной нагрузкой в двух сравниваемых группах больных перед началом терапии было минимальным.

Еще один вирусный генетический параметр, изученный нами, — это количество КВ вирусов по 1ГВР белка Е2. Известно, что набор вирусных частиц, различающихся по этому региону, и их динамика во времени являются важным показателем взаимоотношений ВГС и макроорганизма. Роль вирусных КВ в формировании УВО до сих пор оценивается неоднозначно. В ряде публикаций показано, что при количестве КВ равном 5 или более пациент имеет низкую вероятность достижения УВО [7—9]. Однако этот факт, в других работах, не подтверждается [10, 11]. Возможно, такое противоречие вызвано тем, что были использованы различные методики выделения вирусной РНК и детекции КВ. В нашем исследовании в группе с УВО перед терапией среднее количество КВ было меньше, чем в группе БВО (см. табл. 2). Однако это различие было статистически недостоверным. Близкие нашим количественные показатели получены А.А. Al-Qahtani и соавт. при анализе больных, инфицированных вирусом генотипа 4 [7].

У 2 участников из группы БВО нами была обнаружена межгенотипная рекомбинация вирусной РНК (табл. 2), что свидетельствует о редкости данного явления среди больных Московского региона и совпадает с данными П.Н. Дмитриева и соавт. [12].

Иммунный ответ пациента на ВГС в значительной степени определяется генетическим полиморфизмом генов больного, особенно полиморфизмом генов цитокинов, которые являются медиаторами антивирусного иммунного ответа. ОНП обеспечивает наследуемую генетическую вариацию, которая часто затрагивает регуляторную зону гена и влияет на связывание транскрипционных факторов, что приводит, в свою очередь, к увеличению или уменьшению продукции м-РНК. Провоспалительный цитокин IL-1 $\beta$  инициирует и регулирует воспалительные и иммунные процессы (активирует В- и Т-лимфоциты), повышает хемотаксис, фагоцитоз и является медиатором взаимодействий между иммунной и нервной системами. В нашем исследовании обнаружено более частое выявление мажорного (Т/Т) аллельного варианта гена IL-1 $\beta$  в группах больных БВО (табл. 3), что не совпадает с данными других авторов [6, 13]. Возможно, расхождения вызваны этническими различиями больных.

Мультифункциональный провоспалительный цитокин IL-6 принимает участие в индукции белков острой фазы, в регуляции созревания В-клеток и продукции иммуноглобулинов, в гемопоэзе и онкогенезе. Установлено, что полиморфизм -174 G/C в промоторной части гена IL-6 влияет на содержание этого цитокина в крови. Люди с аллельными вариантами G/G и G/C имеют более высокое содержание этого цитокина, чем при генотипе C/C. В нашем исследовании, также как в работе J. Nattermann и соавт., не обнаружено достоверных различий в выявлении отдельных аллельных вариантов в сравниваемых группах больных [14].

Таблица 3

**Полиморфизм генов, вовлеченных в вероятность достижения пациентами УВО**

Ген, локус и генотип	Группа УВО, доля пациентов с данным генотипом	Группа БВО, доля пациентов с данным генотипом	Достоверность различий, <i>p</i>
IL-1 $\beta$ , -511, Т/Т	2,0%	12,0%	<i>p</i> < 0,05
IL-28В, С/С rs12978860	45,4%	20,0%	<i>p</i> < 0,01
IL-28В, Т/Т rs8099917	72,7%	45,7%	<i>p</i> < 0,01
TGF- $\beta$ 1, +915, G/G G/C	84,0% 16,0%	96,0% 4,0%	<i>p</i> < 0,05 <i>p</i> < 0,05

Цитокин IL-10 обладает противовоспалительным эффектом, снижает экспрессию молекул МНС класса I и II и продукцию цитокинов Th1. Полиморфизм в промоторе -1082 G/A приводит к разному содержанию цитокина. Более низкий уровень IL-10 выявляется при генотипе A/A. По данным L.J. Yee и соавт., генотип A/A ассоциирован с достижением пациентами УВО [15]. В нашем исследовании в обеих группах преобладал генотип G/G, достоверных различий не обнаружено. Аналогичные данные получены другими авторами для коренных жителей Пакистана [6].

Недавно выявлено несколько значимых ОНП для гена IL-28В, которые влияют на вероятность достижения УВО у больных, инфицированных ВГС генотипа 1 [16]. Сведений о роли этих полиморфизмов (rs12978860 C/T и rs8099917 T/G) для пациентов восточно-славянского происхождения нет. В нашем исследовании установлено, что у больных, инфицированных вирусом 1 генотипа и достигших УВО, с одинаковой достоверностью преобладал как аллельный вариант C/C (rs12978860), так и вариант T/T (rs8099917) (см. табл. 3). У пациентов, инфицированных вирусом субтипа 3a и достигших УВО, часто обнаруживались эти протективные аллельные варианты гена, но различия между группами больных не достигли достоверной значимости. Возможно, ввиду немногочисленности больных ( $n < 50$ ) с 3 генотипом ВГС. Однако эту зависимость не удалось обнаружить и другим авторам [16, 17].

При ХГС у некоторых больных отмечается повышенный уровень TNF- $\alpha$  в сыворотке крови и его м-РНК в гепатоцитах печени [6]. Известно, что TNF- $\alpha$  является полифункциональным цитокином, который принимает участие во многих иммунных реакциях организма, регулирует процессы воспаления, стимулирует клеточный иммунный ответ по Th1-типу, фагоцитарную и цитотоксическую активность Т-лимфоцитов и вовлечен в регуляцию апоптоза, особенно при инфицировании вирусом. При анализе влияния полиморфизма локуса -238 G/A на вероятность достижения УВО нами не выявлено различий в содержании отдельных аллельных вариантов TNF- $\alpha$ , что совпадает с данными других авторов [6, 18].

Цитокин TGF- $\beta$ 1 снижает иммунный ответ, ингибируя активность НК-клеток и продукцию интерферона- $\gamma$  и IL-12. Его рассматривают как профибротический цитокин. Полиморфизм гена этого цитокина по локусу +915 G/C влияет на про-

дукцию TGF- $\beta$ 1: генотип G/G приводит к высокой продукции, G/C — к промежуточной и C/C — к низкой. Нами обнаружено более частое выявление генотипа GG в группе пациентов БВО и достоверно преобладание генотипа G/C в группе с УВО (табл. 3).

Почти у 30% пациентов с ХГС выявляется нарушение гомеостаза железа, причиной которого может быть неблагоприятный аллельный вариант HFE, дисфункция обменных процессов из-за хронической ВГС-инфекции и сочетание этих двух факторов. Ген HFE (ген наследственного гемохроматоза) кодирует белок-регулятор метаболизма железа, имеющий однонуклеотидный полиморфизм по нескольким локусам. Наиболее значимыми являются аминокислотные замены H63D и C282Y в этом белке. Нами не выявлено различий по частоте обнаружения минорных форм (H/D и D/D) в сравниваемых группах больных. Хотя ранее рядом авторов было показано, что пациенты из стран Европы и Азии, имеющие вариант H/D по 63 аминокислотному остатку, чаще достигают УВО при терапии [19, 20].

Минорная форма гена HFE, при которой происходит замена остатка цистеина на 282 на тирозин, вовлечена в развитие гемохроматоза. В нашем исследовании не выявлено ассоциации между обнаружением минорных аллелей и большой вероятностью закончить терапию без УВО. Ранее такую зависимость установили для пациентов из Польши и Норвегии [21, 22].

В заключение отметим, что предикторами неблагоприятного результата ПВТ у больных восточно-славянского происхождения являются: инфицирование ВГС субтипа 1b, отсутствие аллельных вариантов C/C (rs12978860) и T/T (rs8099917) гена IL-28B и наличие генотипа T/T (-511) гена IL-1 $\beta$  и генотипа G/G (+915) гена TGF- $\beta$ 1.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Абдуллаев С.М., Самоходская Л.М., Игнатова Т.М. и др.* Молекулярный полиморфизм человека: структурное и функциональное разнообразие биомакромолекул. — М.: РУДН, 2007. — Т. 2. — С. 397—458.
- [2] *Николаева Л.И., Зверев С.Я., Петрова Е.В. и др.* Гуморальный ответ на антигены вируса гепатита С при коинфекции вирусом иммунодефицита человека 1-го типа // *Лабор. диагност.* — М. — 2008. — №7. — С. 42—44.
- [3] *Ramachandran S., Xia G.L., Ganova-Raeva L.M. et al.* End-point limiting-dilution real-time PCR assay for evaluation of hepatitis C virus quasispecies in serum: performance under optimal and suboptimal conditions // *JVirol. Meth.* — 2008. — V.151. — P. 217—224.
- [4] *Николаева Л.И., Самоходская Л.М., Макашова В.В. и др.* Поиск генетических факторов вируса гепатита С у пациентов с хроническим гепатитом С, ассоциированных с формированием устойчивого вирусологического ответа на противовирусную терапию // *В мире вирусных гепатитов.* — 2011. — № 1. — С. 26—35.
- [5] *Asselah T., Estrabaud E., Bieche I. et al.* Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin // *Liver Int.* — 2010. — V. 30. — P. 1259—1269.
- [6] *Abbas Z., Moatter T., Hussainy A., Jafri W.* Effect of cytokine gene polymorphisms on histological activity index, viral load and response to treatment in patients with chronic hepatitis C genotype 3 // *World JGastroent.* — 2005. — V. 11. — P. 6656—6661.

- [7] *Al-Qahtani A.A., Kessie G., Cruz D.D. et al.* Quasispecies of genotype 4 of hepatitis C virus genomes in Saudi patients managed with interferon alfa and ribavirin therapy // *Ann. Saudi Med.* — 2010. — V.30. — P. 109—114.
- [8] *Moreau I., Levis J., Crosbie O. et al.* Correlation between pre-treatment quasispecies complexity and treatment outcome in chronic HCV genotype 3a // *J Virol.*—2008. — V. 5. — P. 78—93.
- [9] *Salmeron J., De Rueda P.M., Ruiz-Extremera A. et al.* Quasispecies as predictive response factors for antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C // *Dig. Dis. Sci.* — 2006. — V. 51. — P. 960—967.
- [10] *Fan X., Mao Q., Zhou D. et al.* High diversity of hepatitis C viral quasispecies is associated with early virological response in patients undergoing antiviral therapy // *Hepatol.* — 2009. — V. 50. — P. 1765—1772.
- [11] *Le Guen B., Squadrito G., Nalpas B. et al.* Hepatitis C virus genome complexity correlates with response to interferon therapy: a study in French patients with chronic hepatitis C // *Hepatol.* — 1997. — V. 25. — P. 1250—1254.
- [12] *Дмитриев П.Н., Цыкина М.Н., Серков И.Л. и др.* Рекомбинации вируса гепатита С // *Мир вирусн. гепатитов* — 2009. — № 1. — С. 3—2.
- [13] *Constantini P.K., Wawrzynowicz-Szczewska M., Clare M. et al.* Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy // *Liver* — 2002. — V. 22. — P. 404—412.
- [14] *Nattermann J., Vogel M., Berg N. et al.* Effect of the interleukin-6 C174G gene polymorphism on treatment of acute and chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus coinfecting patients // *Hepatol.* — 2007. — V. 46. — P. 1016—1025.
- [15] *Yee L.J., Tang J., Gibson A.W. et al.* Interleukin 10 polymorphism as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C // *Hepatol.* — 2001. — V. 33. — P. 708—712.
- [16] *Halfon P., Bourliere M., Ouzan D. et al.* A single IL-28B genotype SNP rs12979860 determination predicts treatment response in patients with chronic hepatitis C Genotype 1 // *Eur. J Gastroenterol. Hepatol.* — 2010. — V. 23. — P. 931—935.
- [17] *Moghaddam A., Melum E., Reinton N. et al.* IL-28B genetic variation and treatment response in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection // *Hepatol.* — 2011. — V. 53. — P. 746—754.
- [18] *He J., Pei X., Xu W. et al.* The relationship between tumor necrosis factor- $\alpha$  polymorphisms and hepatitis C virus infection: a systematic review and meta-analysis // *Ren. Fail.* — 2011. — V. 33. — P. 915—22.
- [19] *Carneiro M.V., Souza F.F., Teixeira A.C. et al.* The H63D genetic variant of the HFE gene is independently associated with the virological response to interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C // *Eur. J Gastroenterol. Hepatol.* — 2010. — V. 22. — P. 1204—1210.
- [20] *Ishizu Y., Katano Y., Honda T. et al.* Clinical impact of HFE mutations in Japanese patients with chronic hepatitis C // *J Gastroenterol. Hepatol.* — 2011. Nov. 18. epub ahead of print.
- [21] *Sikorska K., Stalke P., Izycka-Swieszewska E. et al.* The role of iron overload and HFE gene mutations in the era of perylated interferon and ribavirin treatment of chronic hepatitis C // *Med. Sci. Monit.* — 2010. — V. 16. — P. 137—143.
- [22] *Distante S., Bjoro K., Hellum K.B. et al.* Raised serum ferritin predicts nonresponse to interferon and ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C infection // *Liver.* — 2002. — V. 22. — P. 269—275.

**GENETIC POLYMORPHISMS  
AND EFFECACY OF ANTIVITAL THERAPY  
OF CHRONIC VIRAL HEPATITIS C**

**L.I. Nikolaeva, E.I. Samokhvalov, S.V. Al'khovskiy**

Lab. of genetically engineered products  
D.I. Ivanovsky institute of virology  
*Gamaleya Str., 16, Moscow, Russia, 123098*

**A.V. Kolotvin, L.M. Samokhodskaya**

Lab. of genetic and cellular technology  
M.V. Lomonosov Moscow State University  
*Lomonosovsky Av., 31-5, Moscow, Russia, 119192*

**V.V. Makashova**

Clinical department of infection pathology  
Central institute of epidemiology  
*Novogireevskaya Str., 3a, Moscow, Russia, 111123*

**A.K. Tokmalaev**

Department of infection diseases with epidemiologic course  
Peoples' Friendship University of Russia  
*Miklukho-Maklaya Str., 8, Moscow, Russia, 117198*

Aim: to determine influence of genetic polymorphisms of hepatitis C virus and single nucleotide polymorphisms (SNPs) of patients with chronic hepatitis C on achieving sustained virological response (SVR) to antiviral therapy. One hundred blood samples of eastern-Slavonic patients with different response to the therapy were analyzed. It was determined, that among SNPs of 7 human genes only allelic variants of IL-1 $\beta$ , IL-28B, TGF- $\beta$ 1 and viral genotypes can influence on probability to achieve SVR.

**Key words:** chronic hepatitis C, virological response, genome, polymorphisms, genotypes.