

Прогностическая значимость вариантов полиморфизма гена интерлейкина 28в при лечении хронического вирусного ГЕПАТИТА С

С.Н. Колюбаева, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, Россия
Ю.И. Буланьков, доктор медицинских наук, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, Россия
О.В. Скачкова, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, Россия
К.О. Кулагина, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, Россия
С.С. Жабров, Подполковник, Кандидат медицинских наук, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, Россия
И.С. Петрова, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, Россия
А.М. Иванов, Профессор, доктор медицинских наук, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург, Россия

В работе исследовали взаимосвязь однонуклеотидных полиморфизмов нуклеотидных последовательностей rs 8099917 и rs 12979860 гена интерлейкина (ИЛ) 28В у 200 больных с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) с достижением у них устойчивого вирусологического ответа (УВО) на противовирусную терапию пегелированным интерфероном и рибавирином. Установлено, что УВО наблюдается в 100% случаев при генотипе СС и 42% случаев при генотипе СТ (rs 12979860), что составляет в целом 66% от общего числа обследованных пациентов, что статистически не отличается от количества пациентов, лечение которых контролировали по достижению раннего вирусологического ответа. Однако, использование ОНП ИЛ28В для прогнозирования до начала лечения исключает финансовые затраты и нежелательные эффекты противовирусной терапии.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, интерлейкин 28В, противовирусная терапия, хронический вирусный гепатит С.

Введение

В последнее время наиболее интенсивно исследуются однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП), связанные с индивидуальной предрасположенностью к различным заболеваниям. Одно из важнейших направлений изучения ОНП связано с поиском связей определенных вариантов генов с влиянием фармакологических препаратов на человеческий организм (фармакогенетика).

Потребовалось более 10 лет на поиск ассоциативной связи между ответом на лекарственную терапию и вариантами полиморфизма генов, осуществляющих эту взаимосвязь [1]. В результате установлено что полиморфизмы гена интерлейкина (ИЛ) 28В определяют как вероятность самопроизвольной элиминации от вируса гепатита С, так и ответ на терапию интерфероном и рибавирином. Основную роль при инфицировании вирусом гепатита С играют две однонуклеотидные замены: а) замена цитозина на тимин, имеющая обозначение rs 12979860; в) замена тимина на гуанин, которая обозначается rs 8099917. У носителей генотипа rs 12979860 СС имеет место повышение (до 2-х кратного) вероятности положительного ответа на лечение рибавирином и интерфероном. Также генотип СС чаще выявляется у людей со спонтанным разрешением инфекции, иммунная система носителей аллелей СС более склонна самостоятельно справляться с вирусом [2, 3].

Генотип rs 8099917 ТТ также связан со спонтанным разрешением инфекции, независимо от лечения. Аллель G rs 8099917 является аллелем риска и ассоциирован с низким уровнем ответа на терапию пегелированным интерфероном и рибавирином [4, 5, 6]. Исследования по изучению роли полиморфизма указанных регионов человеческого генома показали, что положительное прогностическое значение полиморфизма IL28В выше, чем других базовых характеристик маркеров успешной терапии [5, 6]. Однако наряду с определением генотипа пациента необходимо по-прежнему учитывать базовые характеристики стадии болезни конкретного пациента, генотип вируса и активность его репликации. Установлено, что наиболее важное значение полиморфизм IL28В имеет при инфицировании 1-м субтипом вируса гепатита С [7, 8]. Определение генотипа больного с вирусным гепатитом С до начала лечения может изменить алгоритм терапии как по длительности, так и по выбору схемы. В результате можно оптимизировать терапию вирусного гепатита С с высокой вероятностью получения положительного ответа. При этом снижается риск нежелательных эффектов и дополнительные затраты на тройную терапию с включением противовирусных препаратов прямого действия на вирусы. Исследования новых лекарственных средств для лечения вирусного гепатита С выявили возможность использования новых препа-

ратов – ингибиторов протеазы и полимеразы вируса [9,10], однако определение полиморфизмов гена IL28B останется актуальным, так как результаты этого исследования дают дополнительную информацию с высокой достоверностью о прогнозе заболевания (самоизлечение и развитие гепатокарциномы) [11].

Цель исследования изучить зависимость результата противовирусной терапии больных гепатитом С от полиморфизма гена IL28B, выявленного у этих больных.

Материалы и методы

В нашем исследовании полиморфизмы гена IL28B определяли у больных с хроническим вирусным гепатитом С перед началом противовирусной терапии. В работе использовали наборы реактивов фирмы «Интерлабсервис». ДНК выделяли из цельной периферической крови, взятой в пробирку с ЭДТА в соответствии с протоколом. Амплификацию ДНК и детекцию сигнала производили на приборе DT lite 4, «ДНК-технология» с использованием программного обеспечения RealTime PCR в режиме «Работа с приборами». Всего исследовано 200 больных с хроническим вирусным гепатитом С и 50 здоровых доноров, при этом наличие хронического вирусного гепатита В и ВИЧ-инфекции являлись факторами исключения пациентов из исследования. Вирусную нагрузку определяли несколько раз в течение первых месяцев от начала лечения. Выделяли ранний вирусологический ответ (РВО) – снижение вирусной нагрузки до < 50 МЕ/мл с 4-ой недели до окончания лечения. Медленный – снижение на $2 \log_{10}$ МЕ/мл (в 100 раз) по сравнению с исходным значением на 12 неделе противовирусной терапии. Отсутствие ответа на лечение на 12 неделе (или уровень снизился менее чем на $2 \log_{10}$ МЕ/мл). Устойчивый вирусологический ответ – неопределяемый уровень ХВГС-RNA в сыворотке крови через 24 недели после прекращения терапии [8]. Средний уровень виремии к началу противовирусной терапии составил $7,10 \log_{10}$ МЕ/мл.

Для сравнения количественных показателей с нормальным распределением использовали t-критерий Стьюдента, для обработки данных, которые отличались от нормального распределения, использовали критерий Холмогорова – Смирнова. Для сравнения частот качественных бинарных признаков использовали двусторонний точный критерий Фишера. Все расчеты производили с помощью программного пакета Statistika 8,0.

Результаты и обсуждение

У больных хроническим вирусным гепатитом С наблюдали следующее распределение генотипов при исследовании нуклеотидной последовательности: rs 8099917 у больных – ТТ-50%, ТГ-48%, ГГ-2% (рис. 1) и у здоровых – ТТ-58%, ТГ-38%, ГГ-4%. При исследовании нуклеотидной последовательности rs 12979860: СС-37%, СТ-54%, ТТ-9% (рис. 1), и у здоровых доноров СС-73%, СТ-26%, и ТТ-1%. При этом распределение больных с учетом двух полиморфизмов следующее: ТТ-СС-22%, (rs 8099917 и rs 12979860 соответственно), ТТ-

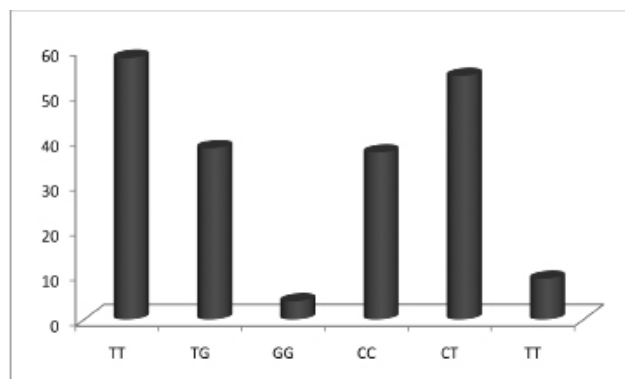


Рис. 1. Распределение больных с учетом генотипа, установленного при исследовании нуклеотидной последовательности rs 8099917 (первые 3 столбца) и нуклеотидной последовательности rs 12979860 (последние 3 столбца). По оси абсцисс варианты генотипов пациентов; по оси ординат количество пациентов, %

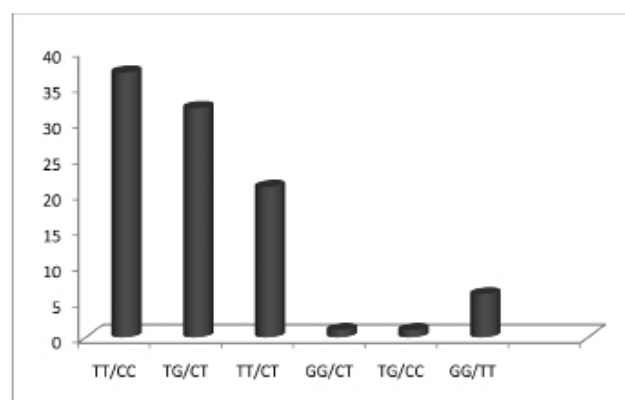


Рис. 2. Распределение больных с учетом генотипа по двум нуклеотидным последовательностям (rs 8099917 и rs 12979860). По оси абсцисс варианты генотипов пациентов; по оси ординат количество пациентов, %

СТ-26%; ГГ-СТ-2%; ТГ-СС-2%; ТГ-ТТ-7%; ТГ-СТ-41% (рис. 2). Таким образом, при сопоставлении данных по двум полиморфизмам гена интерлейкина 28В, полное совпадение наблюдается всего лишь в 50% случаев.

На рис. 3 представлены виды вирусологических ответов у больных с ХВГС при гетерозиготных генотипах ТГ (rs 8099917) ТС (rs 12979860). Как следует из рисунка, ранний вирусологический ответ наблюдается в 1,5 раза чаще при rs 12979860, чем при rs 8099917. То же можно сказать и про медленный вирусологический ответ, который при генотипе ТС (rs 12979860) наблюдается в два раза выше.

На рис. 4 представлены варианты вирусологического ответа, которые наблюдали у больных с хроническим вирусным гепатитом С при исследовании двух нуклеотидных последовательностей гена IL28B. При анализе rs 8099917 ранний вирусологический ответ может быть получен у 80% больных с генотипом ТТ. При этом при анализе rs 12979860 у всех больных с генотипом СС получен ранний вирусологический ответ, который совпадал с устойчивым вирусологическим ответом в 95% случаев ($p < 0,005$).

Если учитывать достижение вирусологического ответа по двум нуклеотидным последовательностям (рис. 5), то предсказать можно получение раннего ответа только в 50% случаев ($p < 0,005$), что ниже почти в два раза, чем

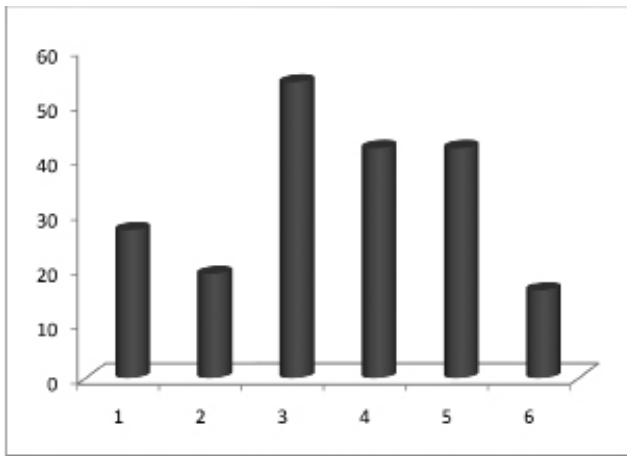


Рис. 3. Распределение видов вирусологических ответов (1 и 4 – ранний вирусологический ответ, 2 и 5 – медленный и 3 и 6 – отсутствие ответа) у пациентов с генотипом TG (1, 2, 3, при исследовании rs 8099917) и у пациентов с генотипом CT (4, 5, 6, при исследовании rs 12979860). По оси абсцисс виды вирусологического ответа; по оси ординат количество больных, % от количества с генотипом TG (или CT)

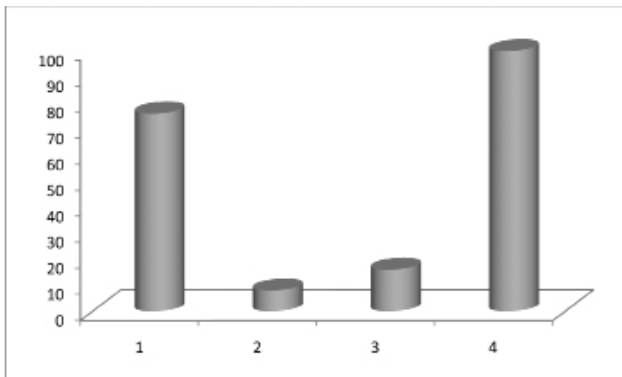


Рис. 4. Распределение видов вирусологических ответов (1 и 4 – ранний вирусологический ответ, 2 – медленный и 3 – отсутствие ответа) у пациентов с генотипом TT (1, 2, 3, при исследовании rs 8099917) и у пациентов с генотипом CC (4 при исследовании rs 12979860). По оси абсцисс виды вирусологического ответа; по оси ординат количество больных, % от всех выявленных пациентов с генотипом TT (или CC).

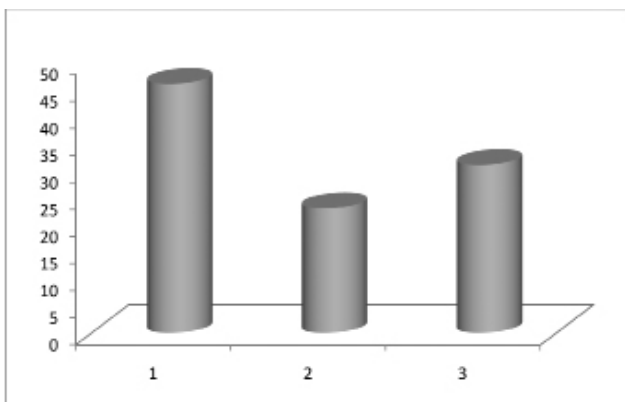


Рис. 5. Распределение видов вирусологических ответов при учете генотипа, полученного при исследовании двух нуклеотидных последовательностей TG/CT: 1- ранний вирусологический ответ, 2- медленный, 3- отсутствие ответа). По оси абсцисс виды вирусологического ответа; по оси ординат количество больных, % от всех выявленных пациентов с генотипом TG/CT

Достижение устойчивого вирусологического ответа в зависимости от генотипа больного ХВГС при исследовании вариантов полиморфизма интерлейкина 28В, %

Генотип пациента	Количество больных, достигших УВО, % от количества пациентов с данным генотипом		Количество больных, достигших УВО, % от общего количества исследованных пациентов (n=200)
	Вариант	Процент	
rs8099917	TG	30	12
	TT	80	48
rs12979860	CT	42	24
	CC	100	42

это имеет место в действительности. В таблице представлены данные анализа достижения устойчивого вирусологического ответа в зависимости от выявленного генотипа IL28В с учетом двух нуклеотидных последовательностей.

Суммарный процент достижения УВО при исследовании rs 8099917 достигает 60%, в то время как при исследовании rs 12979860 – 68%. Эти цифры сравнимы с данными литературы, в которых УВО предлагается предсказывать по достижению РВО [9]. По данным этих авторов, у больных с ХВГС РВО достигнут в 62–70%, ВТО время как УВО достигается практически у всех пациентов этой группы.

Сопоставление генотипов IL28В с формированием у больных устойчивого вирусологического ответа (УВО) (результаты, представленные в таблице) показало, что при генотипе TG/TT rs 8099917 и CT/CC rs 12979860 положительный ответ наблюдали в 60% – 68% случаев, полное отсутствие или медленное снижение вирусологической нагрузки в 32–40%.

Заключение

Наиболее эффективно использовать для прогноза заболевания нуклеотидную последовательность rs 12979860, так как при этом исследовании наблюдается большее количество совпадений с регистрацией у пациентов устойчивого вирусологического ответа. Кроме того, у пациентов с генотипом CT (rs 12979860) чаще встречается переход заболевания в хроническую форму гепатита, чем у пациентов с другими генотипами. Достоверное отличие, полученное при исследовании двух нуклеотидных последовательностей интерлейкина 28В, свидетельствует скорее всего об их различных функциях в организме человека.

Прогнозирование результата лечения хронических вирусных гепатитов по генотипу пациента с использованием анализа ОНП интерлейкина 28В статистически не отличается от использования для этих целей регистрации РВО. Однако, с помощью генотипа это можно сделать до начала лечения пациентов, избегая при этом финансовых затрат и нежелательных эффектов антивирусной терапии.

Кроме того, используя анализ ОНП, как показали многочисленные исследования различных авторов, можно прогнозировать формирование у больного гепатокарциномы с 98% вероятностью [11].

Список литературы находится в редакции