

В. В. Годован, К. В. Остапчук
Одеський національний медичний університет, м. Одеса

ЕФЕКТИВНІСТЬ ПРОТИВІРУСНОЇ ТЕРАПІЇ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ С ЗАЛЕЖНО ВІД ГЕНЕТИЧНИХ ПОЛІМОРФІЗМІВ CYP2E1

Дослідження впливу поліморфізмів гену *CYP2E1* на ефективність лікування хворих на хронічний гепатит С за стандартною схемою пегінтерферон+рибавірин виявило, що серед 33 пацієнтів генотип *DD* за поліморфізмом *CYP2E1*6* мали 24 (72,7 %) особи, *CD* – 9 (27,3 %). Гомозигот *CC* не виявили. При генотипі *CD* у хворих частіше спостерігались рання та швидка вірусологічні відповіді порівняно з хворими з генотипом *DD* (88,9 проти 45,8 %, $p = 0,026$). У пацієнтів з генотипом *CD* швидше (через 12 тижнів лікування) відновлювався рівень аланінамінотрансферази сироватки крові, ніж у хворих з генотипом *DD*. Лікування хворих на хронічний гепатит С пегінтерфероном з рибавірином було ефективнішим при наявності у них генотипу *CD*.

Ключові слова: хронічний гепатит С, ген *CYP2E1*, генетичні поліморфізми.

Хронічний гепатит С (ХГС) – це актуальна медико-соціальна проблема тому, що це захворювання погіршує якість життя хворого і призводить до розвитку таких ускладнень як цироз печінки та гепатоцелюлярна карцинома [15]. Стандартом лікування ХГС є комбінація пегільованого інтерферону (пегінтерферону) альфа з рибавірином [5]. Важливим показником ефективності інтерферонотерапії є стійка вірусологічна відповідь (СВВ) – відсутність детекції РНК вірусу через 24 тижня після закінчення лікування. Вважається, що 99 % пацієнтів, які досягли СВВ, повністю виліковані [5]. Однак СВВ при застосуванні цієї схеми фармакотерапії досягається тільки у 56-63 % хворих [5, 8]. Крім того, дане лікування супроводжується розвитком великої кількості ускладнень [5, 8]. Важливе значення також має висока вартість терапії [11].

У зв'язку з цим, виникла необхідність прогнозування результатів терапії. Перш за все, це дозволить на початковому етапі лікування відібрати пацієнтів, яким протипоказана інтерферонотерапія. По-друге, надасть можливість підібрати оптимальну схему лікування в умовах обмеженої матеріальної здатності пацієнтів. Для обґрунтованого прогнозу ефективності лікування важливо розуміння ймовірності розвитку СВВ у пацієнта, а, з іншого боку, вірогідності прогресії хвороби в найближчі роки, якщо лікування не буде призначено.

На розвиток СВВ, тобто ефективність фармакотерапії, впливають різні фактори: стать, вік, генетичні особливості, супутні захворювання інфікованої людини, а також генотип вірусу, рівень вірусного навантаження та рання вірусологічна відповідь на терапію тощо [1, 10]. Проте, велика частина неояснених розбіжностей у результатах лікування хворих на ХГС дозволяє припустити, що генетичні особливості інфікованої людини відіграють чималу роль у ерадикації вірусу при використанні пегінтерферону + рибавірину. На результати лікування можуть впливати поліморфізми генів білків, які беруть участь у фармакокінетиці та фармакодинаміці лікарських препаратів [2]. Система біотрансформації і транспортерів функціонує для елімінації лікарського засобу, а її активність є головним лімітуючим чинником, що визначає фармакокінетику препарату [2]. «Учасниками» цієї системи є ферменти I і II фаз біотрансформації [3]. Основним ферментом I фази біотрансформації є цитохром P-450 2E1 (*CYP2E1*), який експресується головним чином у печінки. Він бере участь у метаболізмі лікарських препаратів та активує багато преканцерогенів та претоксинів [13]. Генетичні поліморфізми можуть впливати на активність ферменту. Один із найбільш вивчених однонуклеотидних поліморфізмів в 5'-регуляторної області описано S. Hayashi та співав. (1991) [7]. Це заміна С на Т в позиції -1019. Поліморфізм позначають *CYP2E1*5B*. Найчастіше цей поліморфізм визначають за допомогою рестриктази *RsaI*. Аallel дикого типу (c1) має сайт рестрикції для *RsaI*. В мутантному алелі сайт рестрикції відсутній (мутантний аallel, c2). Частота мутантного алелю c2 у європейців становить 2-3 % [4]. У гомозигот c2/c2 спостерігається 10-кратне збільшення транскрипції гену *CYP2E1* і відповідно більша кількість ферменту [7].

Інший поліморфізм визначено у 6-му інтроні гену (*CYP2E1*6*). Це заміна Т на А у позиції 7632, що призводить до зникнення сайту рестрикції для рестриктази *DraI* [12]. Аallel дикого типу позначають літерою D. Він має сайт рестрикції для відповідної рестриктази. Мутантний аallel позначають С, сайт рестрикції відсутній. У популяції можливі 3 генотипи – DD, DC, CC. Мутантний аallel асоційовано із підвищеною транскрипцією гену *CYP2E1* [16]. Частота алеля С у європейців складає 11 % [14]. Проте в літературі відсутні дані стосовно впливу поліморфізму гену *CYP2E1* на ефективність лікування ХГС.

Метою роботи було здійснити аналіз впливу поліморфізмів *CYP2E1*5B* та *CYP2E1*6* гену *CYP2E1* на ефективність лікування хворих на хронічний гепатит С за схемою пегінтерферон + рибавірин.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження проведено згідно вимог комісії з питань біоетики Одеського національного медичного університету (протокол № 23 від 22.06.2012 р.). Обстежено 33 хворих

на ХГС (28 чоловік та 5 жінок віком 22-48 років), які проходили лікування в Одеській клінічній міській інфекційній лікарні у період з 2009 по 2013 р.р. Всі пацієнти отримували протівірусну фармакотерапію за схемою: пегінтерферон- α -2а (підшкірно в область передньої черевної стінки і стегон по 180 мкг на тиждень) + рибавірин (перорально по 1000 мг на добу) згідно з Протоколом МОЗ України терапії ХГС від 08.10.2007 № 626. Проведено ретроспективний аналіз особливостей перебігу захворювання та лікування пацієнтів на підставі їх історій хвороб. Клінічний діагноз підтверджено за допомогою клініко-лабораторних та молекулярно-генетичних (полімеразна ланцюгова реакція) методів дослідження. У дослідження не включали хворих з гепатитом іншої етіології та хронічною супутньою патологією.

Геномну ДНК виділяли з венозної крові пацієнтів. Поліморфізм СYP2E1*5В гену СYP2E1 визначали за методикою S. Hayashi et al. (1991) [7]. Поліморфізм СYP2E1*6 визначали за методикою S. Kato et al. (1992) [9]. Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі «Терцик» фірми «ДНК технологія» (Росія). У реакції використовували набір реактивів фірми «Литех» (Росія, Москва). При аналізі поліморфізму СYP2E1*5В гомозигот за диким алелем позначали с1/с1, гомозигот за мутантним алелем – с2/с2 та гетерозигот – с1/с2. При аналізі поліморфізму СYP2E1*6 гомозигот за диким типом позначали DD, гомозигот за мутантним алелем – CC та гетерозигот – CD.

Ефективність лікування оцінювали за вірусологічною та біохімічною відповідями з урахуванням генотипів за геном СYP2E1. Вірусне навантаження < 800,000 МО/мл до початку лікування вважали низьким, і > 800,000 МО/мл – високим. Для оцінки ефективності лікування аналізували швидку вірусологічну відповідь (ШВВ) – відсутність РНК вірусу через 4 тижня лікування, ранню вірусологічну відповідь (РВВ) – відсутність РНК вірусу через 12 тижнів лікування, уповільнену вірусологічну відповідь (УВВ) – відсутність РНК вірусу через 24 тижня лікування а також відсутність відповіді (ВВ) – безперервна вірусемія. Біохімічну відповідь аналізували за швидкістю відновлення рівня показника цитолізу – аланінамінотрансферази (АлАТ) сироватки крові. Рівень АлАТ сироватки крові аналізували до початку лікування, через 12 та 24 тижня терапії. Контрольна група була представлена 64 здоровими донорами (20 жінок і 44 чоловіка середнім віком 30 років), зразки крові яких та дані лабораторних досліджень отримали у Одеській обласній станції переливання крові.

Статистична обробка результатів була проведена за допомогою програм «Statistica v.5.0» та «Microsoft Excel».

Результати дослідження та їх обговорення. За даними молекулярно-генетичного дослідження серед хворих на ХГС усі обстежені мали генотип с1/с1. Генотипи с2/с2 і с1/с2 не виявили, тому в подальшому не вивчали вплив поліморфізму СYP2E1*5В на ефективність лікування ХГС. Генотип DD мали 24 (72,7 %) хворих, генотип CD – 9 (27,3 %), гомозигот за мутантним алелем CC не було виявлено.

Оскільки велике прогностичне значення розвитку СВВ є вірусне навантаження до початку лікування, був проаналізовано цей показник у хворих, що обстежувалися. Серед них у 15 (45,5 %) виявлено низьке вірусне навантаження та у 18 (54,5 %) – високе. Серед хворих з генотипом CD у 4 (44,4 %) відзначалось низьке вірусне навантаження та у 5 (55,6 %) – високе. Серед пацієнтів з генотипом DD у 11 (45,8 %) було низьке вірусне навантаження та у 13 (54,2 %) – високе. Немає істотних відмінностей у вірусному навантаженні у хворих з генотипами CD та DD ($p=0,745$).

Не менш важливими у прогнозуванні розвитку СВВ є швидка та рання вірусологічні відповіді. Серед обстежених хворих ШВВ і РВВ відзначалось у 19 (57,6 %) пацієнтів, УВВ – у 10 (30,3 %) і ВВ – у 4 (12,1 %). Серед хворих з ШВВ і РВВ генотип CD мали 8 (42,4 %) пацієнтів, генотип DD – 11 (57,9 %) осіб. Всі хворі з УВВ мали генотип DD (10 осіб, 100,0 %). Серед хворих, у яких була відсутня відповідь на проведену фармакотерапію, 1 (7,1 %) пацієнт мав генотип CD та 13 (92,8 %) – мали генотип DD. Для того, щоб з'ясувати різницю у вірусологічній відповіді на пегінтерферонотерапію у хворих з різними генотипами за поліморфізмом СYP2E1*, були поєднано в одну групу пацієнти з ШВВ та РВВ (ШВВ+РВВ) та у другу групу – пацієнти з УВВ та ВВ (УВВ+ВВ). Частота ШВВ+РВВ та УВВ+ВВ у хворих з різними генотипами за поліморфізмом СYP2E1*6 наведена у рис. 1.

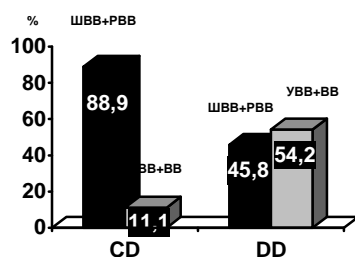


Рис. 1. Частота (%) ШВВ+РВВ та УВВ+ВВ у хворих з різними генотипами за поліморфізмом СYP2E1*6 (достовірність при порівнянні хворих з генотипами CD і DD $p=0,026$).

Серед 9 хворих з генотипом CD у 8 (88,9 %) осіб була ШВВ+РВВ та у 1 (11,1 %) УВВ+ВВ. Серед 24 хворих з генотипом DD у 11 (45,8 %) осіб була ШВВ+РВВ та у 13 (54,2 %) – УВВ+ВВ. Таким чином, значно більша частина хворих з генотипом CD мають ШВВ+РВВ ніж хворі з генотипом DD (88,9 проти 45,8 %, $p = 0,026$). Відповідно у достовірно більшій частині хворих, які мають генотип DD, була УВВ+ВВ ніж у пацієнтів з генотипом CD (54,2 % проти 11,1 %, $p=0,026$).

Відомо, що у хворих, які досягли ШВВ та РВВ, значно підвищуються шанси досягти СВВ (майже у 90 % [6]). Враховуючи дані цього дослідження, можна зробити висновок, що генотип CD може бути предикторним фактором розвитку СВВ серед хворих на ХГС, які проходять лікування за схемою пегінтерферон+рибавірин.

Важливим критерієм ефективності терапії ХГС є динаміка рівня АлАТ сироватки крові. Тому спочатку був проведений аналіз середніх рівнів даного ферменту у контрольній групі і хворих на ХГС з генотипами CD та DD за поліморфізмом *CYP2E1**6 (табл. 1). Не відзначалось істотних відмінностей у середньому рівні АлАТ сироватки крові у осіб контрольної групи із генотипами CD і DD (відповідно $0,38 \pm 0,15$ і $0,40 \pm 0,14$ ммоль/л-год, $p=0,739$). У хворих на ХГС до початку лікування середній рівень АлАТ сироватки крові становив $1,63 \pm 1,2$ ммоль/л-год. Причому не було істотної різниці за цим показником у хворих з генотипами CD і DD (відповідно $1,55 \pm 1,66$ і $1,83 \pm 1,16$ ммоль/л-год, $p=0,584$). Через 12 тижнів лікування спостерігалась тенденція до зниження середнього рівня АлАТ крові серед хворих з генотипом CD порівняно з пацієнтами з генотипом DD ($0,49 \pm 0,09$ проти $0,81 \pm 0,59$ ммоль/л-год, $p=0,495$). Така тенденція відзначалась також через 24 тижня лікування: вміст цього ферменту в крові хворих з генотипом CD становив $0,32 \pm 0,11$ ммоль/л-год, а у хворих з генотипом DD $0,65 \pm 0,53$ ($p=0,079$).

Таблиця 1

Динаміка середніх рівнів АлАТ сироватки крові (ммоль/л-год) у хворих на ХГС залежно від поліморфізму *CYP2E16 гену *CYP2E1***

Термін визначення	Показники	Генотипи хворих		p (DD-CD)
		DD	CD	
Контроль (здорові особи)	M±m %	$0,40 \pm 0,14$ 100	$0,38 \pm 0,1$ 100	0,739
До початку лікування	M±m % (2-1) p (2-1)	$1,83 \pm 1,16$ 457,5 0,0006	$1,55 \pm 1,66$ 407,9 0,042	0,584
Через 12 тижнів лікування	M±m % (3-1) p (3-1)	$0,81 \pm 0,59$ 202,5 0,001	$0,49 \pm 0,09$ 128,9 0,136	0,495
Через 24 тижня лікування	M±m % (4-1) p (4-1)	$0,65 \pm 0,53$ 162,5 0,021	$0,32 \pm 0,11$ 84,2 0,149	0,079

Наступним етапом дослідження була оцінка динаміки відновлення рівня АлАТ сироватки крові у хворих з різними генотипами порівняно з контрольною групою (див. табл. 1). У хворих з генотипом CD швидше відновлявся середній рівень АлАТ сироватки крові ніж у хворих з генотипом DD. Так, у пацієнтів з генотипом CD до початку лікування спостерігались значно вищі показники АлАТ сироватки крові ніж у здорових осіб (на 307,9 %, $p=0,042$). Вже через 12 тижнів лікування не було істотних відмінностей у середніх рівнях АлАТ сироватки крові у хворих на ХГС та у контролі (відповідно $0,49 \pm 0,09$ і $0,38 \pm 0,15$ ммоль/л-год, $p=0,136$). Через 24 тижнів з початку фармакотерапії пегінтерфероном і рибавірином вміст даного ферменту в сироватки крові залишався в межах здорових осіб і навіть дещо нижчий за контрольних значень (на 15,7 %, $p=0,149$). Інша картина спостерігалась серед пацієнтів з генотипом DD. Середні рівні АлАТ сироватки крові у хворих були значно вищі ніж в контрольній групі не тільки до початку лікування, а й через 12 та 24 тижнів. Так, через 12 і 24 тижнів лікування у хворих на ХГС з генотипом DD середній рівень АлАТ був в межах здорових осіб, але більш високим порівняно з контрольною групою (відповідно на 102,5 і 62,5 %, $p<0,05$).

Кращі результати лікування пегінтерфероном+рибавірином хворих на ХГС з генотипом CD підтверджуються також при аналізі відсотка хворих, які мали рівень АлАТ у межах здорових осіб ($0,1-0,68$ ммоль/л-год) серед пацієнтів з різними генотипами. До лікування серед хворих з генотипом CD рівень АлАТ крові здорових осіб мали 4 (44,4 %) пацієнтів, з генотипом DD - 4 (16,7 %), $p=0,097$. Через 12 тижнів лікування у значно більшій частині хворих з генотипом CD відзначались відновлені рівні АлАТ крові ніж з генотипом DD: 8 (88,9 %) проти 12 (50,0 %), $p=0,042$. Через 24 тижня рівень АлАТ сироватки крові відновлювався у всіх хворих (9, 100,0 %) з генотипом CD та 17 (65,4 %) – з генотипом DD, $p=0,068$.

Таким чином, у хворих на ХГС, які мали в генотипі мутантний алель С (з підвищеною транскрипцією гену), спостерігались кращі результати лікування пегінтерфероном+рибавірином.

Висновки

1. Поліморфізм *CYP2E1**6 не впливав на вірусне навантаження до початку лікування хворих на хронічний гепатит С. У хворих на хронічний гепатит С, які мали генотип CD за поліморфізмом *CYP2E1**6, частіше спостерігались швидка та рання вірусологічні відповіді ніж у хворих з генотипом DD при лікуванні пегінтерфероном+рибавірином.
2. Поліморфізм *CYP2E1**6 не впливав на середній рівень АлАТ сироватки крові у здорових мешканців Одеського регіону.
3. У пацієнтів на хронічний гепатит С з генотипом CD швидше (через 12 тижнів лікування) відновлювався рівень АлАТ сироватки крові, ніж у хворих з генотипом DD.

4. Лікування хворих на хронічний гепатит С за стандартною схемою пегінтерферон + рибавірин було ефективнішим при наявності у них генотипу *CD*.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується вивчення впливу поліморфізму *CYP2E1*6* на віддалені результати лікування ХГС.

Список літератури

1. Блюм Х. Е. Гепатит С: современное состояние проблемы / Х. Е. Блюм // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2005. – Т. 15, № 1. – С. 20-25.
2. Кулес В. Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты / В. Г. Кулес. – М.: Реафарм, - 2004. – 203 с.
3. Лакин К. М. Биотрансформация лекарственных веществ / К. М. Лакин, Ю. Ф. Крылов. – М.: Медицина. – 1981. – 193 с.
4. Carriere V. Human cytochrome P450 2E1 (CYP2E1): from genotype to phenotype / V. Carriere, F. Berthou, S. Baird [et al.] // Pharmacogenetics. – 1996. – Vol. 6. – P. 203–211.
5. Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection // J. Hepatol. – 2011. – Vol. 55. – P. 245–264.
6. Ferenci P. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 24 weeks in hepatitis C type 1 and 4 patients with rapid virological response / P. Ferenci, H. Laferl, T. M. Scherzer [et al.] // Gastroenterology. – 2008. – Vol. 135, № 2. – P. 451–458.
7. Hayashi S. Genetic polymorphisms in the 5-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIIE1 gene / S. Hayashi, J. Watanabe, K. Kawajiri // J Biochem. – 1991. – Vol. 110. – P. 559–565.
8. Hadziyannis S. J. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose / S. J. Hadziyannis, H. Sette, T. R. Morgan [et al.] // Ann Intern Med. – 2004. – Vol. 140. – P. 346–355.
9. Kato S. Cytochrome P450IIIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk / S. Kato, P. G. Shields, N. E. Caporaso [et al.] // Cancer Res. – 1992. – Vol. 1, № 52(23). – P. 6712–6715.
10. McHutchison J. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection / J. McHutchison, E. Lawitz, M. Shiffman [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2009. – Vol. 361. – P. 580–593.
11. Matteo R. Economic Assessment of an Anti-HCV Screening Program in Italy / R. Matteo, S. Coretti, A. Gasbarrini [et al.] // Value in health. – 2013. – Vol. 16. – P. 965–972.
12. Persson I. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer / I. Persson, I. Johansson, H. Bergling [et al.] // FEBS Lett. – 1993. – Vol. 319. – P. 207–211.
13. Ramaiah S. K. Cytochrome P4502E1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats / S. K. Ramaiah, U. Apte, H. M. Mehendale // Drug Metab Dispos. – 2001. – Vol. 29. – P. 1088-1095.
14. Stephens E. A. Ethnic variation in the *CYP2E1* gene: polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-Americans and Taiwanese / E. A. Stephens, J. A. Taylor, N. Kaplan [et al.] // Pharmacogenetics. – 1994. – Vol. 4. – P. 185–192.
15. Wong J. B. Estimating future hepatitis C morbidity, mortality and costs in the United States / J. B. Wong, G. M. McQuillan, J. G. McHutchison [et al.] // Am J Public Health. – 2000. – Vol. 90, № 10. – P. 1562–1569.
16. Wang S. M. Frequencies of genotypes and alleles of the functional SNPs in *CYP2C19* and *CYP2E1* in mainland Chinese Kazakh, Uyghur and Han populations / S. M. Wang, A. P. Zhu, D. Li [et al.] // J. Hum. Genet. – 2009. – Vol. 54. – P. 372–375.

Реферати

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ *CYP2E1*

Годован В. В., Остапчук Е. В.

Исследование влияния полиморфизмов гена *CYP2E1* на эффективность лечения больных хроническим гепатитом С по стандартной схеме пегинтерферон + рибавирин выявило, что среди 33 пациентов генотип *DD* по полиморфизму *CYP2E1*6* имели 24 (72,7 %) человека, *CD* - 9 (27,3 %). Гомозигот *CC* не обнаружили.

При генотипе *CD* у больных чаще наблюдались ранний и быстрый вирусологические ответы по сравнению с больными, имеющими генотип *DD* (соответственно 88,9 и 45,8 %, $p = 0,026$). У пациентов с генотипом *CD* быстрее (через 12 недель лечения) восстанавливался уровень аланинамино-трансферазы сыворотки крови, чем у больных с генотипом *DD*.

Лечение больных хроническим гепатитом С пегинтерфероном с рибавирином было более эффективным при наличии у них генотипа *CD*.

Ключевые слова: хронический гепатит С, ген *CYP2E1*, генетические полиморфизмы.

Статья надійшла 18.02.2014 р.

EFFICIENCY OF ANTIVIRAL THERAPY OF CHRONIC HEPATITIS C DEPENDING ON GENE POLYMORPHISMS OF *CYP2E1*

Godovan V. V., Ostapchuk E. V.

The effect of *CYP2E1* gene polymorphisms on the efficiency of the treatment of chronic hepatitis C by peginterferon+ribavirin was studied in 33 patients. Among them genotype *DD* by polymorphism *CYP2E1*6* had 24 (72,7 %) patients, genotype *CD* - 9 (27,3%) patients.

Genotype *CC* was not revealed. Patients with genotype *CD* more often had early and rapid virological responses compared to the patients with genotype *DD* (respectively 88,9% and 45,8 %, $p = 0,026$). Patients with genotype *CD* restored the level of serum alanine aminotransferase faster (after 12 weeks of treatment) than the patients with genotype *DD*.

Treatment of the patients with chronic hepatitis C with peginterferon and ribavirin was more effective if they had genotype *CD*.

Key words: chronic hepatitis C, gene *CYP2E1*, genetic polymorphisms.

Рецензент Катеринчук І.П.