

УДК 616.36-002.2:616-037-08+575.11+577.21

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *IFNL4* –
НОВИЙ ФАРМАКОГЕНЕТИЧНИЙ МАРКЕР
ЕФЕКТИВНОСТІ ТЕРАПІЇ ХРОНІЧНОГО ВІРУСНОГО ГЕПАТИТУ С

А.М. Кучеренко,¹ К.Ю. Романчук,² В.М. Пампуха,¹ Л.В. Мороз,² Л.А. Лівшиць²

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ, Україна

² Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, м. Вінниця, Україна

Метою даного дослідження є дослідження асоціації поліморфного варіанта ss469415590 гена *IFNL4* з ефективністю відповіді на противірусну терапію хронічного вірусного гепатиту С. У досліджувану групу увійшли пацієнти з підтвердженим клінічним діагнозом ХГС (n=67), виключно з I-им генотипом вірусу.

Відносний ризик поганої відповіді на комбіновану противірусну терапію пег-інтерфероном у носіїв алеля ss469415590 ΔG зростає більш ніж в шість разів (OR=6,25; 95% ДІ: 1,82 - 21,43).

Отже, алельний варіант ss469415590 ΔG є інформативним маркером прогнозу ефективності комбінованої противірусної терапії пег-інтерфероном-α2а з рибавирином пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С з I-м генотипом вірусу.

Ключові слова: гепатит С, фармакогенетичний маркер, *IFNL4*

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *IFNL4* –
НОВЫЙ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР
ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ
ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

А.М. Кучеренко,¹ К.Ю. Романчук,² В.Н. Пампуха,¹ Л.В. Мороз,² Л.А. Лившиць²

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев, Украина

² Винницкий национальный медицинский университет им. М.И. Пирогова, г. Винница, Украина

Целью данного исследования является исследование ассоциации полиморфного варианта ss469415590 гена *IFNL4* с эффективностью ответа на противовирусную терапию хронического вирусного гепатита С. В исследуемую группу вошли пациенты с подтвержденным клиническим диагнозом ХГС (n = 67), исключительно с I-м генотипом вируса.

Относительный риск отрицательного ответа на комбинированную противовирусную терапию пег-интерфероном у носителей аллеля ss469415590 ΔG возрастает более чем в шесть раз (OR = 6,25; 95% ДИ: 1,82 – 21,43).

Таким образом, аллельный вариант ss469415590 ΔG является информативным маркером прогноза эффективности комбинированной противовирусной терапии пег-интерфероном α2a с рибавирином у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С с I генотипом вируса.

Ключевые слова: гепатит С, фармакогенетический маркер, *IFNL4*

***IFNL4* GENE POLYMORPHISM –
NEW PHARMACOGENETIC MARKER
OF CHRONIC HEPATITIS C TREATMENT EFFICIENCY**

A. Kucherenko,¹ K. Romanchuk,² V. Pampukha,¹ L. Moroz,² L. Livshits²

¹ Institute of molecular biology and genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

² Vinnytsya national medical university named after M.I. Pyrohov, Vinnytsya, Ukraine

The purpose of this research is to study the association of *IFNL4* gene polymorphic variant ss469415590 with efficiency of response to antiviral therapy of chronic hepatitis C. The research group included patients with confirmed clinical diagnosis of CHC (n = 67), only I genotype of the virus.

The relative risk of poor response to combined antiviral pegylated interferon therapy in carriers of allele ss469415590 ΔG increases by more than six times (OR = 6,25; 95% CI: 1.82 - 21.43).

Thus, allelic variant ss469415590 ΔG is informative marker of combination pegylated interferon-α2a / ribavirin antiviral therapy effectiveness prognosis in patients with chronic hepatitis C viral genotype I.

Key words: hepatitis C, pharmacogenetic marker, *IFNL4*

Вступ. Хронічний вірусний гепатит С (ХГС) є всесвітньою медичною проблемою. За останніми даними, число осіб, уражених цією інфекцією в світі сягає 150 млн. [1]. Відкриття впливу індивідуальних особливостей генотипу вірусу в поєднанні з генотипом організму хазяїна на результат лікування стало важливою віхою в галузі розробки

стратегій противірусної терапії [2–4]. Однією з найефективніших в лікуванні ХГС виявилась схема з використанням комбінації інтерферону-α та рибавірину [5, 6]. Додаткова модифікація інтерферону-α поліетиленгліколем з утворенням пег-інтерферону подовжує час існування активної форми молекули та значно спрощує процес лікування

пацієнта. Проте, через деякий час після впровадження в широку медичну практику комбінованої противірусної терапії пегільованими інтерферонами у комбінації з рибавирином, були помічені значні відмінності в ефективності терапії у пацієнтів з першим генотипом вірусу [4]. За результатами повногеномного дослідження асоціації (GWAS) було доведено зв'язок поліморфних варіантів rs12979860 та rs8099917 гена *IL28B* з ефективністю противірусної терапії у пацієнтів з хронічним гепатитом С (вірус генотипу I), а також спонтанним вірусологічним кліренсом [7]. Цікаво, що ця асоціація показала суттєві етнічні розбіжності [8]. Однак, істотним недоліком для подальших досліджень була відсутність очевидного молекулярного механізму, який лежить в основі цих закономірностей. Відкриття раніше невідомих транскриптів, експресія яких в гепатоцитах була індукована в результаті впливу вірусу гепатиту С, призвело до значного прогресу в галузі досліджень асоціації індивідуальних особливостей геному з характеристиками перебігу ХГС та ефективністю противірусної терапії [9]. Було показано, що динуклеотидний поліморфний варіант ss469415590 створює відкриту рамку зчитування – *IFNL4* (інтерферон лямбда 4) [9,10]. Цей поліморфізм, як повідомлялося, у деяких популяціях знаходився в нерівноваженому зчепленні з rs12979860 гена *IL28B* [11].

За результатами попередніх досліджень встановлено, що поліморфний варіант rs12979860 гена *IL28B* асоційований з ефективністю комбінованої противірусної терапії пегільованим

інтерфероном - $\alpha 2a$ серед пацієнтів України [12,13]. Окрім того, наше популяційне дослідження вказує на нерівновагу за зчепленням між поліморфізмами ss469415590 та rs12979860 ($p > 0.0001$) у популяції України; мажорні алелі ss469415590 ТТ та rs12979860 С знаходяться у фазі зчеплення [14]. Таким чином, ss469415590 гена *IFNL4* є перспективним геном-кандидатом для дослідження асоціації індивідуальних особливостей відповіді на противірусну терапію ХГС з 1 генотипом вірусу, що і стало метою даного дослідження.

Матеріали і методи. У досліджувану групу увійшли пацієнти з підтвердженим клінічним діагнозом хронічного вірусного гепатиту С ($n=67$). В цю групу увійшли пацієнти виключно з I-им генотипом вірусу. У всіх пацієнтів було виявлено РНК ВГС протягом не менш ніж 6-ти місяців та були виключені супутні вірусні інфекції (ВІЛ, гепатит В) та інші хвороби печінки. Рівень вірусологічного навантаження до початку терапії визначався за допомогою кількісної ПЛР з чутливістю детекції 75 МО/мл. Проміжну оцінку вірусологічного навантаження проводили на 4, 12, 24, 48 тижні лікування та через 24 тижні після завершення терапії. У дослідженні брали участь особи, які раніше не отримували комбінованої противірусної терапії. Усі пацієнти отримували терапію пег-інтерфероном- $\alpha 2a$ (Пегасис) у дозуванні 180 мкг на тиждень у комбінації з рибавирином (Копегус) у дозуванні 15 мкг/кг на добу. Відповідно до динаміки вірусологічного навантаження пацієнти були поділені на дві групи: особи без досягнення стійкої вірусологічної

відповіді (СВВ) (n=29) та контрольну групу з досягненням СВВ (n=38). Згідно з основними правилами біоетики при використанні людини в ролі об'єкта дослідження, була отримана інформована згода на проведення даного дослідження від усіх досліджуваних пацієнтів, та було введено номенклатуру зразків ДНК, яка включала числовий код.

ДНК виділяли за допомогою стандартного методу – шляхом гідролізу лізатів клітин протеїназою К з наступною фенольною екстракцією. Для проведення аналізу поліморфного варіанта ss469415590 гена *IFNL4* ми створили методику з використанням алель-специфічної ПЛР [14]. Розрахунки проводили з використанням програмних пакетів GenePop та OpenEpi [15,16]. Частоти алелів та теоретично очікуваний розподіл генотипів розраховували за методом, запропонованим Лі. Для виявлення значимих відмінностей між досліджуваними групами використовували точний критерій Фішера. Для оцінки відносного ризику розраховували від-

ношення шансів (OR) – співвідношення шансів прояву певного стану дихотомічної змінної в двох групах суб'єктів.

Результати дослідження та їх обговорення. З метою встановлення можливої ролі поліморфного варіанта ss469415590 гена *IFNL4*, в якості фармакогенетичного маркера прогнозу ефективності комбінованої протівірусної терапії пег-інтерфероном-α2а у комбінації з рибавірином, ми проаналізували розподіл генотипів та алельних варіантів за цим локусом у групі пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С. Отримані дані про розподіл генотипів та алельних варіантів за локусом ss469415590 гена *IFNL4* наведені в табл. 1.

За результатами порівняльного аналізу встановлено вірогідно вищу частоту (p<0,05) носіїв алельного варіанта ss469415590 ΔG у групі пацієнтів, що не досягли стійкої вірусологічної відповіді після комбінованої протівірусної терапії пег-інтерфероном-α2а у комбінації з рибавірином (0,862), порівняно з групою пацієнтів, що

Таблиця 1.

Розподіл генотипів за поліморфним варіантом ss469415590 гена *IFNL4* у пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С з різною ефективністю терапії пег-інтерфероном

ss469415590 генотип	Пацієнти зі стійкою відповіддю		Пацієнти з поганою відповіддю		Відношення шансів		
	n	%	n	%	P	OR	95% ДІ
ТТ ТТ	19	50,0	4	13,8	0.002	0.16	0.05 – 0.55
ТТ ΔG	16	42,1	17	58,6		6.25	1.82 – 21.43
ΔG ΔG	3	7,9	8	27,6			
Усього	38		29				
Алель							
ТТ		71,1		43,1	0.001	0.31	0.15 – 0.63
ΔG		28,9		56,9		3.24	1.58 – 6.64

досягли СВВ (0,500). Отримані дані про асоціацію алеля з поганою відповіддю на терапію вкладається в домінуючу модель успадкування. За результатами розрахунку показника відношення шансів, ризик поганої відповіді на комбіновану противірусну терапію пег-інтерфероном у носіїв алеля ss469415590 ΔG зростає більш ніж в шість разів (OR=6,25; 95% ДІ: 1,82 – 21, 43).

Отже, алельний варіант ss469415590 ΔG є інформативним фармакогенетичним маркером прогнозу ефективності комбінованої противірусної терапії пег-інтерфероном- $\alpha 2a$ з рибавирином серед пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С з I генотипом вірусу.

Отримані дані про асоціацію поліморфного варіанта ss469415590 з ефективністю відповіді на комбіновану противірусну терапію узгоджуються з деякими попередніми дослідженнями, які показали, що продукція IFN- $\lambda 4$ пов'язана з нездатністю елімінувати вірус гепатиту С у відповідь на лікування [10, 17].

IFN- $\lambda 4$ продукується лише тими особами, які мають ss469415590 ΔG алель. За своєю структурою IFN- $\lambda 4$ найбільше нагадує IFN- $\lambda 3$, але ці білки мають тільки 29% спільності амінокислотної послідовності, і, в порівнянні з IFN- $\lambda 3$, секреція IFN- $\lambda 4$ є значно слабшою [9, 18, 19].

На відміну від інших інтерферонів III типу, IFN- $\lambda 4$ має, очевидно, негативний вплив на механізми противірусного захисту. Наявні шляхи впливу рівня IFN- $\lambda 4$ на ефективність противірусної терапії гепатиту С. На даний момент

сформовано декілька гіпотез [11]. Перша з них сфокусована на впливі IFN- $\lambda 4$ на експресію інтерферон-стимульованих генів (ISG). Було доведено, що IFN- $\lambda 4$ долучається до сигнального каскаду за рахунок утворення комплексу з IFN- λ рецептором та може індукувати експресію IFN-стимульованих генів через Янус-кіназний шлях передачі й активації транскрипційного сигнального шляху [19]. Дослідженнями доведено, що особи з ss469415590 ΔG алелем в генотипі, який створює відкриту рамку зчитування для транскрипції *IFNL4*, можуть продукувати низькі рівні IFN- $\lambda 4$ білка, який в свою чергу, індукує слабку, але стійку експресію інтерферон-стимульованих генів у печінці; робить ці клітини несприйнятливими до стимуляції за допомогою інтерферону- α [9, 19]. Було показано, що у таких осіб базальний рівень експресії інтерферон-стимульованих генів дещо вищий, і вони з меншою вірогідністю ефективно реагують на терапію пег-інтерфероном та рибавирином [10, 17].

З іншого боку, друга гіпотеза бере до уваги вплив продукції і секреції IFN- $\lambda 4$ на стан гепатоцитів. Існують експериментальні свідчення про порушення процесу секреції IFN- $\lambda 4$ клітинами печінки, ймовірно, за рахунок не ефективного пост-транскрипційного глікозилювання [19]. Це призводить до інтрацелюлярного накопичення неглікозилюваного IFN- $\lambda 4$, який може мати цитотоксичну дію та сприяти загибелі гепатоцитів [11, 19]. Такий вплив може додатково погіршувати стан пацієнтів з ХВГС, посилюючи негативний вплив інфекційного процесу на стан печінки.

Висновки. Таким чином, поліморфний варіант ss469415590 гена *IFNL4* є не лише інформативним, але й, з точки зору молекулярних особливостей перебігу вірусної інфекції, – функціонально об-

ґрунтованим фармакогенетичним маркером ефективності комбінованої противірусної терапії пег-інтерфероном- $\alpha 2a$ та рибавірином серед пацієнтів з ХГС (генотип вірусу I).

Література

1. Mohd Hanafiah K. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. // *Hepatology*. – 2013. - 57, (4). – P. 1333–1342.
2. Mukherjee R. et al. Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection. // *J. Lab. Autom.* – 2015. – P: 2211068214563794.
3. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. // *J. Gen. Virol.* – 2004. - 85, (11). – P. 3173–3188.
4. Rau M., Baur K., Geier A. Host Genetic Variants in the Pathogenesis of Hepatitis C // *Viruses*. – 2012. - 4, (12). – P. 3281–3302.
5. Fried M.W. et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. // *N. Engl. J. Med.* – 2002. - 347, (13). – P. 975–982.
6. Kanda T., Yokosuka O. Pegylated interferon-alfa plus ribavirin therapies for chronic hepatitis C. // *JNMA. J. Nepal Med. Assoc.* - 51, (181). – P. 41–48.
7. Tanaka Y. et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. // *Nat. Genet.* – 2009. - 41, (10). – P. 1105–1109.
8. Hajarizadeh B., Grebely J., Dore G.J. Epidemiology and natural history of HCV infection. // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2013. - 10, (9). – P. 553–562.
9. Prokunina-olsson L. et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus // *Nat. Genet. Nature Publishing Group*, – 2013. - 45, (2). – P. 164–171.
10. Meissner E.G. et al. IFNL4 - Δ G Genotype Is Associated With Slower Viral Clearance in Hepatitis C, Genotype-1 Patients Treated With Sofosbuvir and Ribavirin// *Journal of Infectious Diseases* – 2014. – P. 1–5.
11. O'Brien T.R., Prokunina-Olsson L., Donnelly R.P. IFN- $\lambda 4$: The Paradoxical New Member of the Interferon Lambda Family. // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2014. - 30, (8). – P. 555–564.
12. Мороз Л.В. (Вінницький національний медичний університет імені М.І.П. et al. Прогностичне значення поліморфізму гена IL-28b щодо успішності противірусної терапії у хворих на хронічний гепатит С // *Сучасна гастроентерологія*. – 2011. (2 (58)). – P. 24–26.
13. Pampukha V.M. et al. IFN- λ -3 (IL28B) genotyping by restriction fragment length polymorphism method: detection polymorphism of rs12979860 // *Biopolym. Cell.* – 2011. - 27, (3). – P. 231–234.
14. Kucherenko A.M., Pampukha V.M., Livshits L.A. Study on the IFNL4 gene ss469415590 variant in Ukrainian population // *Biopolym. Cell.* – 2014. - 30, (5). – P. 400–402.
15. Rousset F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux // *Mol. Ecol. Resour. Blackwell Publishing Ltd*, – 2008. - 8, (1). – P. 103–106.
16. Sullivan K.M., Dean A., Soe M.M. OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. // *Public Heal. Rep.* – 2009. - 124, (3). – P. 471–474.
17. Aka P. V et al. Association of the IFNL4 - Δ G Allele With Impaired Spontaneous Clearance of Hepatitis C Virus.// *Journal of Infectious Diseases* – 2013. – P. 1–5.
18. Amanzada A. et al. Interferon- λ 4 (IFNL4) Transcript Expression in Human Liver Tissue Samples. – 2013. - 8, (12). – e84026.
19. Hamming O.J. et al. Interferon lambda 4 signals via the IFN λ receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. // *EMBO J.* – 2013. - 32, (23). – P. 3055–3065.