

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ IL-28В У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С, ПРОЖИВАЮЩИХ В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ УКРАИНЫ

А. Аппельханс¹, Ю.И. Бажора³, Е.Л. Бахчеван¹, О.В. Борисова¹, В.А. Мозговая²,
Е.Н. Усыченко³, Е.М. Усыченко³

¹ Немецкий диагностический центр св. Павла, Одесса, Украина

² Одесская городская клиническая инфекционная больница, Одесса, Украина

³ Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

В статье представлены результаты генетического обследования (генотипы IL-28В) 272 больных хроническим гепатитом С, проживающих в различных регионах Украины. Результаты обследования пациентов получены при проведении проекта «Доказательная медицина – определение маркера успеха лечения гепатита С. Экономическая и социальная эффективность» сотрудниками Международного Альянса ВИЧ/СПИД в Украине. Проведен анализ генотипов пациентов между собой (по регионам) и вирусологическим ответом на противовирусную терапию.

Ключевые слова: хронический гепатит С, тактика противовирусной терапии, материальная эффективность лечения.

АНАЛІЗ ЧАСТОТИ ГЕНОТИПІВ ІL-28В У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕПАТИТ С, ЯКІ ПРОЖИВАЮТЬ В РІЗНИХ РЕГІОНАХ УКРАЇНИ.

О. Аппельханс¹, Ю.И. Бажора³, О.Л. Бахчеван¹, О.В. Борисова¹, В.А. Мозгова²,
К.М. Усиченко³, О.М. Усиченко³

¹ Німецький діагностичний центр св. Павла, Одеса, Україна

² Одеська міська клінічна інфекційна лікарня

³ Одеський національний медичний університет

У статті представлені результати генетичного обстеження (генотипи IL-28В) 272 хворих на хронічний гепатит С, що проживають у різних регіонах України. Результати обстеження пацієнтів отримані під час проведення проекту «Доказова медицина – визначення маркера успіху лікування гепатиту С. Економічна та соціальна ефективність» співробітниками Міжнародного Альянсу ВІЛ/СНІД в Україні. Проведено аналіз генотипів пацієнтів між собою (за регіонами) і вірусологічною відповіддю на протівірусну терапію.

Ключові слова: хронічний гепатит С, тактика протівірусної терапії, матеріальна ефективність лікування.

ANALYSIS OF FREQUENCY OF DIFFERENT GENOTYPES IL-28B (RS12979860) IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C, LIVING IN DIFFERENT REGIONS OF UKRAINE

A. Appelhans¹, Y.I. Bazhora³, E.L. Bahchevan¹, O.V. Borisova¹,
V.A. Mozgovaya², E.N. Usychenko³, E.M. Usychenko³

¹ German Diagnostic Center St. Paul, Odessa, Ukraine

² Odessa City Clinical Hospital of Infectious Disease Odessa, Ukraine,

³ Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

The article presents the results of genetic investigation (genotype IL-28B) of 272 patients with chronic hepatitis C who live in different regions of Ukraine. The results of patients' examination were obtained during realization of the project "Evidence-based medicine – marker of success in hepatitis C treatment. Economic and social efficiency" by the staff of the International Alliance of HIV/AIDS in Ukraine. The analysis of the genotypes between patients (by regions) and virological response to antiviral therapy was performed.

Key words: chronic hepatitis C, antiviral therapy tactics, material efficiency of the treatment.

Введение.

Несмотря на определенные достижения в изучении патогенеза и применении противовирусной терапии, вирусный гепатит С по-прежнему остается актуальной проблемой во всем мире и в Украине. Это связано с тем, что у части больных хроническим гепатитом С развивается цирроз печени, в том числе декомпенсированный, при котором необходима трансплантация печени, а также формирование гепатоцеллюлярной карциномы. Кроме возможных неблагоприятных исходов ХГС, определенные проблемы имеются и при назначении противовирусной терапии [1, 2, 3].

Комбинированная противовирусная терапия с использованием пегилированного интерферона в соче-

тании с рибавирином обеспечивает устойчивый вирусологический ответ только у 40-50% пациентов ХГС с генотипом 1 и у 70-80% с генотипами 2 и 3.

В настоящее время разрабатываются принципы создания персонализированного подхода к лечению больных ХГС с подбором оптимальных доз рибавирина, длительности курса лечения. Стратегия интерферонотерапии больных ХГС основана на генотипе, биохимическом и вирусологическом ответе в процессе лечения.

Исследования последних лет показали, что генетические факторы организма человека влияют на эффективность лечения больных ХГС, так как имеются отличия в ответе на терапию в разных этнических группах. Индивидуальный подход к

лечению больных ХГС с использованием генетических маркеров может изменить схему лечения в зависимости от вирусологического ответа: сократить длительность терапии, вероятность побочных действий, таких как рибавирининдуцированная анемия, а также снизить стоимость лечения [4, 5, 6, 7].

Изучаются новые противовирусные препараты, обладающие прямым действием, например, ингибиторы протеазы NS3/4a и ингибиторы полимеразы NS5B. Однако, тройная терапия больных ХГС также имеет определенные недостатки: увеличение побочных эффектов и экономических затрат. Кроме того, при использовании препаратов прямого действия возможна лекарственная устойчивость, связанная с генетическими мутациями [8, 9].

Показано, что важнейшая клиническая роль принадлежит двум нуклеотидным заменам: замена цитозина на тимин (rs12979860) и замена тимина на гуанин (rs8099917). Установлена прогностическая значимость благоприятного ответа на лечение у больных ХГС, которые являются носителями аллели crs12979860, а также ассоциация этого генотипа со спонтанным вирусным очищением [10, 11, 12].

Однако, окончательно не установлено, какой полиморфизм IL-28B оказывает наибольшее влияние на стойкий вирусологический ответ в терапии больных ХГС. Так, наличие аллели с rs8099917 рассматривалось как неблагоприятный фактор, позволявший предположить неэффективность про-

тивовирусной терапии у больных ХГС с генотипом 1 [13, 14].

Принадлежность больных ХГС к определенному генотипу с различными вариантами полиморфизма IL-28B не всегда соответствует ожидаемым результатам противовирусной терапии.

При исследовании различных вариантов генотипа IL-28B у больных ХГС благоприятного и менее благоприятного ответа на лечение пегилированным интерфероном и рибавирином установлено, что в обеих группах были больные, как с быстрым вирусологическим ответом, так и без него [11, 15, 16].

В настоящее время показано, что индивидуальная предсказательная значимость полиморфизма гена IL-28B не является достаточно высокой, так как устойчивый вирусологический ответ может быть у пациентов как с благоприятным, так и с неблагоприятным генотипом. Существенное значение в развитии устойчивого вирусологического ответа у больных ХГС с генотипом 1 имеют и другие прогностические факторы, которые модифицируют влияние генотипа человека на эффективность противовирусной терапии: исходный уровень вирусной нагрузки, а также стадия фиброза вначале противовирусной терапии.

Однако, основные механизмы выявленной ассоциации между полиморфизмом гена IL-28B и стойким вирусологическим ответом изучены недостаточно, так как ген IL-28B имеет 10 различных полиморфизмов. Установлено, что генотип IL-28B у боль-

ных ХГС связан с дифференцированной экспрессией внепеченочных генов, стимулированных интерфероном. Эти данные указывают на прямой противовирусный и иммуноопосредованный эффекты IL-28B, которые, вероятно, связаны с полиморфизмом этого гена [15].

Появились сведения о взаимосвязи вирусологического ответа у больных ХГС на терапию пегилированным интерфероном и рибавирином с функциональным состоянием естественных киллеров и уровнем специфического клеточного иммунитета [21, 22].

Таким образом, представляется целесообразным дальнейшее изучение генетических факторов, как критериев исходов хронических вирусных гепатитов, так и вирусологического ответа на лечение.

Цель исследования: провести анализ частоты встречаемости полиморфизмов генов IL-28B (rs8099917) у больных хроническим гепатитом С, проживающих в различных регионах Украины; провести их сравнение между собой и доказать материальную эффективность внедрения генетического анализа.

Объект и методы исследования.

Обследовано 272 больных ХГС в возрасте от 18 до 64 лет, при этом средний возраст составил $39 \pm 1,05$ лет. Все обследованные больные получили препараты для лечения, а именно: пегинтерферон + рибавирин. Диспансерное наблюдение больных осуществляется на базе областных центров профилактики ВИЧ-инфекции и борьбы со СПИДом (табл. 1).

Для подтверждения диагноза ГС были исследованы: биохимические показатели (повышение активности АсАТ и АлАТ, содержание общего билирубина и его фракций), серологические маркеры (определение HCV-IgM, качественное и количественное определение и РНК HCV методом ПЦР, генотипирование вируса). В исследовании были включены только пациенты, инфицированные вирусом гепатита С генотип 1.

Молекулярно-генетические исследования включали определение полиморфных вариантов генов IL-28B (rs8099917). Выделение ДНК проводилось с использованием набора «ДНК-ЭКСПРЕСС-кровь» (НПФ «Литех», РФ). Полиморфизм изучался при помощи амплификации соответствующих участков генома методом ПЦР. Структура использованных праймеров и параметры температурных циклов, описанные в геномной базе данных GenBank. Исследования проводились на базе Немецкого диагностического центра им. Св. Павла (г. Одесса).

Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли с помощью критерия χ^2 Пирсона. Частоты аллелей и генотипов в группах сравнивали с применением критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность при числе степеней свободы равном 1. Частота аллелей рассчитана в соответствии с законом Харди-Вайнберга.

Результаты обследования пациентов получены при проведении проекта «Доказательная медицина – опре-

деление маркера успеха лечения гепатита С. Экономическая и социальная эффективность» сотрудниками Международного Альянса ВИЧ/СПИД в Украине. Все пациенты бесплатно получили противовирусные препараты (рибавирин в комбинации с пегилированным интерфероном) в рамках выполнения этого проекта.

Результаты и обсуждение.

При проведении анализа процентного соотношения разных генотипов IL-28B (rs8099917) у жителей различных регионов Украины выявлены существенные различия (таблица 1).

У большинства пациентов с ХГС, вне зависимости от региона проживания, преобладал гомозиготный генотип TT, который является генетическим маркером высокой эффективности специфического противовирусного лечения.

Соотношение больных ХГС с генотипом TTIL-28B (rs8099917), проживающих в различных регионах Украины, варьировало от 72% (Винницкая

область) до 38% (Сумская область). Только у жителей Николаевской области соотношение больных с генотипом TT было несколько ниже, чем относительное число больных с генотипом TG (40% и 45% соответственно).

Соотношение больных ХГС, проживающих в различных регионах Украины, с выявленным гетерозиготным вариантом генотипа TG также отличалось вариабельностью: от 45% (Николаевская область) до 14% (Винницкая область)

Гомозиготный вариант GGIL-28B (rs12979860) встречался значительно реже. Его соотношение у жителей различных регионов Украины варьировало от 31% (Сумская область) до 8% (Харьковская область).

При оценке соотношения генотипов пациентов с ХГС всех регионов Украины установлено, что доля больных, потенциально чувствительных к терапии «золотым стандартом» с генотипом TTIL-28B (rs8099917) – 53%, и доля больных с генотипами TGи GGIL-28B (rs8099917)– 47%, потенциально устойчивых к тако-

Таблица 1.

Распределение частот генотипов IL-28B (rs8099917) у больных ХГС по регионам

Регион проживания больных ХГС	TT n / %	TG n / %	GG n / %
Харьковская область (n=13)	8 / 62	4 / 30	1 / 8
Сумская область (n=16)	6 / 38	5 / 31	5 / 31
Николаевская область (n=20)	8 / 40	9 / 45	3 / 15
Винницкая область (n=36)	26 / 72	5 / 14	5 / 14
Полтавская область (n=31)	16 / 53	11 / 35	4 / 12
Днепропетровская область (n=33)	18 / 55	11 / 33	4 / 12
г. Киев и Киевская область (n=16)	7 / 44	6 / 38	3 / 18
Ивано-Франковская область (n=7)	4 / 59	2 / 25	1 / 16
Одесская область (n=100)	52 / 52	28 / 28	20 / 20
Всего (n=272)	145 / 53	81 / 30	46 / 17

му лечению, существенных различий не имеют (критерий $\chi^2 = 0$).

Вирусологический ответ в группе больных с генотипом ТТIL-28В (rs8099917) на момент окончания терапии золотым стандартом в течение 48 недель отмечался только у 62% пациентов (рис.1). Частота вирусологического ответа после завершения курса противовирусного лечения у больных с генотипами ТГ и GGIL-28В (rs8099917) была значительно ниже, но также отмечалась и составила 37% ($\chi^2 = 61,75$).

Таким образом, только у 138 человек (87 человек с генотипом ТТ и 51 человек с генотипами ТГ и GG), из всей группы обследованных, отмечалась положительная динамика болезни в результате проведенного противовирусного лечения. Это свидетельствует о том, что IL-28В (rs8099917) не может быть единственным критерием генетического тестирования для последующего отбора больных ХГС и назначения противовирусного лечения.

Для оптимизации финансовых затрат на противовирусную терапию, обоснованного включения в традиционную схему новых противовирусных средств, в частности софосбувира, и, соответственно, повышения эффективности лечения (устойчивый вирусологический ответ в 100% случаев) необходим дальнейший поиск других генетических маркеров, их определенного сочетания и составление персонализированного генетического профиля.

Выводы

1. Выявлены определенные отличия процентного соотношения различных генотипов IL-28В у больных ХГС, проживающих в разных регионах Украины.

2. Соотношение больных с генотипом ТТ (53%), являющимся генетическим маркером потенциальной чувствительности к терапии «золотым стандартом», достоверно не отличается от процентного соотношения больных с генотипами ТГ (30%) и GG

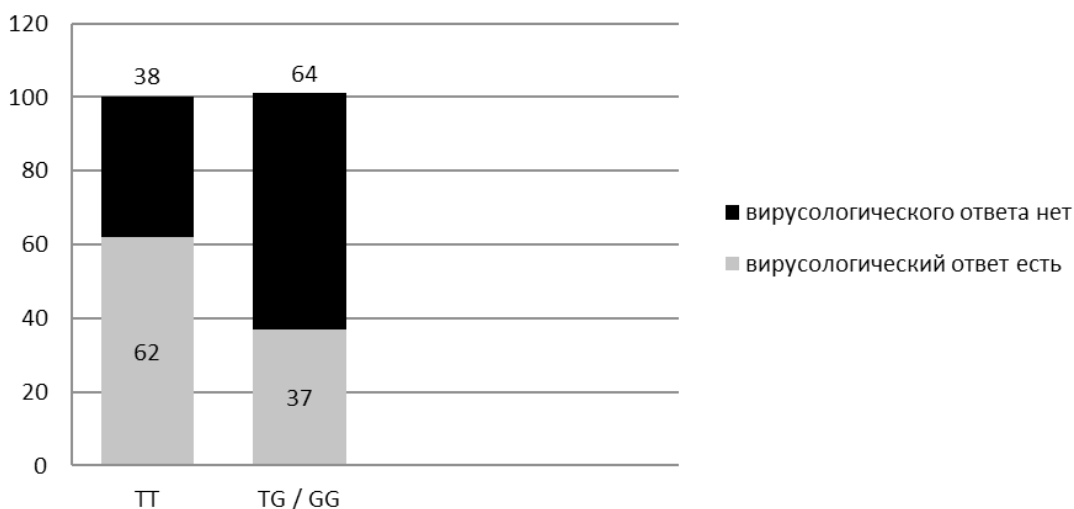


Рисунок 1. Частота вирусологического ответа у больных с различными генотипами IL-28В (rs8099917).

(17%), которые являются маркерами отсутствия ответа на противовирусную терапию.

3. Эффективность терапии, которая оценивается на основании вирусного ответа на момент окончания терапии, в группе больных с генотипом ГТ и группах больных с генотипами ГГ и GG, была недостаточно высокой- 62% и 37% соответственно.

Перспективы дальнейших исследований

Таким образом, отсутствие существенной разницы эффективности лечения в группах больных ХГС, состав-

ленных на основании генотипов IL-28B (rs8099917) демонстрирует необходимость поиска новых генетических маркеров эффективности лечения. Генетический анализ, проведенный у всех больных перед началом терапии, позволит более рационально использовать материальные средства и разработать объективные критерии отбора пациентов для назначения новых противовирусных средств.

Литература

1. Полиморфизм гена IL-28B как предиктор ответа на противовирусную терапию хронического гепатита С / Т.В. Симакова, И.В. Гармаш, О.С. Аришева, Н.В. Манухина [и др.] // Клиническая фармакология и терапия. – 2012. – №21. – С. 1-6.
2. Кучерявый Ю.А. Хронический гепатит, цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома – звенья одной цепи / Ю.А. Кучерявый, Н.Ю. Стукова, М.Л. Ахтаева// Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2012. – № 5.
3. Влияние генетических полиморфизмов гена IL-28B на эффективность противовирусной терапии хронического гепатита С стандартным интерфероном-α / Лапшин А.В., Маевская М.В., Ивашкин В.Т. [и др.]// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2013. – № 1. – С. 23-29.
4. Тихонова Н.Ю. Значение аллельных вариантов гена интерлейкина-28B при хроническом вирусном гепатите С / Тихонова Н.Ю., Бурневич Э.З., Краснова Т.Н. // Терапевтический архив. – 2013. – №12. – С. 106-113.
5. Современные схемы лечения больных хроническим гепатитом С / В.Т. Ивашкин, М.В. Маевская, М.А. Морозова, Е.О. Люсина// РЖГГК. – 2012. - №1. – С. 36-44.
6. Monika Rau Host Genetic Variants in the Pathogenesis of Hepatitis C / Monika Rau, Katharina Baur, Andreas Geier // Viruses. – 2012. # 4. – P. 3281-3302.
7. Иммуногенетические предикторы быстрого вирусологического ответа на противовирусную терапию больных хроническим гепатитом С / Ющук Н.Д., Знойко О.О., Балмасова И.П. [и др.] // Терапевтический архив. – 2012. – №11. – С. 11-16.
8. Poordad F. Воспреvir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. / Poordad F, McCone J Jr, Bacon B.R. // N. Engl. J. Med. – 2011. - #364. – P. 1195–1206.
9. Маевская М.В. Тройная противовирусная терапия пациента с циррозом печени: ее осложнения и возможности медикаментозной коррекции / Маевская М.В., Тихонов И.Н., Ивашкин В.Т. / РЖГГК. – 2014. - №2. – С.43-52.
10. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: genome-wide association study / Rauch A., Kutalik., Descombes P. [et al.] // Gastroenterology. – 2010. – Vol.138, №4. – P. 1331-1345.

11. Полиморфизм генов интерлейкина-28В и клиническое значение его выявления у пациентов с хроническим вирусным гепатитом / Мицура В.М., Воропаев Е.В., Осипкина О.В., Жаворонок С.В. // *Лабораторная диагностика*. – 2012. – №2. – С. 86-97.
12. IL28b genetic variants and gender are associated with spontaneous clearance of Hepatitis C virus infection / Rao, H.Y., Sun, D.G., Jiang, D. [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol.19. – P. 173–181.
13. Interleukin-28b genetic variants in identification of Hepatitis C virus genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon/ribavirin / Huang C.F., Huang J.F., Yang J.F. [et al.] // *J. Hepatol.* – 2012. – Vol.56. – P. 34–40.
14. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic Hepatitis C using genetic polymorphism in il28b and viral factors / Kurosaki M., Tanaka Y., Nishida N. [et al.] // *J. Hepatol.* – 2011. – Vol.54. – P. 439–448.
15. Genetic variation in IL-28B predicts hepatitis C treatment – induced viral clearance / D. Ge, I. Fellay, Thompson A.I. [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 461, #7262. – P. 399-401.
16. Биомаркеры прогнозирования цирроза печени и эффективности противовирусной терапии у больных хроническим гепатитом С/ Балмасова И.П., Малова Е.С., Сафиуллина Н.Х. [и др.] // *Аллергология и иммунология*. – 2014.- Т. 15.,№ 3. – С. 196.
17. Hepatitis C virus – specific CD8+ T-cell frequencies are associated with the responses of pegylated interferon- α and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection / T. Tatsumi, T. Takehara, T. Miyaguchi [et al.] // *Hepatology Res.* – 2011. – Vol. 41 (1). – P. 30-38.
18. Hepatitis C virus nonstructural protein specific T cells are associated with virological responses to combination therapy in chronic HCV patients / Zhang S.Y., Liu D.W., Zhao Y [et al.] // *LiverInt.* – 2011. – Vol 32 (1). – P. 102-109.
19. Interleukin 28B genomicbased treatment paradigsm for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies / P.J. Clarcs, A.I. Thompson, I.G. McHutchinson [et al.] // *Am. J. Gastroenterology*. – 2011. – Vol. 116. – P. 38-45.