

ВПЛИВ ПОЛІМОРФІЗМУ ASP299GLY ГЕНА TLR4 ТА GLN11LEU ГЕНА TLR7 НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ПРОТИВІРУСНОЇ ТЕРАПІЇ ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ С

Г.М. Дубинська, Л.М. Сизова, Т.І. Коваль, О.М. Ізюмська

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава, Україна

Метою дослідження був аналіз впливу поліморфізмів Asp299Gly гена TLR4 та Gln11Leu гена TLR7 на ефективність противірусної терапії (ПВТ) хронічного гепатиту С (ХГС) пегільованими інтерферонами (PEG-IFN) і рибавірином (RBV). Для досягнення поставленої мети проведено проспективне когортне дослідження, в яке було включено 125 хворих на ХГС. У ході дослідження встановлено, що наявність поліморфізму Asp299Gly гена TLR4 у хворих на ХГС впливає на ефективність ПВТ PEG-IFN і RBV: частота досягнення ранньої вірусологічної відповіді знижується в 1,3 ($p=0,018$; $r_s = -0,237$, $p=0,008$), безпосередньої – в 1,5 ($p=0,020$; $r_s = -0,259$, $p=0,008$), стійкої – у 1,9 ($p=0,020$; $r = -0,226$, $p=0,015$) рази. Статистично значимої різниці між ефективністю ПВТ PEG-IFN і RBV у хворих на ХГС із «диким» Gln11Gln і «мутантними» Gln11Leu+Leu11Leu генотипами гену TLR7 не виявлено.

Ключові слова: хронічний гепатит С, поліморфізм Asp299Gly гена TLR4, поліморфізм Gln11Leu гена TLR7, противірусна терапія.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ASP299GLY ГЕНА TLR4 И GLN11LEU ГЕНА TLR7 НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С

Г.М. Дубинская, Л.М. Сизова, Т.И. Коваль, Е.М. Изюмская

ВГУЗУ «Украинская медицинская стоматологическая академия», г. Полтава, Украина

Целью исследования был анализ влияния полиморфизмов Asp299Gly гена TLR4 и Gln11Leu гена TLR7 на эффективность противовирусной терапии (ПВТ) хронического гепатита С (ХГС) пегилированными интерферонами (PEG-IFN) и рибавирином (RBV). Для достижения поставленной цели проведено проспективное когортное исследование, в которое было включено 125 больных ХГС. В ходе исследования установлено, что наличие полиморфизма Asp299Gly гена TLR4 у больных с ХГС влияет на эффективность ПВТ PEG-IFN и RBV: частота достижения раннего вирусологического ответа снижается в 1,3 ($p=0,018$; $r_s = -0,237$, $p=0,008$), непосредственного – в 1,5 ($p=0,020$; $r_s = -0,259$, $p=0,008$), стойкого – в

1,9 ($p=0,020$; $r_s = -0,226$, $p=0,015$) раз. Статистически значимой разницы между эффективностью ПБТ PEG-IFN и RBV у больных ХГС с «диким» Gln11Gln и «мутантными» Gln11Leu+Leu11Leu генотипами гена TLR7 не выявлено.

Ключевые слова: хронический гепатит С, полиморфизм Asp299Gly гена TLR4, полиморфизм Gln11Leu гена TLR7, противовирусная терапия.

THE INFLUENCE OF POLYMORPHISM ASP299GLY OF TLR4 GENE AND GLN11LEU OF TLR7 GENE ON THE EFFICIENCY OF ANTIVIRAL THERAPY OF CHRONIC HEPATITIS C

G.M Dubinskaya, L.M Sizova, T.I Koval, E.M. Izyumskaya

HSEEU «Ukrainian medical stomatological academy», Poltava, Ukraine

The aim of the study was to analyze the influence of polymorphism Asp299Gly of TLR4 gene and Gln11Leu of TLR7 gene on the effectiveness of antiviral therapy (AVT) of chronic hepatitis C (CHC) with pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV). To achieve this goal we conducted a prospective cohort study of 125 patients with CHC. The study found: that the presence of polymorphism Asp299Gly of TLR4 gene in patients with HCV affects the efficiency of the AVT PEG-IFN-RBV: a frequency to achieve an early virological response is reduced in 1.3 ($p=0.018$; $r_s = -0.237$, $p=0.008$), direct – in 1.5 ($p=0.020$; $r_s = -0.259$, $p=0.008$), sustained – in 1.5 ($p=0,020$; $r = -0.226$, $p=0.015$) times. No identified a statistically significant difference between the efficiency of the AVT PEG-IFN-RBV in CHC with «wild» Gln11Gln and «mutant» Gln11Leu+Leu11Leu genotypes of TLR7 gene.

Key words: chronic hepatitis C, Asp299Gly polymorphism of TLR4 gene, Gln11Leu polymorphism of TLR7 gene, antiviral therapy

Актуальність. Лікування хронічного гепатиту С (ХГС) є однією з найважливіших проблем гепатології, що пов'язано з високою питомою вагою ХГС у структурі хронічних захворювань печінки як в Україні, так і за кордоном. На сьогоднішній день противірусна терапія (ПБТ) ХГС пегільованими інтерферонами (PEG-IFN) і рибавірином (RBV) залишається затвердженим і впровадженим стандартом лікування згідно рекомендацій

EASL та національних протоколів. Індивідуальний підхід до призначення ПБТ, підвищення прихильності пацієнтів до лікування, своєчасна профілактика і корекція небажаних проявів підвищують її ефективність, яка складає від 40 до 80% [1-2]. До початку лікування прогноз ефективності ПБТ базується на основі вивчення предикторів, які поділяються на фактори хазяїну та вірусу [1]. За даними наукової літератури, найбільш значимими є ге-

нотип вірусу гепатиту С (ВГС), поліморфізм гена IL28В, стадія фіброзу печінки (ФП) та рівень вірусного навантаження (ВН) [1-4]. До інших, менш значимих факторів, які здатні знижувати ефективність ПВТ відносять: вік більше 40 років, чоловічу стать, неєвропеїдну расу, ожиріння, інсулінорезистентність, низьку активність сироваткових амінотрансфераз [1,4].

Останнім часом ведеться активний пошук генетичних детермінант організму хазяїна, що обумовлюють ефективність ПВТ. Зокрема, вивчається генетичний поліморфізм генів TLR4 і TLR7, які представляють особливий інтерес з точки зору вивчення ХГС – одноланцюгова вірусна РНК, структурні та неструктурні білки ВГС є їхніми лігандами, тобто саме ці гени запускають імунні механізми вродженого імунітету при взаємодії з ВГС [5-6]. У науковій літературі зустрічаються поодинокі повідомлення щодо впливу поліморфізму Asp299Gly гена TLR4 і Gln11Leu гена TLR7 на ефективність ПВТ ХГС. Так, М. Peric та співавт. (2015) пов'язують поліморфізм Asp299Gly гену TLR4 з низькою ефективністю ПВТ ХГС [7], а в праці М. Emonts (2008) подібного впливу не виявлено [8]. Е. Schott та співавт. (2008) вказують на кореляцію наявності поліморфізму Gln11Leu гена TLR7 із несприятливою відповіддю на ПВТ у жінок [9], що підтверджується дослідженням Taghavi S.A. та співавт. (2009) без гендерної залежності цього факту [10]. Таким чином, дані наукових досліджень вказують, що поліморфізми Asp299Gly гена TLR4 і Gln11Leu

гена TLR7 здатні впливати на ефективність ПВТ. Однак це питання залишається недостатньо вивченим.

Мета роботи – проаналізувати вплив поліморфізмів Asp299Gly гена TLR4 та Gln11Leu гена TLR7 на ефективність ПВТ ХГС PEG-IFN і RBV.

Матеріали і методи. Для досягнення поставленої мети проведено проспективне когортне дослідження, в яке було включено 125 хворих на ХГС: жінок – 48 (38,4%), чоловіків – 77 (61,6%) віком від 20 до 63 років (середній вік – $40,7 \pm 0,86$). Діагноз ХГС встановлювали згідно міжнародної класифікації хвороб 10 перегляду і міжнародної класифікації хвороб печінки (Лос-Анджелес, 1994) та верифікували виявленням специфічних серологічних маркерів ВГС (анти-ВГС IgM та IgG, анти-ВГС core та анти-NS₃, анти-NS₄, анти-NS₅) методом імуноферментного аналізу (ІФА) з обов'язковим виявленням РНК ВГС у сироватці крові методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу із визначенням генотипу та вірусного навантаження (ВН). Високим вважали $VH > 4 \times 10^5$ МО/мл [3]. Якісне та кількісне визначення РНК ВГС, а також генотипування ВГС проводилося на аналізаторі TaqMan-48 (Roche Diagnostics, Швейцарія) за допомогою тест – системи Roche Diagnostics (Швейцарія). Загалом 1 генотип ВГС реєструвався у 64,8% обстежених, 2 і 3 – у 35,2%, високий і низький рівні ВН розподілились майже порівну – 53,6% і 46,4% відповідно. Для виключення інфікування іншими гепатотропними вірусами та ВІЛ у сироватці крові всіх хворих дослі-

джували HBsAg, анти-HBcor (сумарні), анти-HDV, анти-HIV методом ІФА.

Активність цитолізу оцінювали визначенням аланінамінотрансферази (АлАТ) на автоматичному біохімічному аналізаторі GBG STAT FAX-1904 (Японія) реактивами компанії Human (Німеччина). Мінімальна активність визначалась у 52,0% хворих, помірна – у 31,2%, висока – у 0,8%.

Стадію ФП за шкалою METAVIR встановлювали за допомогою методу FibroTest, який проводився тест-системами Roche Diagnostics (Швейцарія) на аналізаторі Cobas 6000 (с 501 модуль) медичної лабораторії «Супево» та методом еластометрії печінки – на УЗД-сканері «Ultima RA-Expert» (Україна). Хворих без ФП (F_0) виявилось 23,2%, стадію F_1 мали 22,4%, F_2 та F_3 – по 15,2%, F_4 – 24,0%.

Всі хворі отримували ПБТ ХГС РЕГ-IFN α -2a 180 мкг/тиж або α -2b в дозі 1,5 мкг/кг/тиж у комбінації з RBV у дозі 800-1400 мг на добу залежно від маси тіла. Оцінку вірусної кінетики в ході ПБТ із визначенням вірусологічної відповіді проводили на 4, 12, 24 (48) тижні ПБТ та через 24 тижні після її завершення. У хворих оцінювали наступні варіанти вірусологічної відповіді: швидку (ШВВ, 4-й тиждень ПБТ), ранню (РВВ, 12-й тиждень ПБТ), яка включала: повну ранню (пРВВ) і часткову ранню (чРВВ), безпосередню (БВВ, 24 або 48 тиждень, залежно від генотипу ВГС) і стійку (СВВ, 24-й тиждень після завершення ПБТ). Нульовою відповіддю вважали зниження рівня РНК ВГС у сироватці крові <2 лог протя-

гом перших 12 тижнів ПБТ, вірусологічним проривом – появу РНК ВГС після періоду її відсутності під час ПБТ, рецидивом – появу РНК ВГС після завершення ПБТ.

Поліморфну ділянку Asp299Gly гена TLR4 генотипували методом ПЛР з використанням олігонуклеотидних праймерів, ампліфікація проведена на ампліфікаторі «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технологія», Росія), Gln11Leu гена TLR7 – ПЛР в режимі реального часу з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів, ампліфікатор «ДТ Лайт» (ООО «НПО ДНК-Технологія», Росія). Враховуючи низьку частоту гомозигот за «мутантним» алелем гена TLR7, в ході дослідження частоту генотипу Gln11Leu поєднували з Leu11Leu і порівнювали з Gln11Gln. Залежно від наявності досліджуваних поліморфізмів генів виділено 4 групи хворих:

- I – із «мутантним» генотипом Asp299Gly гена TLR4, n=19;
- Ia – із «диким» генотипом Asp299Asp гена TLR4, n=106;
- II – із «мутантними» генотипами Gln11Leu+Leu11Leu гена TLR7, n=23;
- IIa – із «диким» генотипом Gln11Gln гена TLR7, n=102.

Статистична обробка результатів дослідження проведена за допомогою програми «SPSS 17.0». Вірогідність відмінностей кількісних результатів визначали за допомогою t-критерію Ст'юдента, якісних – із використанням точного тесту Фішера та критерію χ^2 залежно від передумов. Для виявлення й оцінки взаємозв'язку між двома рядами співставних ознак використо-

ували коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r_s). Відмінності вважали вірогідними для всіх видів аналізу при імовірності помилки $p < 0,05$, при p в інтервалі від 0,05 до $\leq 0,1$ відзначали тенденцію до відмінності.

Результати дослідження. У ході порівняльного аналізу встановлено, що за віком, генотипом ВГС, рівнем ВН, ступенем цитолітичної активності та стадією ФП хворі на ХГС із «дикими» (Asp299Asp, Gln11Gln) та «мутантними» (Asp299Gly, Gln11Leu+Leu11Leu) генотипами досліджуваних генів не відрізнялись. Групи I та Ia були рівноцінними за статтю, тоді як у II, порівняно з IIa, переважали жінки – 56,5%

проти 34,3% ($\chi^2=3,91$, $p=0,048$), що можна пояснити локалізацією гена TLR7 на X-хромосомі [6,9]. Порівняльна характеристика груп хворих на ХГС до початку ПВТ наведена в табл. 1.

Проведені дослідження показали, що ефективність ПВТ ХГС залежить від генотипів гена TLR4, тоді як впливу гена TLR7 в нашому дослідженні виявлено не було (табл. 2).

Як видно з даних, наведених у табл. 2, ШВВ була досягнута у 31,6% хворих I групи та у 54,7% – Ia (із тенденцією до вірогідності, $p=0,082$; $r_s = -0,166$, $p=0,064$), у 65,2% – в II та у 48,0% – в IIa (без різниці між групами, $p=0,169$). Після 4 тижня ПВТ у зв'язку

Таблиця 1.

Порівняльна характеристика груп хворих на ХГС залежно від наявності поліморфізму генів TLR4 та TLR7

Ознаки	Групи хворих на ХГС					
	I, n=19	Ia, n=106	p	II, n=23	IIa, n=102	p
Вік, роки, $M \pm m$	41,8±2,03	40,5±0,95	0,606	42,1±1,82	40,4±0,97	0,461
Стать: чоловіки/жінки, абс. %:	13(68,4)/ 6(31,6)	64(60,4)/ 42(39,6)	0,613	10(43,5)/ 13(56,5)*	67(65,7)/ 35(34,3)	0,048
Генотип ВГС: 1/2 і 3, абс. %:	14(73,7)/ 5(26,3)	67(63,2)/ 39(36,8)	0,444	15(65,2)/ 8(34,8)	66(64,7)/ 36(35,3)	1,000
ВН: $>/<4,0 \times 10^5$ МО/мл, абс. %	9(47,4)/ 10(52,6)	49(46,2)/ 57(53,8)	1,000	11(47,8)/ 12(52,2)	47(46,1)/ 55(53,9)	1,000
Активність цитолізу, абс. %:						
- мінімальна (АЛТ до 3 норм);	11(57,9)	54(50,9)	0,625	12(52,2)	53(52,0)	1,000
- помірна (від 3 до 10 норм);	5(26,3)	34(32,1)	0,790	8(34,8)	31(30,4)	0,804
- висока (більше 10 норм).	-	1(0,9)	1,000	-	1(1,0)	1,000
Стадія ФП, абс. %:						
- F ₀	3(15,8)	26(24,5)	0,559	6(26,1)	23(22,5)	0,786
- F ₁	6(31,6)	21(19,8)	0,243	5(21,7)	22(21,6)	1,000
- F ₂	2(10,5)	18(17,0)	0,736	3(13,0)	17(16,7)	1,000
- F ₃	2(10,5)	17(16,0)	0,735	4(17,4)	15(14,7)	0,751
- F ₄	6(31,6)	24(22,6)	0,394	5(21,7)	25(24,5)	1,000

Примітка: p – рівень значимості, отриманий з використанням точного тесту Фішера та критерію χ^2 , * – $p < 0,05$.

Таблиця 2.

**Ефективність ПВТ ХГС
залежно від наявності поліморфізму генів TLR4 та TLR7, (абс.%)**

Вірусологічна відповідь	Групи хворих на ХГС					
	I, n=19	Ia, n=106	p	II, n=23	IIa, n=102	p
ШВВ	6 (31,6)	58 (54,7) ^o	0,082	15 (65,2)	49 (48,0)	0,169
РВВ	13 (68,4)	95 (90,5)*	0,018	20 (87,0)	88 (87,1)	1,000
БВВ	8 (61,5)	81 (89,0)*	0,020	18 (90,0)	71(84,5)	0,730
СВВ	6 (33,3)	62 (63,9)*	0,020	15 (68,2)	53 (57,0)	0,470

Примітка. p – рівень значимості, отриманий із використанням точного тесту Фішера, * – $p < 0,05$, ^o – $p < 0,1$.

з побічною дією препаратів припинив лікування 1 хворий з «дикими» генотипами TLR4 та TLR7.

При порівнянні частоти РВВ з'ясувалося, що серед хворих I групи її досягли 68,4%, що виявилось в 1,3 рази рідше, ніж Ia – 90,5% ($p=0,018$). Отримані дані підтвердили кореляційним аналізом, за результатом якого між наявністю поліморфізму Asp299Gly гена TLR4 та РВВ існував достовірний зворотній зв'язок – $r_s = -0,237$, $p=0,008$. В II та IIa групах частота РВВ розподілилась порівну – 87,0% і 87,1% відповідно ($p=1,000$). Порівняння частоти досягнення пРВВ серед обстежених I і Ia груп виявило в 1,9 разів нижчу її частоту в I групі – 42,1% проти 78,1% ($p=0,004$; $r_s = -0,291$, $p=0,001$). В II і IIa групах пРВВ досягли 73,9% і 72,3% хворих відповідно, що є статистично не значимим ($p=1,000$). Привернуло увагу, що найвища частота отримання чРВВ серед загальної кількості зафіксованої РВВ, спостерігалася у хворих на ХГС з «мутантним» генотипом TLR4 – 38,5%, що виявилось у 2,8 разів частіше, ніж при «дикому» генотипі цього гена – 13,7% ($p=0,040$), з прямим кореляційним зв'язком – $r_s=0,216$,

$p=0,025$. В групах II і IIa достовірної різниці за даною ознакою виявлено не було – 15,0% і 17,0% відповідно ($p=1,000$).

У зв'язку з неефективністю ПВТ на 12 тижні її припинили 31,6% пацієнтів I групи, що виявилось в 3,3 рази частіше, ніж в Ia – 9,5% ($p=0,018$; $r_s=0,237$, $p=0,008$), в II та IIa – 13,0% та 12,9% відповідно ($p=1,000$).

Після 12 тижня ПВТ через відсутність прихильності до лікування із дослідження вибуло 2 хворих, ще 2 припинили ПВТ у зв'язку з побічною дією препаратів – всі мали «дикі» генотипи обох досліджуваних генів. Таким чином частота досягнення БВВ оцінювалась у 13 хворих I групи та у 91 – Ia, в II та IIa – у 20 і 84 відповідно. З'ясувалося, що в I групі БВВ отримано майже в 1,5 рази рідше, ніж в Ia – 61,5% проти 89,0% ($p=0,020$; $r_s = -0,259$, $p=0,008$), в II і IIa групах – 90,0% і 84,5% відповідно ($p=0,730$).

Вірусологічний прорив констатовано у 15,4% хворих I групи проти 3,4% – Ia ($p=0,123$), із тенденцією до вірогідності за кореляційним аналізом – $r_s=0,185$, $p=0,064$, в II і IIa – у 0,0% та 6,2% відповідно, без статистичної різниці між групами ($p=0,580$).

У хворих, які завершили курс ПВТ із досягненням БВВ, рецидив ХГС зафіксований у 14,3% носіїв «мутантного» генотипу гена TLR4 та у 16,2% хворих із «диким», серед хворих із поліморфізмом гена TLR7 – у 16,9%, при «дикому» генотипі – 11,8%, що не мало статистичної різниці в жодній із груп порівняння ($p=1,000$).

Ефективність ПВТ із досягненням СВВ оцінювали у 115 хворих, які завершили лікування та 24-тижневий термін спостереження після нього: в I групі – у 18, в Ia – у 97, в II – у 22 і в IIa – у 93. Загалом СВВ досягли лише 33,3% обстежених із поліморфізмом Asp299Gly гена TLR4, що виявилось у 1,9 рази рідше, ніж при наявності генотипу Asp299Asp – 63,9% ($p=0,020$; $r_s = -0,226$, $p=0,015$), у пацієнтів із генотипами Gln11Leu+Leu11Leu та

Gln11Gln гена TLR7 – 68,2% і 57,0% відповідно ($p=0,470$).

В ході дослідження не виявлено статистичної різниці щодо ефективності ПВТ ХГС залежно від генотипів ВГС у жодній із груп порівняння.

Висновки.

1. Наявність поліморфізму Asp299Gly гена TLR4 у хворих на ХГС впливає на ефективність ПВТ PEG-IFN і RBV: частота досягнення РВВ знижується в 1,3 ($p=0,018$; $r_s = -0,237$, $p=0,008$), БВВ – в 1,5 ($p=0,020$; $r_s = -0,259$, $p=0,008$), СВВ – у 1,9 рази ($p=0,020$; $r = -0,226$, $p=0,015$).

2. Не виявлено статистично значимої різниці між ефективністю ПВТ PEG-IFN і RBV у хворих на ХГС із «диким» Gln11Gln і «мутантними» Gln11Leu+Leu11Leu генотипами гена TLR7.

Література

1. Федорченко С. В. Хроническая HCV-инфекция: монография / С. В. Федорченко – К. : Медицина, 2010. – 272 с.
2. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection 2013 [Electronic resource] – Access mode: [http://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(13\)00794-0/pdf](http://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(13)00794-0/pdf)
3. Зайцев И.А. Прогнозирование результатов противовирусной терапии больных хроническим вирусным гепатитом С / И.А. Зайцев // Гепатологія. – 2013. – № 2. – С. 4–13.
4. Рекомендации по диагностике и ведению взрослых больных гепатитом С // РЖГГК. – 2013. – Т. 23. № 2. – С. 41–70
5. Kawai T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors / T. Kawai, S. Akira // Nat. Immunol. – 2010. – Vol.11(5). – P.373-384.
6. Toll-like receptors in hepatitis C infection: implications for pathogenesis and treatment // J. Howell, P. Angus, P. Gow, K. Visvanathan // Journal of Gastroenterology and Hepatology. – 2013. – Vol.28(5). – P. 766–776
7. Polymorphisms of Toll-like receptors 2 and 4 in chronically infected hepatitis C patients from north-east Croatia / M. Peric, Z. Bosnjak, B. Sarkanj [et al.] // Arch Virol. – 2015. – Vol. 160. – P. 297–304.
8. Emonts M. Polymorphisms in immune response genes in infectious diseases and autoimmune diseases [Electronic resource] / M. Emonts. – 2008. – 372 Pages. – Access mode: <http://repub.eur.nl/pub/14316/>
9. Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon- α -based therapy / E. Schott, H. Witt, K. Neumann [et al.] // J Viral Hepat. – 2008. – Vol. 15 (1). – P.71–78.
10. Relation between C.32 A>T polymorphism in TLR7 and response to treatment in chronic HCV-infection / S. A. Taghavi, H. Damangir, E. Kamali Sarvestani [et al.] // Armaghian Danesh. – 2009. – Vol.14 (2). – P. 105–116