© Сорокіна О.Г., Попов М.М., Лядова Т.І.
УДК 616.98-097-085.281.8:578.825.13]:575.174.015.3

# ВПЛИВ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА ІНТЕРЛЕЙКІНУ-28 НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ПРОТИВІРУСНОЇ ТЕРАПІЇ У ПАЦІЄНТІВ З ХРОНІЧНОЮ ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ*

***Сорокіна О.Г., Попов М.М., Лядова Т.І.***

Харківський державний університет імені В.Н.Каразіна, медичний факультет

Кафедра загальної та клінічної імунології та алергології,

ДУ «Інститут мікробиології та імунології ім. І.І.Мечникова НАН України» м.Харків, Україна

*Среди многочисленных факторов, оказывающих непосредственное влияние на иммунную систему, особого внимания заслуживают вирусы семейства герпеса. В настоящее время вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) признан этиологическим агентом не только инфекционного мононуклеоза, синдрома лифаденопатии, но и таких онкологических процессов, как назофарингеальная карцинома, лимфома Беркитта, Т- и В- клеточные лимфомы у ВИЧ-инфицированных. Целью данной работы было изучение влияния полиморфизма гена IL-28B на эффективность противовирусной терапии у пациентов с хронической ВЭБ-инфекцией. Нами было обследовано 92 пациента с хроническими формами ВЭБ-инфекции: 38 пациентов (41,3 %) были с генотипом СС (локус rs12979860 IL-28B); 32 пациента (34,7 %) с генотипом СТ; 22 пациента (23,9 %) с генотипом ТТ. В результате проведенной работы было выявлено, что у больных хронической ВЭБ-инфекцией с генотипом СС и СТ достоверно чаще отмечается высокая эффективность противовирусной терапии. С учетом высокой эффективности применения вальацикловира в указанных группах пациентов целесообразно и в дальнейшем рекомендовать пациентам придерживаться используемой схемы лечения. У пациентов с генотипом ТТ в большинстве случаев отмечалась низкая эффективность противовирусной терапии и можно предположить, что для повышения эффективности терапии у таких пациентов необходимо дополнить используемую схему лечения иммуномодулирующими препаратами.*

**Ключевые слова:** инфекционный мононуклеоз, Эпштейна-Барр вирусная инфекция, противовирусная терапия, генотип, интерлейкин-28, полиморфизм генов.

У наш час інфекційні захворювання займають домінуюче місце серед патології людини та як прогнозують експерти ВООЗ, роль інфекції в структурі загальної захворюваності з кожним роком буде зростати. [1, 4, 11, 15, 17]. Століття, в якому ми живемо, вважається століттям опортуністичних інфекцій завдяки зростаючому впливу несприятливих факторів навколишнього середовища на організм та, перш за все, на імунну систему [2, 7, 8, 16]. Серед численних факторів, які безпосередньо впливають на імунну систему, на особливу увагу заслуговують віруси сімейства герпесу [3, 5, 10, 13, 14]. Досягнення лабораторної та, в першу чергу, молекулярної діагностики, підвищили ймовірність виявлення даної інфекції та свідчать про неухильне зростання числа інфікованих серед дорослого та дитячого населення [6, 12, 19]. Захворюваність на інфекційний мононуклеоз (ІМ) за останнє десятиліття збільшилася у 4 рази [20].

Нині вірус Епштейна-Барр (ВЕБ) визнаний етіологічним агентом не тільки ІМ, синдрому ліфаденопатії, але й таких онкологічних процесів, як назофарингеальна карцинома, лімфома Беркітта, Т-і В - клітинні лімфоми у ВІЛ-інфікованих [17, 21].

До недавнього часу ІМ вважався захворюванням, яке має схильність до самообмежування, тому що основним клініко-патогенетичним проявом цієї інфекції був доброякісний лімфопроліферативних процес [18]. Однак нині вже є достатня кількість робіт, які висвітлюють питання іммунопатологіі при ІМ, що змусило переглянути ставлення до цього захворювання, як до абсолютно доброякісного та довести можливість його затяжного та хронічного перебігу [14].

У наш час відомо, що IL-28A, IL-28B та IL-29, які також мають назву інтерферон-лямбда (INF-λ) 2,3 та 1 відповідно, відносяться до сімейства цитокінів 2 класу та являють собою нещодавно відкриту групу противірусних цитокінів. INF-λ індукує противірусні, антипроліферативні, протипухлинні та імунні ефекти. У порівнянні з INF-α, білки сімейства INF-λ мають меншу противірусну активність in vitro [21]. Існують роботи, в яких було продемонстровано, що INF-λ3 пригнічує вірусний гепатит С (ВГС) в залежності від дози і часу впливу, збільшує експресію генів стимульованих інтерфероном (ISGs, interferon stimulated genes) та підвищує противірусну активність INF-α [20].

Ген IL-28B локалізован у хромосомі 19q13. Поруч з ним виявлені поліморфні локуси (rs12979860, rs8099917). Даний ген кодує білок INF-λ-3, який є лігандом цитокинового рецептора II класу. IL-28B запускає JAK (янус-кіназу) / STAT (signal transducer and activator of transcription) - сигнальний каскад, що передає інформацію від позаклітинних поліпептидних сигналів до промоторів генів-мішеней, блокуючи синтез вірусних білків [14].

Відмінності послідовності ДНК розміром з один нуклеотид у геномі представників одного виду або між го-

* *Цитування при атестації кадрів: Сорокіна О.Г., Попов М.М., Лядова Т.І. Вплив поліморфізму гена інтерлейкіну-28 на ефективність противірусної терапії у пацієнтів з хронічною Епштейна-Барр вірусною інфекцією // Проблеми екології і медицини. – 2017. – Т. 21, № 1-2. – С. 26–29.*

мологічними ділянками гомологічних хромосом називається однонуклеотидний поліморфізм (ОНП, від англійського Single nucleotide polymorphism, SNP). Ділянка ДНК у регуляторній області гену IL-28B, в якому відбувається заміна нуклеотиду цитозин (C) на тимін (T), позначається як генетичний маркер rs12979860 (позначення ОПН за базою даних NCBI). Існують наступні можливі його генотипи: C/C, C/T та T/T.

Нині вже є роботи, в яких роглядалась важлива роль білків INF-λ для елімінації вірусного гепатиту С (ВГС), проте їх роль у перебігу хронічної ВЕБ-інфекції (ХВЕБ) до теперішнього часу не вивчалася. Також не до кінця вивченими залишаються питання терапії ІМ. Лікування пацієнтів з герпесвірусною інфекцією є непростим завданням. Причиною цього є складна стратегія паразитування, опортуністичні властивості патогенів, поліорганність уражень, наявність чисельних ускладнень та мультифакторна природа деяких порушень. Провідне місце серед етіотропного лікування пацієнтів з ХВЕБ займає противірусна терапія. Застосування ациклических аналогів гуанозіна при герпесвірусних інфекціях відповідає рівню доказовості А. Для лікування обстежуваних нами пацієнтів у якості противірусного препарату ми застосовували валацикловір. Цей препарат являє собою валіновий ефір ацикловіру, який під впливом кишкового і печінкового ферменту валацикловір-гідроксилази перетворюється в діючу речовину ацикловір. За рахунок модифікації молекули підвищується біодоступність препарату, яка є у 3-5 разів вищою, ніж у ацикловіру і становить 54-70%. Тому валацикловір можна застосовувати рідше (2-3 рази на добу), що робить терапію для хворого більш зручною. Препарат зазвичай добре переноситься, побічні явища відзначаються рідко [5, 7, 9, 18].

Мета дослідження. Метою даної роботи було вивчення впливу поліморфізму гена IL-28B на ефективність противірусної терапії у пацієнтів з ХВЕБ.

## Матеріали і методи дослідження

Нами було обстежено 92 пацієнта з ХВЕБ, основними клінічними проявами в яких були різні іммунопатолічні та імунодефіцитні стани. 38 пацієнтів (41,3%) були з генотипом CC (локус rs12979860 IL-28B) – вони увійшли у I групу спостереження; 32 пацієнта (34,7%) з генотипом CT склали II групу спостереження; 22 пацієнта (23,9%) з генотипом TT склали III групу спостереження. Вік пацієнтів становив від 19 до 65 років (середній вік 30 років ± 10,7 років), серед них жінки становили 63,0% (n = 58), чоловіки - 37,0% (n = 34).

Робота виконувалась на кафедрі загальної та клінічної імунології та алергології медичного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна та клінічних базах кафедри: Обласна клінічна інфекційна лікарня м Харкова і КЗОЗ «Міська поліклініка №6», а також на базі ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова НАН України» з 2014р. по 2017 р. у рамках науково-дослідної теми: «Вивчення ролі імунних, аутоімунних та метаболічних порушень у патогенезі та наслідки інфекційного процесу, викликаного герпесвірусами» (№ державної реєстрації №0112U005911).

Забір аналізів та їх технічне виконання проводили у клініко-діагностичній лабораторії Обласної клінічної інфекційної лікарні, частина аналізів виконувалася у лабораторії «Вирола». У процесі підтвердження діагнозу пацієнтам проводився загальний аналіз крові, комплекс молекулярно-генетичних та серологічних досліджень.

Для визначення поліморфності генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та метод поліморфізму довжин рестріктних фрагментів (ПДРФ) у режимі «реального часу» на ампліфікаторі Rotor-Gene-3000 фірми Corbett Research та на детектуючому ампліфікаторі ДТ-96 фірми ДНК-технологія. Для визначення алельних варіацій гену IL-28B використовували комерційну тест-систему фірми «ДНК-технологія». Для детекції досліджуваних поліморфізмів проводили ампліфікацію певних ділянок відповідних генів.

Для визначення точкових мутацій SNP 39738787C> T (rs12979860) гену ІЛ-28В використовували метод ПЛР та ПДРФ. У якості матеріалу для дослідження використовували ДНК, яку отримували з лейкоцитів за допомогою комерційних реагентів для виділення ДНК з клінічного матеріалу. Детекцію поліморфізму гена IL-28B (локус rs12979860) проводили методом ПЛР в режимі «реального часу» на детектуючих ампліфікаторі ДТ-96 фірми ДНК-технологія. Автоматична детекція результатів ампліфікації проводилася приладом ДП-96. ПЛР проводили в обсязі 35 мкл в розчині наступного складу: 20 мл розчину праймерів, 10 мкл суміші Taq-полімерази і буферу, а також 5 мкл ДНК.

Всі пацієнти у якості противірусної терапії отримували валацикловір у дозі 1000 мг 3 рази на добу протягом 14 днів, далі протягом 14 дні по 500 мг 3 рази на добу. Якщо повна елімінація до цього часу не наставала, то пацієнтам рекомендували продовжити прийом валацикловира у підтримуючих дозах (500 мг 1 р/добу.) на протязі 3-6 місяців. Після проведеного лікування у випадках, коли спостерігалася повна відсутнасть реплікативної активності ВЕБ як у крові, так і в слині, то ефективність противірусної терапії вважали високою (ВЕПВТ). Середньою ефективність противірусної терапії (СЕПВТ) вважали тоді, коли реплікативна активність ВЕБ реєструвалась у слині та була відсутня у крові. Низькою ефективність противірусної терапії (НЕПВТ) вважалася тоді, коли і у крові, і в слині продовжувала зберігатися реплікативна активність ВЕБ, але вона мала тенденцію до зниження.

Під час написання статті були дотримані міжнародні стандарти, рекомендовані комітетом публікаційній етики.

Обробка даних. Під час проведення статистичної обробки результатів дослідження використовувався пакет статистичних програм STATISTICA 10.0. Обробку результатів було проведено відповідно до рекомендацій до статистичної обробки медико-біологічних даних. Для кожного варіаційного ряду було розраховано середнє арифметичне (M), середнє квадратичне відхилення (σ) і середня похибка середнього арифметичного (m). Оцінка ймовірності різниць середніх значень у порівнюваних групах (p) проводилася за допомогою критерію Стьюдента-Фішера (t). Для проведення аналізу якісних даних використовувалися таблиці сполученості за критерієм Пірсона χ2. Критичний рівень статистичної значущості (p) дорівнював 0,05. Для визначення прогностичної значущості обчислюваних показників, які вивчалися, використовували аналіз Парето. Для виявлення кореляційних залежностей між певними показниками використовувалися коефіцієнт кореляції Пірсона (r) та ймовірність кореляції (p). Якщо r = 0, то кореляційний зв'язок вважали відсутнім; від 0,1 до ± 0,29 - слабким; від ±0,3 до ±0,69 - помірним (середнім); від ± 0,7 до ± 0,99 - вираженим (сильним), ± 1 - повним.

## Результати дослідження та їх обговорення

Аналіз результатів проведеної роботи дозволив виявити серед пацієнтів різних досліджуваних груп статистично значущі відмінності у відповіді на проведену противірусну терапію (табл. 1).

*Табл. 1.*

*Порівняння ефективності противірусної терапії у пацієнтів з хронічною ВЕБ-інфекцією при різних генотипах IL-28*

| IL-28B rs12979860 | Висока ефективність противірусної терапії | | Середня ефективність противірусної терапії | | Низька ефективність противірусної терапії | | Рівень значущостіі |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | (%) | n | (%) | n | (%) | p |
| CC | **23** | **60,5** | **11** | **29,0** | **4** | **14,3** | **0,001** |
| CT | 17 | 53,1 | 10 | 31,3 | 5 | 15,6 | p>0,05 |
| TT | 7 | 31,8 | 6 | 27,3 | 9 | 40,9 | p>0,05 |

Так у пацієнтів з генотипом CC (локус rs12979860 IL-28B) достовірно частіше відзначалася ВЕПВТ - в 60,5% випадків (23 пацієнта), що проявлялося стрімким поліпшенням самопочуття і зникненням скарг; у даної групи пацієнтів спостерігалася повна реконвалесценція та наявність тільки капсидного (нуклеарного) антигену IgG, що свідчить про перенесену інфекцію. Також у даної групи пацієнтів при проведенні дослідження методом ПЛР у більшості випадків результати дослідження на ВЕБ укрові та в слині були негативними.

В 29% випадків (11 чол.) у пацієнтів з генотипом CC відзначалася СЕПВТ, скарги і симптоми захворювання йшли менш стрімко, ніж у пацієнтів з ВЕПВТ. У частини пацієнтів при дослідженні методом ПЛР ВЕБ виявляли в досить високій концентрації в слині, однак в крові вірус виявлявся не у всіх пацієнтів, що свідчило про низький рівень віремії, що не детектується у частини пацієнтів ампліфікаційною системою.

Достовірно рідше у пацієнтів з генотипом CC відзначалася НЕПВТ - 4 пацієнти (14,3%). У таких пацієнтів протягом тривалого часу зберігалися скарги та різноманітні симптоми захворювання; у крові виявлявся комплекс ранніх антигенів; за результатами лабораторного дослідження методом ПЛР найчастіше вдавалося виявити ВЕБ у високих концентраціях як у крові, так і в слині.

Серед пацієнтів з генотипом CT ВЕПВТ відзначалася у 17 пацієнтів (53,1%), СЕПВТ у 10 пацієнтів (31,3%), а НЕПВТ - у 5 пацієнтів (15,5%).

Серед хворих з генотипом TT достовірно частіше зустрічався НЕПВТ - в 40,9% випадків, тоді як ВЕПВТ і СЕПВТ відзначався достовірно рідше - в 31,8% (7 пацієнтів) та 27,3% (6 пацієнтів) випадків відповідно.

## Висновки

Серед хворих ХВЕБ з генотипом CC та CT достовірно частіше відзначається ВЕПВТ. З урахуванням високої ефективності застосування валацікловіра у зазначених групах пацієнтів доцільно й надалі рекомендувати пацієнтам дотримуватися використовуваної схеми лікування. У пацієнтів з генотипом TT в більшості випадків відзналась НЕПВТ тому можна припустити, що для підвищення ефективності терапії таких пацієнтів необхідно доповнити схему лікування, яку використовували під час дослідження, препаратами з імуномодулюючою дією.

## Перспективи подальших досліджень

Наступним напрямком наших досліджень буде робота щодо оптимізації та підвищення ефективності противірусної терапії у пацієнтів з ХВЕБ в залежності від генотипу хворого.

## Література


1. Возіанова Ж. І. Інфекційний мононуклеоз як поліетіологічне захворювання / Ж. І. Возіанова, А. І. Глей // Сучасні інфекції. – 2004. – № 2. – С. 37-41.
2. Значение маркеров герпетических вирусов для оценки состояния здоровья детей / Н. Ю. Егорова, Ф. С. Харламова, В. Ф. Учайкин и др. //Детские инфекции. - 2008. - № 2. - С. 16 - 21.
3. Инфекционный мононуклеоз, ассоциированный с вирусом герпеса 6 типа / Е. В. Новосад, О. В. Шамшева, Н. Д. Львов и др. // Детские инфекции. - 2008. №1. – С. 36-38.
4. Исаков В. А. Герпесвирусные инфекции человека: Руководстводля врачей / В. А. Исаков, Е. И. Архипова, Д. В. Исаков. - СПб.: СпецЛит, 2006. - 302 с.
5. Казмирчук В.Е. Рекомендации по лечению герпесвирусных инфекций человека / В.Е. Казмирчук, Д.В. Мальцев // Український медичний часопис. - 2012. - № 5 (91). - С. 9-11.
6. Кельцев В. А. Функциональное состояние и взаимосвязь иммунной и эндокринной систем у больных Эпштейн-Барр вирусным мононуклеозом / В.А. Кельцев, Л. И. Гребенкина, Е. В. Петрова // Детские инфекции. - 2005. - № 1.-С. 29-32.
7. Основы иммунологии Ярилин А.А. М.: Медицина, 1999. - 608с.
8. Фомин, В. В. О возможных механизмах гиперчувствительности немедленного типа при инфекционном мононуклеозе у детей / В. В. Фомин, Е. Е. Удилова // Урал. мед. журн. - 2007. - № 3. - С. 14 - 20.
9. Шестаков И.В. Современные подходы к лечениюЭпштейна-Барр вирусной инфекции у взрослых / И.В. Шестаков, Н. Д .Ющук // Medical journal: Лечащий врач. – 2011. - №2.- 88 - 90 с.
10. Bagert B.A. Epstein-Barr virus in multiple sclerosis // Curr. Neurol. Neurosci. Rep.- 2009.- №9.-p.405-410.
11. Chan C.W., Chiang A.K., Chan K.H., Lau A.S. Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis in Chinese children. Pediatr Infect Dis J. — 2003. - №22. - p.974-978.
12. EBV gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells / S. J. Molesworth, C. M. Lake, C. M. Borza // J. Virol. - 2000. - Vol. 274, № 14. - P. 6324 - 6332.
13. Epstein-Barr virus in hepatocellular carcinogenesis / W. Li, B.A. Wu, Y.M. Zeng et al. // World J. Gastroenterol. - 2004. - Vol. 10, № 23. - P. 3409 -3413.
14. IL-29/IL-28A suppress HSV-1 infection of human NT2-N neurons. / Lin Zhou, Jieliang Li, Xu Wang, Li Ye, Wei Hou, Jie Ho, He Li // Journal of NeuroVirology – 2011, Vol. 17, Issue 3, pp 212–219
15. Immunological criteria for prescribing immunocorrecting drugs for infectious mononucleosis in children / G.F. Zheleznikova, V.V. Ivanova, A.S. Levina, etc. // Allergology and Immunology. - 2006. - No. 3. - C.
16. Lander E.S., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 2001;№ 409(6822):860-921
17. Marcello T. et al., Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. Gastroenterology. 2006 Dec; № 131(6). – P. 87–98.

18. Nielson textbook of pediatrics // R.E. Behrman, R.M. Kliegman, H.B. Jenson.- 2004.- №9.-p.2615-2619.
19. Nielsen, L. A mucapture immunoassay for detection of human herpesvirus-6 (HHV-6) IgM antibodies in human serum / L. Nielsen, B.F. Velstergaard // J. Clin. Virol. - 2002. - Vol. 25. - P. 145 - 154.
20. Rauch A. and coauthors. Genetic variation in IL28B is associated with Chronic Hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. Gastroenterology. – 2010. - №138 (4). – p.1338-1345.
21. Sheppard P. and coauthors, IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. Nature Immunoly, 2003; № 4 (1). – P. 63–68.