

Інтерферон-опосередкована регресія фіброзу в ході противірусної терапії хронічного гепатиту С при різних варіантах поліморфізму гена IL28b

Д.Є. Телегін¹, В.М. Козько², О.Є. Бондарь², Г.М. Дубінська³, О.М. Минак³, М. Мунтеану⁴

¹Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

²Харківський національний медичний університет

³Полтавська Українська медична стоматологічна академія

⁴Гепато-гастроентерологічне відділення клініки Pitié-Salpêtrière, Париж, Франція

Вивчення закономірностей фіброгенезу при хронічному гепатиті С (ХГС) дає можливість прогнозування та адекватного спостереження за хворими на ХГС.

Проведено дослідження зв'язку між ступенем зниження HCV-індукованого фіброзу печінки на момент закінчення противірусної терапії ХГС та основними варіантами поліморфізму гена IL28b. Виявлено пряму кореляцію між Т-алелем гена IL28b та швидкістю прогресування ХГС до цирозу печінки і гепатоцелюлярної карциноми. Встановлено, що не усі хворі на ХГС, які досягають стійкої вірусологічної відповіді, позбуваються ризиків, пов'язаних із наслідками персистенції вірусу HCV. Доведено, що у носіїв Т-алеля в рестрикційному фрагменті rs12979860 гена IL28b навіть після елімінації вірусу гепатиту С може зберігатися підвищена активність клітинних факторів, що підтримують процеси фіброгенезу, моно- та поліклональну проліферацію астроцитів та В-лімфоцитів із високим ризиком В-клітинної та гепатоцелюлярної неоплазії. Додатковими тригерами прогресування фіброзу в таких випадках, безперечно, можуть виступати ендогенні (стеатоз) та екзогенні (токсико-аліментарні) чинники. Тому є доцільним запровадження диспансерного спостереження із моніторингом фіброгенезу (Fibrotest) та канцерогенезу (α -FP) не лише за хворими із наявним хронічним гепатитом С, але і за такими пацієнтами, що досягли авіремії, проте і надалі належать до груп ризику прогресування фіброзу, цирозу та гепатоцелюлярної карциноми.

Ключові слова: хронічний гепатит С, стійка вірусологічна відповідь, генотип, противірусна терапія, фіброз.

Поява нових класів препаратів прямої противірусної дії суттєво збільшує шанси на досягнення успіху в терапії хронічного гепатиту С (ХГС). Загальноновизнаним критерієм повноговиліковування ХГС є стійка вірусологічна відповідь (SVR), що визначається як авіремія протягом 24 тиж після завершення курсу противірусної терапії (ПВТ). Однак не менш важливим показником одужання, що корелює із рівнем виживання хворих, є зниження некротично-запальної активності та стадії фіброзу печінки. Водночас широко відомі факти, коли попри досягнення SVR гістологічна картина ХГС не демонструє покращання, а деколи навпаки – набуває ознак циркуляторної трансформації і гепатоцелюлярної неоплазії [1]. Тому вивченню закономірностей фіброгенезу при ХГС сьогодні присвячують багато досліджень [2, 3]. Зокрема, виявлено пряму кореляцію між Т-алелем гена IL28b та швидкістю прогресування ХГС до цирозу печінки і гепатоцелюлярної карциноми [4]. Однак залишаються нез'ясованими

закономірності інтерферон-опосередкованої регресії фіброзу та його прогресування після завершення ПВТ.

Мета дослідження: встановлення зв'язку між ступенем зниження HCV-індукованого фіброзу печінки на момент закінчення ПВТ ХГС та основними варіантами поліморфізму гена IL28b.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У ході дослідження було ретроспективно проаналізовано результати лікування 324 хворих, що отримували стандартну ПВТ з приводу ХГС 1b генотипу у Львівській, Полтавській, Харківській обласних інфекційних клінічних лікарнях (167 осіб) та у гепатологічному відділенні лікарні Pitié-Salpêtrière Hospital, м. Париж (157 осіб). Стандартом лікування ХГС 1b генотипу вважали комбінацію пегільованих інтерферонів PegIFN-alpha2b (1,5 мкг/кг) або PegIFN-alpha2a (180 мкг) і рибавіріну (10 мг/кг) із загальною тривалістю 12 міс. Із дослідження вилучали пацієнтів, що були коінфіковані HBV або мали іншу патологію печінки (алкогольну хворобу печінки, неалкогольний стеатогепатит, аутоімунний гепатит, гемахроматоз), а також хворих, яким проводили монотерапію PegIFN, комбінацією лінійних IFN і рибавіріну, та тих, що лікувалися повторно. У групах порівняння оцінювали три варіанти вірусологічної відповіді: швидку (RVR, 4-й тиждень ПВТ), ранню (EVR, 12-й тиждень ПВТ) та стійку (SVR, 24-й тиждень після завершення ПВТ). Вікова, гендерна та клінічна характеристики хворих наведені у табл. 1.

Вірусне навантаження гепатиту С визначали при використанні проби кількісного аналізу Abbott M2000sp/rt HCV в реальному часі (Abbott, Ранджі, Франція). Генотипи вірусу гепатиту С визначали в ході часткового секвенування гену NS5B та порівняння отриманої послідовності нуклеотидів з еталонним штамом шляхом філогенетичного аналізу.

Стадію фіброзу оцінювали за шкалою METAVIR методом Fibrotest, що обраховували за значеннями віку, статі та п'яти біохімічних показників: α_2 -макроглобулін, гаптоглобін, гаммаглутамілтранспептидаза (GGT), загальний білірубін та аполіпопротеїн А1 [5, 6]. Співвідношення шкал Fibrotest та METAVIR із описом відповідних гістологічних змін наведено у табл. 2.

Аполіпопротеїн А1, α_2 -макроглобулін та гаптоглобін визначали методом турбідиметрії (системами Modular та Cobas Integra від Roche Diagnostics, Мангейм, Німеччина) та нефелометрії (BNI від Dade-Behring-Siemens Healthcare Diagnostics, Дірфілд, Іллінойс, США), а також при викорис-

Таблица 1

Клінічна характеристика хворих

Ознака	Категорія	Значення, %
Вік	< 40 років	40,7
	40-60 років	52,5
	> 60 років	6,8
Стать	Чоловіча	59
Вірусні чинники	Генотип 1b HCV	95
	Високе навантаження (>600 000 IU/ml)	75
Вихідна стадія фіброзу (METAVIR)	F1-F2	23,7
	F3-F4	37,4

Таблица 2

Характеристика стадій фіброзу відповідно до шкал Fibrotest, METAVIR, Knodell, Ishak [6]

Опис фіброзу	Шкала Fibrotest	Шкала METAVIR	Шкала Knodell	Шкала Ishak
Цироз	0.75-1.00	F4	F4	F6
Фіброз портальних трактів + множинні септи без цирозу	0.73-0.74	F3-F4	F3-F4	F5
	0.59-0.72	F3	F3	F4
Фіброз портальних трактів + поодинокі септи	0.49-0.58	F2	F1-F3	F3
	0.32-0.48	F1-F2	F1-F3	F2-F3
Фіброз лише портальних трактів	0.28-0.31	F1	F1	F2
	0.22-0.27	F0-F1	F0-F1	F1
Фіброз відсутній	0.00-0.21	F0	F0	F0

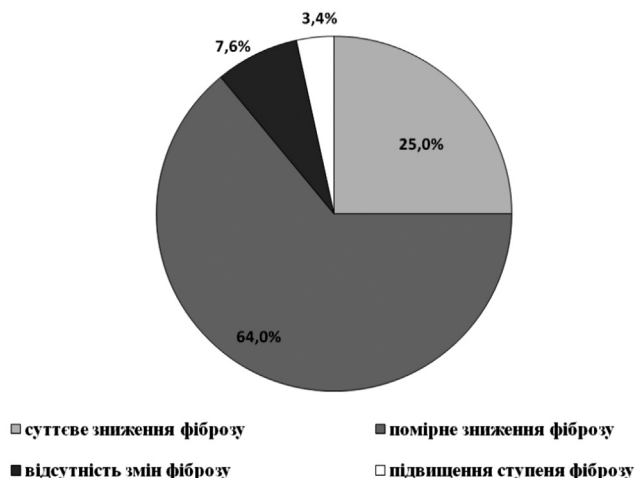
таних реагентів виробника (Roche Diagnostics, Мангейм, Німеччина, та Siemens Healthcare Diagnostics, Дірфілд, Іллінойс, США) і реагентів Diagam (Гіленг'єн, Бельгія) для турбідиметричного аналізу на α_2 -макроглобулін. Коefіцієнт варіації всіх тестів був нижче 3%. GGT, аланінамінотрансфераза (АЛТ), аспаратамінотрансфераза (АСТ), загальний білірубін, загальний холестерин, тригліцериди та глюкозу натще визначали, використовуючи аналізатори Hitachi 917, Modular та Cobas Integra (Roche Diagnostics, Мангейм, Німеччина). АктіТест враховував вище перераховані маркери та АЛТ. У 65 хворих стадію фіброзу було оцінено у кратних обмеженнях: до та після курсу ПВТ.

В усіх 324 пацієнтів визначали варіант поліморфізму гену IL28b за встановленим одонуклеотидним поліморфізмом рестрикційного фрагмента rs12979860 19-ї хромосоми, вивчаючи вільно циркулюючу ДНК сироватки крові після екстракції автоматизованою системою NucliSENS[®]easyMag[®]. Генотип IL28b визначали аналізом кривої плавлення гібридизаційних зондів з використанням інструменту LightCycler[®]480 (Roche Diagnostics, Мелан, Франція). Генотипи IL28b було визначено як «сс», «ст» або «тт». Генотипування поліморфної ділянки проводили із використанням системи ABI TaqMan allelic discrimination kit та the ABI7900HT Sequence Detection System (виробництво Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

У статистичному аналізі використовували: точний критерій Фішера, критерій хі-квадрат, критерій Стюдента, критерій Манна-Уїтні та складну логістичну регресію для багатоваріаційного аналізу. Для всіх аналізів використовували двосторонні статистичні випробовування; р-значення, рівне 0,05 чи менше, вважалося значним. В оцінці усіх достовірностей використовували програмне забезпечення Number Cruncher Statistical Systems 2003 (NCSS, Кайсвіль, Юта, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Усі варіанти виявлених нами змін стадій фіброзу на момент закінчення ПВТ порівняно із вихідними значеннями розподілилися на наступні групи: 1 – суттєве зниження фіброзу (понад 0,35 пунктів за шкалою Fibrotest або на два ступеня за шкалою METAVIR; табл. 2) констатовано у 25% пролікованих пацієнтів, 2 – помірне зниження фіброзу (в середньому на 0,17 пунктів за шкалою Fibrotest або на один ступінь за шкалою METAVIR) – у 64% хворих, 3 – незмінний ступінь фіброзу – 7,6%, зростання фіброзу (в середньому на 0,24 пункти за шкалою Fibrotest або до 1 ступеня за шкалою METAVIR) – 3,4% (мал. 1).



Мал. 1. Варіанти змін стадії фіброзу в ході ПВТ ХГС

Порівняльна характеристика хворих в основних групах дослідження, n=324 (%)

Ознаки	Україна	Франція	P-Value
Вік > 40 років	90 (54)	121 (77)	0,0004
Чоловіча стать	98 (59)	93 (59)	0,97
Раса – європеїдна	167 (100)	120 (76)	<0,0001
- негроїдна	0 (0)	28 (18)	-
- азійська	0 (0)	9 (6)	-
Індекс маси тіла >25	127 (76)	46 (34)	<0,0001
Високе вірусне навантаження HCV RNA >600.000 IU/mL	82 (49)	82 (52)	0,68
«Сприятливі до лікування» генотипи G2/G3	30 (18)	36 (23)	0,36

Під час порівняльного аналізу таких традиційно визначальних предикторів SVR, як вірусне навантаження, генотип HCV, ступінь фіброзу, вік та стать, було встановлено, що жодна з досліджуваних груп не мала переваг щодо шансів на досягнення SVR. Достовірні відмінності стосувалися лише суттєвого переважання хворих із надмірною масою тіла серед пацієнтів вітчизняних клінік (76% проти 34%, p<0,0001; негативний предиктор SVR) та значного числа осіб негроїдної раси серед пацієнтів клініки Pitié-Salpêtrière (18% проти 0%, p<0,0001; негативний предиктор SVR) (табл. 3).

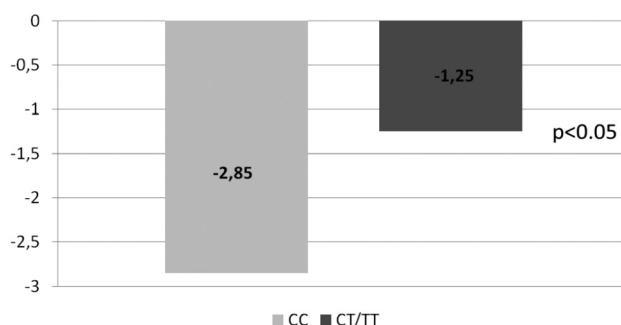
Попри те, що для осіб негроїдної раси, як відомо, характерно переважання Т-алеля гена IL28b за даними проведених молекулярно-генетичних досліджень відмінності у частоті варіантів поліморфізму IL28b серед хворих українських та французьких клінічних центрів були статистично не достовірними (табл. 4).

Загальне співвідношення основних варіантів поліморфізму гена IL28b серед 324 обстежених хворих становило: «cc» – 34%, «ct» – 50%, «tt» – 16%. Незважаючи на тотожність рандомізованих груп за предикторами SVR, аналіз ефективності ПБТ у цих групах встановив статистично достовірну відмінність: частота SVR серед українських пацієнтів – 63% проти 47% – серед пацієнтів клініки Pitié-Salpêtrière (p<0,05). На перший погляд, таку високу ефективність ПБТ в українських клініках можна було пояснити молодшим віком пацієнтів або гіршим комплаєнсом французьких хворих, однак істинні причини відмінностей у частоті SVR у цих групах вдалося з'ясувати лише завдяки побудові п'яти 2-факторних моделей з фактором популяції та з кожним з п'яти прогностичних факторів: генотип IL28b, стадія фіброзу, ступінь запалення, генотип вірусу та вірусне навантаження. Значення співвідношення шансів (odds ratio, OR) з однією змінною групи перевірки достовірності складало 1,98 (1,14 – 3,45; p=0,02). При цьому прогностичне значення генотипу IL28b в українській групі виявилось достовірно вищим – 8,95 (діапазон – 2,16–37,1; p=0,003), ніж у французькій – 3,32 (діапазон – 1,29–8,53; p=0,01), у середньому – співвідношення шансів (OR) складало 4,84 (діапазон 2,59–12,50; p=0,0001). Отже, основною причиною відмінностей у частоті SVR виявилася результуюча багатфакторного варіаційного аналізу, що враховувала п'ять основних ознак: IL28b, стадія фіброзу (Fibrotest), ступінь запалення (ActiTest), генотип вірусу та вірусне навантаження.

Відповідно до мети дослідження було співставлено динаміку фіброзу у ході ПБТ у двох групах хворих: із відсутнім (n=110) та з наявним (n=214) Т-алелем гена IL28b. Цілковито прогнозовано констатували найбільш значне зниження ступеня фіброзу серед хворих із сприятливим «cc» – варіантом гена IL28b, адже саме у цій групі хворих була найвища частота SVR (87% проти 44% при «ct/tt» генотипах). Однак, на нашу думку, більш важливими є виявлені відмінності у ди-

Таблиця 4
Частота варіантів поліморфізму гена IL28b в основних групах дослідження (n=324)

Варіанти поліморфізму гена IL28b	Франція, %	Україна, %	p
«cc»	33	35	0,46
«ct»	48	52	
«tt»	19	13	



Мал. 2. Ступінь зниження фіброзу печінки у хворих, що досягли SVR після курсу ПБТ ХГС 1b генотипу залежно від поліморфізму гена IL28b

наміці фіброзу всередині групи хворих, що досягли SVR, адже саме ці пацієнти вважаються остаточно вилікованими і не підлягають подальшому диспансерному спостереженню. Серед осіб, що досягли стійкої авіремії, найнижчий ступінь зниження фіброзу (в середньому на 1,25 пункту за шкалою METAVIR) виявлено у носіїв Т-алеля гена IL28b, натомість максимальне зниження фіброзу констатовано в осіб, у яких одонуклеотидний поліморфізм IL28b відповідає генотипу «cc» (p<0,05) (мал. 2).

Отримані дані свідчать про те, що не всі хворі на ХГС, які досягають стійкої вірусологічної відповіді, позбуваються ризиків, пов'язаних із наслідками персистенції вірусу HCV. Дані спостереження дозволяють припустити, що у носіїв Т-алеля в рестрикційному фрагменті rs12979860 гена IL28b навіть після елімінації вірусу гепатиту С може зберігатися підвищена активність перисинусоїдальних клітин Іто та експресія білків-інгібіторів апоптозу (таких, як Bcl-2), що підтримують процеси фіброгенезу, моно- та поліклональну проліферацію астроцитів та В-лімфоцитів із високим ризиком В-клітинної та гепатоцелюлярної неоплазії. Додаткови-

ми триггерами прогрессування фіброзу в таких випадках, безперечно, можуть виступати ендегенні (стеатоз) та екзогенні (токсико-аліментарні) чинники. Тому, на нашу думку, доцільним є запровадження диспансерного спостереження із моніторингом фіброгенезу (Fibrotest) та канцерогенезу (α -FP) не лише за хворими із наявним хронічним гепатитом С, але і за такими пацієнтами, що досягли авіремії, проте і надалі належать до груп ризику прогресування фіброзу, циррозу та гепатоцелюлярної карциноми.

Интерферон-опосредствованная регрессия фиброза в ходе противовирусной терапии хронического гепатита С при разных вариантах полиморфизма гена IL28b

Д.Е. Телегин, В.Н. Козько, А.Е. Бондарь, Г.М. Дубинская, Е.Н. Минак, М. Мунтеану

Изучение закономерностей фиброгенеза при хроническом гепатите С (ХГС) дает возможность прогнозирования и адекватного наблюдения за больными ХГС. Проведено исследование связи между степенью снижения HCV-индуцированного фиброза печени на момент окончания противовирусной терапии ХГС и основными вариантами полиморфизма гена IL28b. Выявлена прямая корреляция между T-аллелью гена IL28b и скоростью прогрессирования ХГС с трансформацией в цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному. Установлено, не все больные ХГС, достигающие устойчивого вирусологического ответа, избавляются от рисков, связанных с последствиями персистенции вируса HCV. Доказано, что у носителей T-аллели в рестрикционном фрагменте rs12979860 гена IL28b даже после элиминации вируса гепатита С может сохраняться повышенная активность клеточных факторов, поддерживающих процессы фиброгенеза, моно- и поликлональную пролиферацию астроцитов и В-лимфоцитов с высоким риском В-клеточной и гепатоцеллюлярной неоплазии. Дополнительными триггерами прогрессирования фиброза в таких случаях, безусловно, могут выступать эндогенные (стеатоз) и

экзогенные (токсико-алиментарные) факторы. Поэтому целесообразно введение диспансерного наблюдения с мониторингом фиброгенеза (Fibrotest) и канцерогенеза (α -FP) не только за больными с хроническим гепатитом С, но и за пациентами, достигшими авиремии, однако и в дальнейшем отнесенным к группам риска прогрессирования фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы.

Ключевые слова: хронический гепатит С, стойкий вирусологический ответ, генотип, противовирусная терапия, фиброз.

Interferon-mediated regression of fibrosis in the course of antiviral therapy for chronic hepatitis C with various forms of gene polymorphism IL28b

D.E. Telegin, V.N. Kozko, A.E. Bondar, G.M. Dubinskaya, E.N. Minack, M. Munteanu

The study of patterns of fibrogenesis in HCV provides predictability and adequate monitoring of patients with HCV. A study of the relationship between the degree of reduction of HCV-induced liver fibrosis at the end of the HCV-antiviral therapy and main variants of the gene polymorphism IL28b. A direct correlation between the T allele of the gene IL28b and rate of progression of chronic hepatitis C with the transformation in cirrhosis (LC) and hepatocellular carcinoma (HCC). Established, not all patients with chronic hepatitis C, reaching an SVR, get rid of the risks associated with the effects of the persistence of HCV. It is proved that the T allele carriers in the restriction fragment gene rs12979860 IL28b, even after elimination of hepatitis C virus can be maintained high activity of cellular factors supporting fibrogenesis, mono- and polyclonal astrocyte proliferation and B-lymphocytes with a high risk of B-cell and hepatocellular neoplasia. Additional triggers the progression of fibrosis in these cases, of course, can act endogenous (steatosis) and exogenous (toxic-nutritional) factors. Therefore, the introduction of appropriate follow-up with monitoring of fibrogenesis (Fibrotest) and carcinogenesis (β -FP), not only for patients with existing chronic hepatitis C, but also for patients who have reached the aviraemia, however, and later risk to a progression of fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinomas.

Key words: chronic hepatitis C, SVR, genotype, antiviral therapy, fibrosis.

Сведения об авторах

Телегин Дмитрий Евгеньевич – Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого, 79010, г. Львов, ул. Пекарская, 69; тел.: (032) 275-76-32.

Козько Владимир Николаевич – Харьковский национальный медицинский университет, 61022, г. Харьков, просп. Ленина, 4; тел.: (057) 705-07-11.

Бондарь Александр Евгеньевич – Харьковский национальный медицинский университет, 61022, г. Харьков, просп. Ленина, 4; тел.: (057) 705-07-11.

Дубинская Галина Михайловна – Полтавская Украинская медицинская стоматологическая академия, 36024, г. Полтава, ул. Шевченко, 23; тел.: (0532) 50-27-01.

Минак Елена Николаевна – Полтавская Украинская медицинская стоматологическая академия, 36024, г. Полтава, ул. Шевченко, 23; тел.: (0532) 50-27-01.

Мунтеану Мона – Клиника Питье-Сальпетриер, 75651, г. Париж, округ 13, 47–83, бульв. Де Лопиталь; тел.: +33 (1) 42 16 00 00.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hepatocellular carcinoma after sustained virologic response in hepatitis C patients without cirrhosis on a pre-treatment liver biopsy Justin L. Sewell, Kristine M. Stick, Alexander Monto // Eur J Gastroenterol Hepatol. – 2009. – № 21 (2). – P. 225–229.
- Interleukin-28B polymorphisms are associated with histological recurrence and treatment response following liver transplantation in patients with hepatitis C virus infection. Charlton MR, Thompson A, Veldt BJ, Watt K, Tillmann H, Poterucha JJ, Heimbach JK, Goldstein D, McHutchison J. // Hepatology. – 2011. – 53 (1). – P. 317–324.
- Role of IL28B polymorphism in the development of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma, graft fibrosis, and posttransplant antiviral therapy. Eurich D., Boas-Knoop S., Bahra M., Neuhaus R., Somasundaram R., Neuhaus P., Neumann U., Seehofer D. // Transplantation. – 2012. – № 93 (6). – P. 644–649.
- Genomics and HCV infection: Progression of fibrosis and treatment response Emilie Estrabaud, Michel Vidaud, Patrick Marcellin, Tarik Asselah // Journal of Hepatology. – 2012. – Vol. 57. – P. 1110–1125.
- Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group // Hepatology. – 1996. – № 24 (2). – P. 289–293.
- Ngo Y, Munteanu M, Messous D, Charlotte F, Imbert-Bismut F, Thabut D, Lebray P, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V, Poynard T. A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C // Clin Chem. – № 52 (10). – P. 1887–1896.

Статья поступила в редакцию 20.06.2013

Все указанные в статье лабораторные исследования выполняются в Медицинской лаборатории Синэво