

ЗНАЧЕНИЕ ГЕНОТИПИЧЕСКИХ И ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК В ПАТОГЕНЕЗЕ И ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ НСV-ИНФЕКЦИИ

Набиева У. П., Исмаилова А. А., Адылов Д. Г.

*Республиканский научный центр Иммунологии Министерства здравоохранения
Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан*

Статья посвящена исследованию соответствия генотипа гена *IL-28B* вирусологическим, биохимическим и иммунологическим показателям больных хроническим вирусным гепатитом С в ходе получения противовирусной терапии пегилированным интерфероном α и рибавирином. Было установлено, что при генотипе *CC* гена *IL-28B* по локусу *rs12979860*, при котором чаще выявлялся не 1 генотип вируса гепатита С, наиболее часто отмечается самоизлечиваемость и высокая эффективность ПВТ. Со стороны реактогенности организма это сопровождалось более выраженным цитолитическим синдромом и высокой иммунологической реактивностью организма, проявлявшейся в повышении экспрессии цитотоксических лимфоцитов $CD8^+$, активационных маркеров $CD23^+$ и $CD38^+$.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит С, интерлейкин-28, генетические предикторы, иммунитет, иммуноглобулины

Введение. НСV-инфекция входит в число социально значимых заболеваний. По оценке ВОЗ, в мире 170 млн. людей, или 3% населения, инфицированы вирусом гепатита С. Ежегодно регистрируются 3-4 млн. новых случаев заражения. Хроническая НСV-инфекция (ХВГС) снижает трудоспособность, повышает риск развития серьезной депрессии, увеличивает затраты медицинских ресурсов, увеличивает смертность.

Генетические факторы организма человека взаимосвязаны с эффективностью лечения ХВГС, так как имеются этнические различия в ответе на лечение. Показано, что два из этих SNP имеют более высокую прогностическую ценность благоприятного ответа на лечение у ВГС-инфицированных пациентов с 1 генотипом *rs12979860* [5, 12] и *rs8099917* [4, 6, 8]. Однако еще окончательно не определено, какой SNP в наибольшей степени влияет на СВО. Однако некоторые исследования доказывают большую прогностическую ценность определения SNP *rs12979860* по сравнению с *rs8099917* [3]. Выявлено, что частота «благоприятного» аллеля С в участке *rs12979860* гена *IL28B* была самой высокой у азиатов и самой низкой у афроамериканцев. Более того,

частота распространенности *CC* генотипа *rs12979860* взаимосвязана со СВО в каждой популяции [5].

Несмотря на установление тесной ассоциации между полиморфизмом *IL28B* и СВО, основные механизмы этого процесса все еще остаются неизученными. Было найдено, что у больных с ХВГС генотип *IL28B* связан с дифференцированной экспрессией внутрипеченочных стимулируемых интерфероном генов [9]. Кроме того, сывороточные уровни *IL28A/B* оказались значительно выше у больных ХВГС с «благоприятным» аллелем генотипа *IL28B* [10]. Все эти признаки указывают на прямой антивирусный и иммуноопосредованные эффекты *IL28B*, которые могут зависеть от этих полиморфизмов [11], но его способность прогнозирования у каждого отдельного человека не является абсолютной. Поэтому, по-прежнему необходимо учитывать базовые характеристики стадии болезни конкретного пациента, его иммунореактивность, но в комплексе с его генетическими маркерами. При высоком медико-социальном значении хронической НСV-инфекции изучение иммунопатогенеза заболевания, а также механизмов резистентности больных к терапии основны-

ми противовирусными препаратами (пегилированным интерфероном α и рибавирином) позволяет не только повысить эффективность лечения, но и выявить факторы, ответственные за спонтанное освобождение организма от возбудителя и развитие хронического инфекционного процесса.

Целью нашего исследования было определение частоты встречаемости полиморфизмов гена интерлейкина-28В (*IL-28B*) у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С и изучение взаимосвязи значимых полиморфизмов гена *IL-28B* с биохимическими и иммунологическими показателями.

Материалы и методы. Нами обследовано 128 больных ХВГС, в возрасте от 16 до 58 лет (средний возраст $35,6 \pm 2,8$). Длительность заболевания колебалась от 1 года до 10 лет (в среднем $3,8 \pm 1,1$ года). Диагноз установлен врачами инфекционистами и гепатологами на основании результатов клинического обследования, данных лабораторных и инструментальных методов исследования. Диагноз был верифицирован на основании клинико-лабораторных данных на основании приказа МЗ РУз № 5 от 05.01.2012 г. Комплекс первичного обследования включал традиционный набор клинических и биохимических лабораторных показателей, УЗИ, исследование серологических маркеров (анти-НСV-IgG).

Иммунологические исследования проводились иммунофлуоресцентным методом с применением ФИТЦ-моноклональных антител фирмы «Сорбент» (Москва, Россия). Сывороточный уровень основных иммуноглобулинов был изучен ИФА-методом с помощью тест-систем «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия).

У больных использован метод ПЦР для

определения RNA-НСV в крови. Генотипы НCV (1а, 1в, 2а, 2в, 3а) и нуклеотидный полиморфизм гена *IL-28B* определяли с помощью ПЦР-метода с использованием специфических праймеров. Для типирования полиморфных вариантов изучаемых генов были использованы препараты ДНК, полученные из 5 мл венозной крови. Выделение ДНК из лейкоцитов венозной крови человека проводилось модифицированным спиртово-солевым методом. Генотипирование проводилось методом пиросеквенирования (PyroMark Q24, PyroMark Gold Q24 Reagents, Qiagen, Germany). Репликационное генотипирование проводилось методом HRM-qPCR (Stratagene M*3005P, Agilent Technologies, Germany; DT-Prime, ДНК-Технология, Россия).

Результаты и обсуждение. Мы изучили нуклеотидные полиморфизмы гена *IL-28B* по rs12979860 и rs8099917 в различных группах: контрольная группа, общая группа больных ХВГС, больные ответившие на противовирусную терапию (ПВТ), больные, неответившие на ПВТ и группа лиц, самоизлечившихся от гепатита С. Распределение встречаемости вариантов нуклеотидного полиморфизма гена *IL-28B* в зависимости от рассматриваемых локусов в этих группах представлено на рис. 1 и 2.

Как мы видим из представленных данных (рис. 1), по локусу rs12979860 наиболее часто встречаемым генотипом был СТ, затем генотип СС, и наименьшее распространение имел генотип ТТ. Однако распространенность среди рассматриваемых групп была несколько иной: в группе лиц, самоизлечившихся от гепатита С частота генотипа СС была 80,1 % случаев, в то время как в группе, ответивших на терапию в 41,6 % случаев (в контрольной груп-

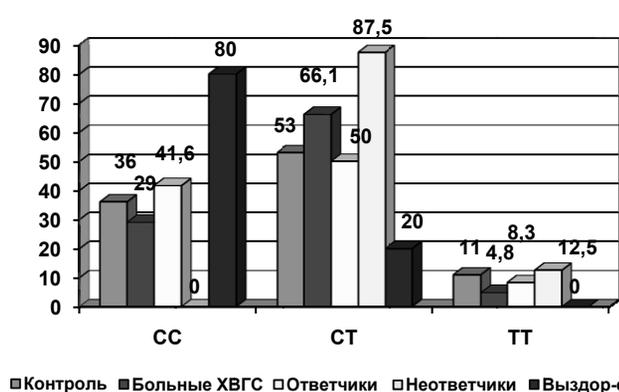


Рис. 1. Распределение генотипов гена ИЛ-28В по локусу rs12979860



Рис. 2. Распределение генотипов гена ИЛ-28В по локусу rs8099917

пе – 36,0%), а среди больных, неответивших на ПВТ данный генотип выявлен не был. Т.е. отмечается более «благоприятная» настроенность генотипа СС относительно исходов заболевания и эффективности терапии по сравнению с другими генотипами по локусу rs12979860.

При рассмотрении распределения генотипов по локусу rs8099917, наиболее часто встречался генотип ТТ, генотип GG был выявлен только в 5% случаев в контрольной группе, у больных ХВГС данный генотип нами выявлен не был. Генотип ТТ отмечен у 100% лиц, самоизлечившихся от гепатита С, однако этот генотип был выявлен в 76,9% случаев в группе, ответивших на терапию и в 37,3% случаев в группе, неответивших на ПВТ (в контрольной группе – 57,0%).

На следующем этапе наших исследований мы более прицельно изучали вирусологические, биохимические и иммунологические показатели по локусу rs12979860 гена *IL28B*. Всех больных ХВГС, получивших ПВТ, мы разделили на 2 группы: 1-я группа с «благоприятным» генотипом СС, а 2-я группа с «неблагоприятными» генотипами (СТ и ТТ)

Были проанализированы генотипы HCV, уровни вирусной нагрузки, длительность и степени активности заболевания у лиц с различными вариантами гена *IL28B* вне зависимости от назначенной терапии и ее эффективности. Интересно, что у лиц с разными генотипами вируса частота встречаемости вариантов SNP 397387870T (rs12979860) гена *IL28B* различается. 1 генотип HCV был выявлен у 58,3% больных с генотипом rs12979860 гена *IL28B* СС и у 82,9% больных с генотипом rs12979860 гена *IL28B* СТ, 2 генотип HCV выявлен у 25,0% и 9,8% случаях соответственно, 3 генотип HCV у 16,7% и 7,3% случаев соответственно. Как мы видим из представленных данных, у подавляющего большинства больных с генотипом СТ гена *IL28B* был выявлен 1 генотип HCV (82,96%), в то время как выявляемость не 1 генотипа HCV составила всего 17,1% случаев. Возможно, это является одной из причин более частого «неответа» больных с генотипом СТ гена *IL28B* на противовирусную терапию.

Учитывая, что активность патологического процесса отражает степень реагирования со стороны организма на внедрение инфекта, мы изучили встречаемость различных степеней активности в сравниваемых группах больных.

Мы сравнили обе группы по частоте встречаемости каждой из степеней биохимической активности. В результате проведенного анализа, мы выявили, что отсутствие активности реже отмечена при генотипе rs12979860 гена *IL28B* СС (в 12,5% случаев), чем при генотипе rs12979860 гена *IL28B* СТ (в 28,6% случаев). Наиболее часто в обеих группах была выявлена минимальная степень активности (1,5-2 нормы) (в 56,7,1% и 46,4% случаев, соответственно). Встречаемость низкой (2-3 нормы), умеренной (3-5 норм) и выраженной (более 5 норм) степеней активности была примерно равной в исследуемых группах (с генотипами СС и СТ). То есть, степень реагирования со стороны организма на внедрение инфекта была менее выраженной при генотипе rs12979860 гена *IL28B* СТ, чем при генотипе СС.

Также выявлено, что при генотипе rs12979860 гена *IL28B* СС отмечено преобладание показателей цитолитического синдрома, а при генотипе СТ преобладание мезенхимально-воспалительного синдрома. Холестатический синдром выявлен при обоих генотипах rs12979860 гена *IL28B*.

Клеточные показатели иммунитета определяли по содержанию лейкоцитов, лимфоцитов, общего пула Т-лимфоцитов (CD3), Т-хелперов/индукторов (CD4) и Т-супрессоров/цитотоксических лимфоцитов (CD8), В-лимфоцитов (CD20). Гуморальное звено иммунитета оценивали по сывороточному содержанию основных иммуноглобулинов А, М и G, ЦИК различных величин. Нами проанализированы иммунологические параметры больных в зависимости от генотипа гена *IL28B* по локусу rs12979860 (таб.1). Было выявлено, что больные с генотипом СС характеризуются более выраженной иммунореактивностью. CD8⁺ Т-лимфоциты, которые играют главную роль в элиминации вируса, что обусловлено, с одной стороны, их способностью вызывать гибель инфицированных клеток, экспрессирующих соответствующие пептиды, презентируемые молекулами МНС 1 класса, а с другой стороны – способность секретировать противовирусные факторы (провоспалительные цитокины – IFN- α , TNF- α и многие другие) [1], были достоверно ($P < 0,05$) выше в группе больных с генотипом СС, по сравнению с группой больных с не СС генотипом. Т.е. специфическая иммунная защита, осуществляемая с помощью цитотоксических Т-лимфоцитов была более вы-

Таблица 1. Иммунологические показатели больных ХВГС в зависимости от генотипа гена *ИЛ-28В* по локусу *rsl2979860*

Показатели	Контрольная группа	Генотип СС	Генотип не-СС (СТ и ТТ)
Клеточное звено иммунитета			
Лейкоциты, (в 1 мкл)	6014,1±195,3	5333,3±536,4	6687,5±867,6
Лимфоциты, %	37,7±1,2	44,0±2,5	35,3±2,5**
Лимфоциты, (в 1 мкл)	2238,1±89,1	2366,7±348,0	2460,1±503,7
CD3+, %	54,3±0,5	54,0±2,1	51,1±3,0
CD3+, мкл	1219,6±52,3	1283,3±218,3	1341,0±383,0
CD20+, %	26,3±0,5	21,7±0,7	21,5±0,6
CD20+, мкл	585,6±24,9	497,0±73,1	527,4±106,0
CD4+, %	30,7±0,3	26,3±0,9	27,5±1,7
CD4+, мкл	689,5±28,9	629,3±113,7	733,4±223,2
CD8+, %	23,7±0,4	28,3±1,2	23,6±2,0*
CD8+, мкл	533,1±24,9	654,0±108,1	607,5±163,1
CD16+, %	18,4±0,4	22,0±3,6	20,1±1,6
Активационные маркеры			
CD23+, %	23,2±1,0	24,1±1,0	19,0±1,0***
CD38+, %	23,7±0,7	30,1±2,1	24,1±3,2*
CD95+, %	22,7±0,5	22,0±1,5	23,8±2,0
Гуморальное звено иммунитета			
Ig G	1110,2±21,0	1101,3±33,2	1110,1±66,9
Ig A	154,2±4,9	179,3±10,7	169,4±8,4
Ig M	115,7±3,7	125,0±5,0	98,3±7,0**
ЦИК – 3 %	16,4±1,3	11,3±5,2	14,5±4,3
ЦИК – 4 %	31,2±2,1	22,3±10,2	27,6±4,6

Примечания: * – P<0,05; ** - P<0,01; ***- P<0,001

ражена у больных с «благоприятным» генотипом СС.

Кроме того, группе больных с генотипом СС гена *ИЛ-28В* также было отмечено достоверно более высокая экспрессия рецепторов неспецифической алергизации организма – CD23⁺ (P<0,001), и маркера ранней дифференцировки лимфоцитов – CD38⁺ (P<0,01), которые в совокупности указывают на более высокую реактогенность иммунной системы этих больных не только по сравнению с больными с неСС генотипом гена *ИЛ-28В*, но и с контрольными показателями. Кроме того у этих больных был высокий Ig M – показатель острого воспалительного процесса (P<0,01).

Выводы. Таким образом, при генотипе СС гена *ИЛ-28В* по локусу *rsl2979860*, при котором чаще выявлялся не 1 генотип вируса гепатита С, наиболее часто отмечается самоиз-

лечиваемость и высокая эффективность ПВТ. Со стороны реактогенности организма это сопровождалось более выраженным цитолитическим синдромом и высокой иммунологической реактивностью организма.

Список литературы

1. Ивашкин В.Т., Мамаев С.Н., Лукина Е.А. Особенности иммунного статуса у больных хроническим вирусным гепатитом С // Рос.журнал гастроэн., гепатол., колопроктол.– 2001.– № 3.– С. 24-29.
2. Мицура В.М., Воропаев Е.В., Осипкина О.В., Жаворонок С.В. Полиморфизм генов интерлейкина-28В и клиническое значение его выявления у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С.// Лабораторная диагностика.–2012.–№ 2.– С. 86-97.
3. Davis G.L. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients

- with chronic hepatitis C. // *Hepatology*.– 2003.– № 38.– P. 645-652.
4. Fellay D. Ge, J. et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. // *J. Nature*.– 2009.– Vol. 461.– P. 399-401.
 5. Fried M. W. et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection // *N Engl J Med*.– 2002.– Vol. 347.– P. 975-982.
 6. Ge D., Fellay J., Thompson AJ. et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009 Sep 17; 461(7262): 399-401.
 7. Grebely J. et al. Potential role for Interleukin-28B genotype in treatment decision-making in recent hepatitis C virus infection. // *Hepatology* – 2010.– Vol. 52.– P. 1216-1224.
 8. Lotrich F.E. et al. IL28B polymorphism is associated with both side effects and clearance of hepatitis C during interferon- alpha therapy.//*Journal of Interferon & Cytokine Research*.– 2011.– Vol. 31.–№ 3.– P. 331-336. Marc G.G. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C. // *Hepatology*.– 2009.– Vol. 49.– P. 1335-1374.
 9. Ray Kim.W. Global epidemiology and burden of hepatitis C. *Microbes.Infect.* 4, 1219-1225 (2002).
 10. Rauch A. Genetic Variation in IL28B Is Associated With Chronic Hepatitis C and Treatment Failure: A Genome-Wide Association Study.// *Gastroenterology*.– 2010.– Vol. 138.– P. 1338-1345.
 11. 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.– Vol. 41.– P. 1105-1109.
 12. Thompson AJ. et al. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus // *Gastroenterology*.– 2010.– Vol. 139.– P. 120-129.

THE IMPORTANCE OF GENOTYPIC AND IMMUNOPHENOTYPIC CHARACTERISTICS IN THE PATHOGENESIS AND TREATMENT OF CHRONIC HCV-INFECTION

Nabieva U. P., Ismailova A. A., Adylov D. G.

*Republican Scientific Center of Immunology of the Ministry of Health
of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan*

The article is devoted to the investigation of the correspondence of the genotype of the *IL-28B* gene to the virological, biochemical and immunological parameters of patients with chronic viral hepatitis C in the course of antiviral therapy of pegylated interferon α and ribavirin. It was found that with the genotype of the CC gene of the *IL-28B* gene at the locus rsl2979860, in which the non-genotype of the hepatitis C virus was most often detected, self-healing and high efficacy of PVT are most often observed. On the part of the organism's reactivity, this was accompanied by a more pronounced cytolytic syndrome and a high immunological reactivity of the organism, manifested in an increase in the expression of cytotoxic lymphocytes CD8⁺, activation markers CD23⁺ and CD38⁺.

Key words: chronic viral hepatitis C, interleukin-28, genetic predictors, immunity, immunoglobulins