

У.П. Набиева<sup>1</sup>, Т.А. Агзамова<sup>2</sup>, А.А. Исмаилова<sup>1</sup>, Д.Г. Адылов<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт Иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан<sup>2</sup>Ташкентский педиатрический медицинский институт**ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПРОТИВОВИРУСНУЮ АКТИВНОСТЬ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ HCV-ИНФЕКЦИИ**

Статья посвящена исследованию соответствия генотипа гена IL-28B показателям противовирусной активности больных хроническим вирусным гепатитом С в ходе получения противовирусной терапии пегилированным интерфероном  $\alpha$  и рибавирином. Было установлено, интерфероновый статус при «благоприятных» генотипах (СС или ТТ) гена IL-28B характеризовался более высоким уровнем ИФН-альфа и ИФН-гамма при сравнительно более низком уровне анти-ИФН-альфа в отличие от состояния этого статуса при «неблагоприятных» генотипах (неСС и неТТ), что вероятно и обуславливает эффективность или неэффективность проводимой противовирусной терапии.

**Ключевые слова:** хронический вирусный гепатит С, интерлейкин-28, генетические предикторы, противовирусная активность, интерфероны

**Введение.** HCV-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 HCV-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 rs1 2979860 [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 rs1 2979860 по сравнению с rs8099917 [3]. Выявлено, что частота «благоприятного» аллеля С в участке rs1 2979860 гена IL28B была самой высокой у азиатов и самой низкой у афроамериканцев. Более того, частота распространенности СС генотипа rs1 2979860 взаимосвязана со СВО в каждой популяции [5].

При высоком медико-социальном значении хронической HCV-инфекции изучение иммунопатогенеза заболевания, а также механизмов резистентности больных к терапии основными противовирусными препаратами (пегилированным интерфероном  $\alpha$  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-28В) у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С и изучение взаимосвязи значимых полиморфизмов гена IL-28В с показателями противовирусной активности организма.

**Материалы и методы:** Нами обследовано 128 больных ХВГС, в возрасте от 16 до 58 лет (средний возраст 35,6±2,8). Длительность заболевания колебалась от 1 года до 10 лет (в среднем 3,8±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-HCV-IgG).

Определение интерферонового статуса (ИФН- $\gamma$ , ИФН- $\alpha$ , антитела к ИФН- $\alpha$ ) проводили с использованием автоматического фотометра для микропланшета при длине волны 450 нм методом иммуноферментного анализа на анализаторе «Stat-Fax» (США). Наборы реагентов производства «Вектор-Бест», Новосибирск (РФ).

У больных использован метод ПЦР для определения RNA-HCV в крови. Генотипы HCV (1a, 1в, 2a, 2в, 3a) и нуклеотидный полиморфизм гена IL-28В 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 пироквенирования (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.**

Нами было изучены нуклеотидные полиморфизмы гена IL-28В 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-28В в зависимости от рассматриваемых локусов в этих группах представлено на рис. 1 и 2.

По представленным данным (рис.1) видно, что 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 группе – 36,0%), а среди больных, неответивших на ПВТ данный генотип выявлен не был. Таким образом, отмечается более «благоприятная» настроенность генотипа СС относительно исходов заболевания и эффективности терапии по сравнению с другими генотипами по локусу rs12979860.

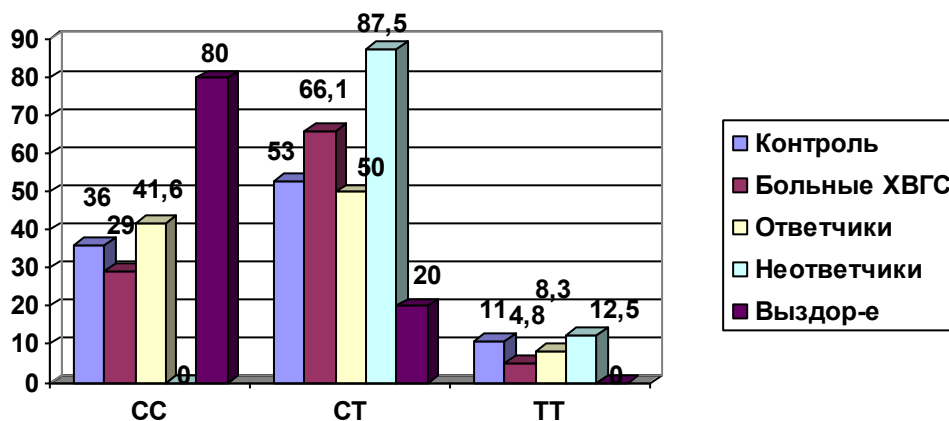


Рисунок 1 – Распределение генотипов гена ИЛ-28В по локусу rs12979860

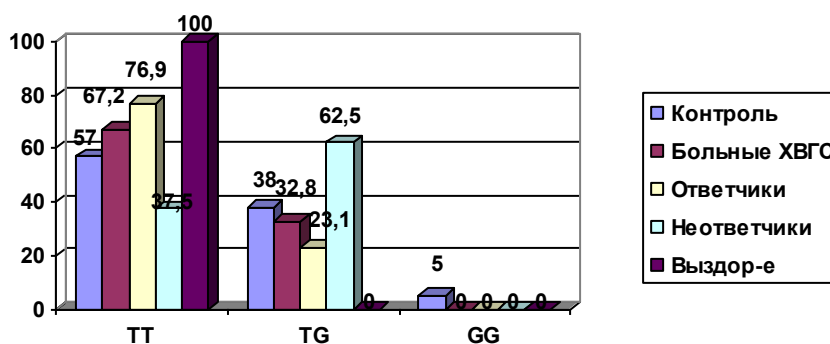


Рисунок 2 – Распределение генотипов гена ИЛ-28В по локусу rs8099917

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, не ответивших на ПВТ (в контрольной группе – 57,0%).

Учитывая, что активность патологического процесса отражает степень реагирования со стороны организма на внедрение инфекта, мы изучили противовирусную активность организма на основании показателей интерференового статуса в сравниваемых группах больных.

Далее мы изучали состояние интерференового статуса организма, имеющего важное значение в реализации противовирусного иммунитета. Нами исследованы сывороточные концентрации ИФН-альфа, Ат к ИФН-альфа и ИФН-гамма. Анализ полученных результатов основных интерферонов в сыворотке крови больных ХВГС в зависимости от генотипов гена ИЛ-28В CC и не-CC, а также TT и не-TT показал, что сывороточное содержание ИФН-альфа у больных ХВГС во всех группах было достоверно снижено. Анализ показал, что при сравнении значений ИФН-альфа между группами, нами было выявлено, что в группе больных CC генотипом уровень ИФН-альфа составил  $12,5 \pm 1,4$  пг/мл, в группе больных не-CC генотипами –  $9,2 \pm 1,8$  пг/мл, а в контрольной группе –  $16,85 \pm 3,8$  пг/мл. В обеих группах больных ХВГС уровень ИФН-альфа был снижен достоверно по сравнению с данными контрольной группы, причем, в группе больных не-CC сывороточная концентрация ИФН-альфа была наименьшей и достоверно отличалась от значений больных генотипом CC в 1,4 раза. При не-TT выявлено достоверное снижение ИФН-альфа по сравнению со значением TT в 1,43 раза. В группах больных не-CC и не-TT сывороточная концентрации ИФН-альфа были наименьшими.

По уровню антител к ИФН достоверные различия выявлены между группами больных генотипами CC и не-CC, TT и не-TT, наибольшие значения антител к ИФН-альфа выявлены в группах больных не-CC и не-TT в 1,2 и 1,4 раза соответственно.

Что касается больных ХВГС TT и не-TT генотипами, то уровни ИФН-альфа также были снижены достоверно в сравнении со значением контрольной группы, и при этом достоверно отличались между собой. Так, сывороточная концентрация ИФН-альфа в среднем в группе больных ХВГС TT генотипом гена ИЛ-28В составила  $13,9 \pm 1,4$  пг/мл, тогда как в группе больных ХВГС не-TT генотипами –  $9,82 \pm 0,7$  пг/мл, различия в 1,43 раза. Как видно, тенденция к снижению сывороточных концентраций ИФН-альфа в исследуемых группах достаточно ясно наблюдалась, причем, как в группе больных ХВГС CC и не-CC, так и в группах больных TT и не-TT. Как было сказано выше, в группах больных не-CC и не-TT сывороточная концентрации ИФН-альфа были наименьшими. К сожалению, мы не нашли таких данных в литературе, но имеются данные о том, что в группах больных гомозиготными аллелями наблюдается более благоприятная картина в изучении гематологических и иммунологических параметров.

Далее мы рассмотрели уровни антител к ИФН-альфа. Анализ показал, что в группе больных генотипами CC и не-CC было выявлено, что наибольшее значение антител к ИФН-альфа наблюдалось в в группе больных не-CC генотипами гена ИЛ-28В, тогда как анализ антител к ИФН-альфа при изучении в группах больных TT и не-TT показал наибольшее значение наблюдалось в группе больных не-TT. Так, в группах больных CC и не-CC значения были таковы:  $3,8 \pm 0,2$  пг/мл и  $4,4 \pm 0,9$  пг/мл соответственно, при норме  $3,4 \pm 0,7$  пг/мл. в группах больных TT и не-TT:  $2,8 \pm 0,8$  пг/мл и  $3,9 \pm 1,3$  пг/мл, соответственно при контрольном значении  $3,4 \pm 0,7$  пг/мл. Достоверные различия были выявлены между группами больных генотипами TT и не-TT, следовательно, анализ показал, что наибольшие значения антител к ИФН-альфа были выявлены в группе больных не-CC и не-TT.

Анализ ИФН-гамма в группах больных ХВГС в зависимости от различных генотипов гена ИЛ-28В позволил выявить, что в группах больных CC и TT уровень сывороточного ИФН-гамма был повышен по сравнению со значением контрольной группы и со значениями групп больных не-CC и не-TT. Нами выявлено, что в группе больных генотипами CC и не-CC значения ИФН-гамма были

следующими:  $14,2 \pm 0,9$  пг/мл и  $8,82 \pm 1,4$  пг/мл, соответственно. А в группах больных ТТ и не-ТТ:  $10,6 \pm 1,1$  пг/мл и  $9,2 \pm 1,2$  пг/мл, соответственно при норме  $8,4 \pm 0,6$  пг/мл.

Следовательно, анализ ИФН-гамма в группах больных ХВГС в зависимости от различных генотипов гена ИЛ-28В выявил, что в группах больных СС и ТТ уровень сывороточного ИФН-гамма был повышен по сравнению со значением контрольной группы и со значениями групп больных не-СС и не-ТТ. Выявлено, что в группе больных генотипами СС и не-СС разница в 1,6 раз, а в группах больных ТТ и не-ТТ в 1,3 раза.

**Выводы:** Таким образом, при генотипе СС гена ИЛ-28В по локусу rs12979860, при котором чаще выявлялся не1 генотип вируса гепатита С, наиболее часто отмечается самоизлечиваемость и высокая эффективность ПВТ. Со стороны противовирусной активности организма это сопровождалось тем, что интерфероновый статус при «благоприятных» генотипах (СС или ТТ) гена ИЛ-28В характеризовался более высоким уровнем ИФН-альфа и ИФН-гамма при сравнительно более низком уровне анти-ИФН-альфа в отличие от состояния этого статуса при «неблагоприятных» генотипах (неСС и не ТТ), что вероятно и обуславливает эффективность или неэффективность проводимой противовирусной терапии.

#### 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 Мицур 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. - №461(7262). - P. 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.
- 9 Marc G.G. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C // Hepatology. - 2009. - Vol. 49. - P. 1335-1374.
- 10 Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, Schurmann P, Bartosch B, Cosset FL, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C // Proc Natl Acad Sci USA. - 2007. - №104. - P. 6025-6030.
- 11 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.
- 12 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.
- 13 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.

У.П. Набиева<sup>1</sup>, Т.А. Агзамова<sup>2</sup>, А.А. Исмаилова<sup>1</sup>, Д.Г. Адылов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ўзбекистан Республикасының ғылым Академиясының адам иммунологиясы мен геномика Институты

<sup>2</sup>Ташкент педиатриялық медицина институты

#### СОЗЫЛМАЛЫ НСВ-ЖҰҚПАСЫ КЕЗІНДЕ ИММУНДЫ ЖҮЙЕСІНІҢ ВИРУСҚА ҚАРСЫ БЕЛСЕНДІЛІГІНЕ ТЕКТІК ФАКТОРЛАРДЫҢ ӘСЕРІ

**Түйін:** Мақалада ИЛ-28В тегінің генотипінің созылмалы вирусты гепатитіне шалдыққан науқастырда пегилденген интерферон  $\alpha$  мен рибавиринмен вирүсқа қарсы ем барысында анықталған вирүсқа қарсы белсенділіктің көрсеткіштеріне сәйкестігін зерттеу нәтижелері баяндалады. Интерферонды статус ИЛ-28В тегінің «қолайлы» генотиптер (СС немесе ТТ) кезінде ИФН-альфа мен ИФН-гамма деңгейлерінің жоғарылығын, ал анти-ИФН-альфа деңгейінің төмендігі зерттеу нәтижесінде «қолайсыз» генотиптермен (ССемес және ТТемес) салыстыру барысында анықталды. Бұл жағдай өткізіліп жатқан вирүсқа қарсы терапияның тиімді не тиімді емес болуын негіздейтін сынды.

**Түйінді сөздер:** созылмалы вирусты гепатит С, генетикалық предикторлар, интерлейкин-28, вирүсқа қарсы белсенділік, интерферондар

U.P. Nabieva<sup>1</sup>, T.A. Agzamova<sup>2</sup>, A.A. Ismailova<sup>1</sup>, D.G. Adylov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Human Genomics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

<sup>2</sup>Tashkent Pediatric Medical Institute

#### EFFECT OF GENETIC FACTORS ON THE ANTIVIRAL ACTIVITY OF THE IMMUNE SYSTEM IN CHRONIC HCV INFECTION

**Resume:** The article is devoted to the study of the compliance of the genotype of the IL-28B gene with the antiviral activity of patients with chronic viral hepatitis C in the course of receiving antiviral therapy with pegylated interferon  $\alpha$  and ribavirin. It was found that interferon status with "favorable" genotypes (CC or TT) of the IL-28B gene was characterized by a higher level of IFN-alpha and IFN-gamma at a relatively lower level of anti-IFN-alpha, unlike the state of this status with "unfavorable" genotypes (nonCC and non-TT), which probably determines the effectiveness or ineffectiveness of antiviral therapy

**Keywords:** chronic viral hepatitis C, interleukin-28, genetic predictors, antiviral activity, interferons