

СОСТОЯНИЕ ИММУННОГО СТАТУСА И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ IFN КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Е.С. Ковалева, Б.Ю. Гумилевский

ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Волгоград

Резюме. Целью работы была оценка роли иммунного статуса и полиморфизмов генов системы интерферона в прогнозе эффективности противовирусной терапии хронического гепатита С у ВИЧ-инфицированных пациентов. В исследовании принимало участие 80 ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусным гепатитом С, проходивших комплексное лечение пегилированным интерфероном- α и рибавирином. Для исследования иммунного статуса использовался метод проточной цитофлюориметрии. Для определения полиморфизмов генов системы интерферона применялся метод полимеразной цепной реакции. В результате исследования были выявлены достоверные отличия в состоянии иммунного статуса и сочетании аллельных вариантов генов, ответственных за формирование адекватного иммунного и противовирусного ответов, в группах пациентов с различной эффективностью лечения гепатита С. На основании полученных результатов были сделаны выводы, что эффективность терапии гепатита С у ВИЧ-инфицированных пациентов прямопропорционально связана с активацией Т-клеточного звена иммунитета, а полиморфизмы генов системы интерферона, наряду с другими прогностическими факторами, дают возможность более четко определить прогноз течения инфекции и эффективность терапии.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, вирусный гепатит С, противовирусная терапия, цитокины, иммуногенетические критерии.

THE IMMUNE STATUS AND IFN GENE POLYMORPHISM AS PROGNOSTIC CRITERIA FOR THE EFFECTIVENESS OF HEPATITIS C TREATMENT IN HIV-INFECTED PATIENTS

Kovaleva E.S., Gumilevsky B.Yu.

Abstract. The aim of the study was to evaluate the role of immune status and IFN gene polymorphism in the prediction of the efficacy of chronic hepatitis C antiviral therapy in HIV-infected patients. Eighty HIV-infected patients with hepatitis C were recruited. Antiviral therapy included pegylated interferon- α and ribavirin. Flow cytometry was used to test the immune status; polymerase chain reaction method was used for the IFN gene polymorphisms determination. It was found the significant differences in the immune status and allelic variants combinations of the genes responsible for the formation of an adequate immune and antiviral responses in groups of patients with different response to treatment of hepatitis C. Herewith the effectiveness of hepatitis C treatment in HIV-infected patients is associated with the activation of T-cell immunity. Polymorphisms of interferon gene with other prognostic factors, make it possible to better define the disease prognosis and the treatment efficacy. (*Infekc. immun.*, 2013, vol. 3, N 1, p. 83–88)

Key words: HIV-infection, viral hepatitis C, antiviral therapy, cytokines, immunogenetic criteria.

поступила в редакцию 11.03.2013
принята к печати 20.03.2013

© Ковалева Е.С.,
Гумилевский Б.Ю., 2013

Адрес для переписки:

Ковалева Екатерина Сергеевна,
ассистент кафедры клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ВПО ВолГМУ

400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.
Тел.: (8442) 38-50-05;
+7 903 316-04-71 (моб.).
E-mail: katerina.cld@gmail.com

Введение

Одной из важнейших медико-социальных проблем бесспорно является ВИЧ-инфекция. Вирусный гепатит С (ВГС) также является одной из актуальных проблем мировой медицины в связи с широкой распространенностью, выраженностью неблагоприятных исходов. Сходные пути передачи обуславливают увеличение частоты микст-форм [2, 3]. В настоящее время противовирусную терапию гепатита С получает лишь небольшое число ВИЧ-инфицированных больных. Оптимальным подходом к лечению гепатита С является комбинация IFN α с рибавирином (Рибавирин, Шеринг-Плау, США). Эффективность такой комбинации по частоте достижения стабильной вирусологической ремиссии оценивается в 54% [4]. Оценку эффективности комбинированной противовирусной терапии ХГС у ВИЧ-инфицированных пациентов рекомендуется осуществлять по совокупности вирусологических маркеров репликации ВГС (исчезновение из сыворотки крови РНК ВГС) и лабораторно-морфологических параметров, которые отражают выраженность патологических процессов в печени (нормализация активности аминотрансфераз и уменьшение степени фиброза) [5]. Однако, несмотря на наличие опубликованных данных об успешном лечении хронического вирусного гепатита у ВИЧ-инфицированных пациентов, четких рекомендаций относительно тактики ведения этой категории больных не разработано.

Как известно, при острой инфекции клиренс вируса ассоциируется с энергичным мультиспецифическим Т-клеточным ответом. При сопутствующей ВИЧ-инфекции снижено количество CD4⁺ Т-лимфоцитов и ответ Т-клеток подавлен, а ВГС-специфические CD8⁺ Т-клетки имеют определенные дефекты — снижение пролиферации и продукции [8]. Интерфероны индуцируют синтез ряда белков, имеющих непосредственную противовирусную и иммуномодулирующую активность. Цитокины — ключевые медиаторы воспалительного процесса и формирования специфического иммунитета, ответственного за естественную элиминацию ВГС [1].

При ВГС-инфекции очень часто противовирусные эффекты интерферона оказываются неэффективными, вероятно, потому, что в генах IFN γ , как и в генах индуцируемых им белков, часто выявляются точечные мутации, которые могут влиять на уровень их противовирусной активности [6]. Например, индуцируемые интерфероном МхА белки обеспечивают устойчивость к некоторым РНК-содержащим

вирусам. В некоторых исследованиях была найдена зависимость между положительным результатом лечения IFN α и высоким уровнем экспрессии МхА протеина у хронически ВГС-инфицированных пациентов. Предполагается, что этот белок нарушает транспорт вирусного генома в нужный компартмент клетки. Также высокий уровень белка гена OAS (200 пкмоль/дл) в острой фазе гепатита С ассоциировался с эффективностью терапии [7].

На основании выше сказанного, можно предположить, что варибельность в прогнозе лечения может быть связана с иммунологическими и генетическими факторами, обеспечивающими протективный эффект в отношении ВГС-инфекции. Это вызывает научный интерес и делает актуальным поиск иммуногенетических критериев эффективности лечения гепатита С у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Цель исследования — оценить роль генетических полиморфизмов в системе интерферона и иммунного статуса в прогнозе эффективности противовирусной терапии хронического гепатита С у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Задачи исследования:

1. определить эффективность противовирусной терапии на основании вирусологического критерия (отсутствие детекции РНК ВГС в плазме через 24, 48 недель лечения);
2. исследовать иммунный статус и оценить степень активации Т-лимфоцитов по определению уровня экспрессии CD25 и CD69 в процессе лечения гепатита С;
3. оценить сопряженность аллельных вариантов мутаций генов AZIN1 (A/G), IFN γ (-764C/G), МхА (-88G/T) TLR4(C/T) с эффективностью лечения гепатита С;
4. выявить взаимосвязь между показателями иммунного статуса и генетических полиморфизмов у ВИЧ-инфицированных пациентов с эффективностью лечения гепатита С.

Материалы и методы

Работа проводилась на базе кафедры клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава РФ — ГКУЗ «ВО Центр по профилактике и борьбе со СПИДом и ИЗ». В исследовании принимало участие 80 ВИЧ-инфицированных пациентов с ВГС, проходивших комплексное лечение пегилированным IFN α и рибавирином. Эффективность лечения оценивалась через 48 недель от начала терапии согласно вирусологическому критерию. Материалом для исследования служила кровь, собранная из вены утром натощак в про-

бирки с $1/10$ объема 3% ЭДТА. Для определения генетических полиморфизмов использовались тест-системы «Литех» (Москва).

Исследование иммунного статуса проводилось на проточном цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител к поверхностным рецепторам лимфоцитов (CD), меченных FITC, PE, APC, PerCP (Caltag laboratories, Канада).

Статистическая обработка результатов проводилась на персональном компьютере с использованием программ Microsoft Excel 2007, Statsoft Statistica 8.0.

Количественные данные, подчиняющиеся закону нормального распределения, описывались с помощью средней арифметической величины и среднего квадратичного отклонения ($M \pm s$), качественные величины выражались частотой встречаемости (%). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. При сравнении групп для выборок использовались U -критерий Манна–Уитни (двусторонний критерий) и W -критерий Вилкоксона. Оценка относительного риска и доверительных интервалов рассчитывались по Вульффу в программе Statsoft Statistica 8.0.

Результаты

На основании вирусологического критерия пациенты были разделены на две группы: с эффективным лечением вирусного гепатита С и с отсутствием эффекта от терапии. Эффективным оказалось лечение у 57,5% от общего числа обследованных. Для выяснения состояния иммунной системы у ВИЧ-инфицированных, больных гепатитом С, исследовался иммунный статус и степень активации Т-лимфоцитов. Иммунный статус оценивался до начала, в период и после лечения. При анализе лейкоцитарного состава периферической крови в начале терапии у пациентов с эффек-

тивным и неэффективным лечением не было найдено существенных различий ($p > 0,05$).

При исследовании субпопуляционного состава циркулирующих лимфоцитов было обнаружено значимое ($p < 0,05$) снижение уровня $CD4^+$, $CD8^+$ и $CD3^+69^+$ лимфоцитов при одновременном увеличении уровня $CD3^+25^+$ в группе пациентов с эффективным лечением. В группе пациентов с отсутствием эффекта на протяжении лечения уровни $CD4^+$, $CD8^+$ и $CD3^+25^+$ существенно не изменялись при значимом ($p < 0,05$) увеличении уровня $CD3^+69^+$. Также у пациентов с эффективным лечением количество $CD3^+25^+$ и $CD3^+69^+$ лимфоцитов было достоверно ниже, а количество $CD4^+$ достоверно выше до начала лечения по сравнению с группой без эффекта лечения. Кроме того, в период терапии у пациентов с эффективным лечением значимо снижался уровень циркулирующих $CD8^+$ и $CD3^+69^+$ лимфоцитов, а уровень $CD3^+25^+$ значимо увеличивался в сравнении с пациентами без эффективности терапии (табл. 1).

Для решения поставленной задачи о связи полиморфизмов генов $IFN\gamma$ с эффективностью лечения гепатита С у ВИЧ-инфицированных пациентов нами были выбраны 4 гена на основании их роли в формировании противовирусного и иммунного ответа при ВГС: $AZIN1$ (A/G), $IFN\gamma$ (-764C/G), MxA (-88G/T), $TLR4$ (C/T).

Проведенный анализ ассоциации полиморфизма генов системы интерферона $AZIN1$, MxA и $TLR4$ с эффективностью терапии ВГС-инфекции показал, что некоторые полиморфизмы могут служить ДНК-маркерами предрасположенности к хроническому течению ВГС. Мутантный гетерозиготный вариант A/G ($RR = 2,7$, ДИ [1,69;3,83]) гена $AZIN1$ реже выявляется у лиц с эффективным лечением. Аллельный вариант GG гена $AZIN1$ наоборот встречался чаще (80,5%) у группы пациентов с доказанной эффективностью. Однако раз-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ С ЭФФЕКТИВНЫМ И НЕЭФФЕКТИВНЫМ ЛЕЧЕНИЕМ ДО НАЧАЛА И В ПЕРИОД ЛЕЧЕНИЯ ГЕПАТИТА С

	Показатели при эффективном лечении ($M \pm s$)		Показатели при неэффективном лечении ($M \pm s$)	
	До начала лечения	В период лечения	До начала лечения	В период лечения
$CD4^+$, кл/мл	585±170*	449±185 #	483±225	482±216
$CD8^+$, кл/мл	896±301	546±335*#	961±398	976±453*
$CD3^+69^+$, кл/мл	42±12*	34±9*#	55±10*	66±13*#
$CD3^+25^+$, кл/мл	10±2	19±4*#	14±2	16±4

Примечания. # — значимые отличия ($p < 0,05$) внутри исследуемых групп; * — значимые отличия ($p < 0,05$) при сравнении эффективного и неэффективного лечения.

ТАБЛИЦА 2. АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IFN НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПИИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

Ген	Аллельные варианты	Частота встречаемости, [% (чел.)]		p	χ^2	RR
		Отсутствие эффекта	Эффективное лечение			
AZIN1	AG*	41,2 (14)	15,2 (7)	p < 0,05	5,53	2,7
	AA	0 (0)	4,3 (2)	p > 0,05	0,25	0,0005
	GG	58,8 (20)	80,5 (37)	p > 0,05	3,46	0,73
IFN γ	GG*	82,4 (28)	43,5 (20)	p < 0,05	10,74	1,89
	CC*	17,6 (6)	56,5 (26)	p < 0,05	10,74	0,31
MxA	GG	70,6 (24)	82,6 (38)	p > 0,05	1,00	0,85
	GT	26,5 (9)	17,4 (8)	p > 0,05	0,007	0,84
	TT	2,9 (1)	0 (0)	p > 0,05	0,02	
TLR4	CC	61,8 (21)	78,3 (36)	p > 0,05	1,85	0,79
	CT	11,8 (4)	19,6 (9)	p > 0,05	0,39	0,60
	TT*	26,4 (9)	2,1 (1)	p < 0,05	8,44	12,2

Примечания. * — достоверные отличия по частоте встречаемости аллельных вариантов в группах исследования; χ^2 — критерий сравнения частоты встречаемости гена у больных с эффективным и неэффективным лечением; p — достоверность различий показателей между сравниваемыми группами; RR — относительный риск.

личия между группами находились на границе статистической достоверности (p = 0,06). Аллельные варианты гена IFN γ также оказались связаны с эффективностью лечения гепатита С. Так, присутствие GG варианта гена IFN γ (RR = 1,89, ДИ [1,28;3,52]), обнаружено у 82,4% пациентов с неэффективным лечением. Среди пациентов с отсутствием эффекта TT гомозиготный аллельный вариант гена TLR4 (RR = 2,25, ДИ [1,74;23,20]) встречается также с более высокой частотой (табл. 2).

Обсуждение

В результате исследования субпопуляционного состава циркулирующих лимфоцитов у пациентов с эффективным и неэффективным лечением гепатита С было обнаружено, что у пациентов с эффективным лечением достоверно снижается уровень (p < 0,05) циркулирующих CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов по отношению к группе пациентов с неэффективным лечением, у которых уровни CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов существенно не изменялись, а уровень CD69⁺ лимфоцитов значимо увеличивался. Также у пациентов с эффективным лечением достоверно увеличивается уровень (p < 0,05) CD3⁺CD25⁺ лимфоцитов. По-видимому, в процессе лечения происходит перераспределение вирусоспецифических Т-лимфоцитов. В норме печень не содержит конституциональную лимфоидную ткань, поэтому при гепатите С наблюдается компартментизация внутрипеченочных Т-лимфоцитов. В биопта-

тах от пациентов с ХГС всегда обнаруживается большой разброс в процентном содержании активированных Т-клеток и антигенспецифических Т-клеток (40–80% внутрипеченочных Т-клеток имеют маркеры активации). Показано существование внутрипеченочных Т-лимфоцитов, специфичных к core-белку, к NS5, к NS4, а при анализе печеночных биоптатов обнаруживали преобладание лимфоцитов CD8⁺CD45RO⁺ (популяция памяти). В центре лимфоидного фолликула были найдены CD20⁺ В-клетки и в незначительном содержании CD4⁺ Т-клетки, которые имели маркер СВ45RA⁺ (простая популяция). На основании полученных результатов и данных литературы можно сделать вывод, что при эффективном лечении в результате миграции лимфоцитов из циркулирующей крови в печеночную ткань активация Т-клеток при ХГС осуществляется непосредственно в печени.

Более успешные результаты ПВТ наблюдались у больных с генотипом CC гена IFN γ . Мутантный гетерозиготный вариант A/G гена AZIN1, G/G гена IFN γ , T/T гомозиготный аллельный вариант гена TLR4 реже выявляются у лиц с эффективным лечением. Гены цитокинов — важные участники иммунопатогенеза вирусных гепатитов, так как нарушение баланса продукции цитокинов Th1/Th2-клетками играет важную роль в иммунопатогенезе ВГС-инфекции [5]. Протеин MxA оказывает противовирусное действие на РНК-содержащие вирусы — ортомиксовирусы и парамиксовирусы, его эффекта достаточно для подавления вирусной

репликации даже при отсутствии других противовирусных IFN-индуцибельных протеинов [9]. Цитоплазматически расположенный протеин МхА, опосредованно снижая активность импортина- α , ингибирует транспорт вирусов в ядро клетки [8], а ядерно расположенный протеин МхА репрессирует транскрипцию вирусного генома и подавляет ядерный экспорт вирусной РНК [12]. В нашем исследовании не было найдено статистически значимых различий по частоте встречаемости аллельных вариантов гена МхА. Ген AZIN1 кодирует белок, связывающийся с орнитиндекарбоксилазой и стабилизирующий ее работу за счет защиты от воздействия антимитотических ферментов, способствующих ее деградации [11]. Роль AZIN1 в развитии цирроза печени (ЦП) у больных хроническим гепатитом С показало полногеномное сканирование, проведенное группой американских ученых в 2006 г. [10]. По его результатам было найдено, что наличие генотипа GG увеличивает шансы развития ЦП у больных хроническим гепатитом С в 3,23 раза. В нашей работе различия между группами были обнаружены по частоте встречаемости аллеля A/G гена AZIN1, и его наличие связано с риском неэффективности терапии, а различия по генотипу GG находились на грани статистической достоверности.

Продукт гена TLR4 является членом семейства Toll-подобных рецепторов, играющих ключевую роль в распознавании патогенов и активации врожденного иммунитета в организме. Полиморфизмы этого гена ассоциированы с различиями в интенсивности иммунного ответа. В работе 2007 г. американские исследователи показали связь полиморфизма TT с риском развития ЦП у больных хроническим гепатитом С. Полученные нами данные также связывают неэффективность терапии гепатита С с данным полиморфизмом.

Выводы

1. Эффективность противовирусной терапии ВГС у ВИЧ-инфицированных пациентов на основании вирусологического критерия составляет 57,5%.
2. Эффективность терапии ВГС у ВИЧ-инфицированных пациентов пропорционально связана с активацией Т-клеточного звена иммунитета и сопровождается увеличением уровня циркулирующих активированных CD25⁺ Т-лимфоцитов.
3. Полиморфные варианты генов AZIN1 (A/G), IFN γ (G/G), TLR4(T/T) являются нежелательными факторами для эффективности стандартной терапии ВГС.

4. На основании установленной связи состояния иммунного статуса и сопряженности полиморфизмов иммунорегуляторных генов с достижением устойчивого вирусологического ответа можно получить надежную оценку прогноза эффективности лечения.

Список литературы

1. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Роль полиморфизма генов цитокинов при вирусном гепатите С // *Инфекция и иммунитет*. — 2012. — Т. 2, № 4. — С. 687–698.
2. Блохина Н.П. Пегинтерферон альфа-2а и его эффективность при лечении больных с хроническим гепатитом С // *Мир вирусных гепатитов*. — 2000. — № 2. — С. 1–2.
3. Бычков В.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Семенова Н.А., Клепцова Л.А., Якушина В.Д. Ассоциация полиморфизмов генов системы интерферона OAS1, OAS3, PKR и хронического вирусного гепатита С // *Медицинская иммунология*. — 2011. — Т. 13, № 1. — С. 93–100.
4. Николаева Л.И., Самохвалов Е.И., Альховский С.В., Колотвин А.В., Самоходская Л.М., Макашова В.В., Токмалаев А.К. Генетический полиморфизм и эффективность противовирусной терапии при хроническом вирусном гепатите С // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. — 2012. — Вып. № 2. — С. 81–88.
5. Сенников С.В., Курамшин Д.Х., Толоконская Н.П., Козлов В.А. Экспрессия генов и продукция основных иммунорегуляторных цитокинов при вирусном гепатите С // *Цитокины и воспаление*. — 2003. — № 4. — С. 10–13.
6. Alberti A., Clumeck N., Collins S., Gerlich W., Lundgren J., Palù G., Reiss P., Thiebaut R., Weiland O., Yazdanpanah Y., Zeuzem S.; ECC Jury. Short statement of the first European consensus conference on the treatment of chronic hepatitis B and C in HIV co-infected patients // *J. Hepatol.* — 2006. — Vol. 42(5). — P. 615–624.
7. Asselah T., Estrabaud E., Bieche I., Lapalus M., De Muynck S., Vidaud M., Saadoun D., Soumelis V., Marcellin P. Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin // *Liver Int.* — 2010. — Vol. 30. — P. 1259–1269.
8. Bidwell J., Keen L., Gallagher G., Kimberly R., Hui-zinga T., McDermott M.F., Oksenberg J., McNicholl J., Pociot F., Hardt C., D'Alfonso S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases // *Genes Immun.* — 1999. — Vol. 1, N 1. — P. 3–19.
9. Chung R.T., Andersen J., Volberding P., Robbins G.K., Liu T., Sherman K.E., Peters M.G., Koziel M.J., Bhan A.K., Alston B., Colquhoun D., Nevin T., Harb G., van der Horst C.; AIDS Clinical Trials Group A5071 Study Team. Peginterferon

- Alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 351. — P. 451–459.
10. Huang H., Shiffman M.L., Cheung R.C., Layden T.J., Friedman S., Abar O.T., Yee L., Chokkalingam A.P., Schrodi S.J., Chan J., Catanese J.J., Leong D.U., Ross D., Hu X., Monto A., McAllister L.B., Broder S., White T., Sninsky J.J., Wright T.L. Identification of two gene variants associated with risk of advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C // *Gastroenterology.* — 2006. — Vol. 130. — P. 1679–1687.
11. Laguno M., Murillas J., Blanco J.L., Martínez E., Miquel R., Sánchez-Tapias J.M., Bargallo X., García-Criado A., de Lazzari E., Larrousse M., León A., Loncá M., Milinkovic A., Gatell J.M., Mallolas J. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of HIV/HCV coinfecting patients // *AIDS.* — 2004. — Vol. 18. — P. 27–36.
12. Thio C.L., Nolt K.R., Astemborski J., Vlahov D., Nelson K.E., Thomas D.L. Screening for hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-infected individuals // *J. Clin. Microbiol.* — 2000. — Vol. 38, N 2. — P. 575–577.