

Лабораторная диагностика

Добавляет
ценность диагноза



СИНЭВО
медицинская лаборатория

ЭКСПЕРТ В ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКЕ

Д.Є. Телегін, к.м.н., Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, В.М. Козько, О.Є. Бондарь, Харківський національний медичний університет, Г.М. Дубінська, Є.Н. Минак, Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава, М. Мунтеану, гепатогастроентерологічне відділення клініки Pitie-Salpetriere, м. Париж (Франція)

Интерферон-опосередкована регресія фіброзу в ході противірусної терапії хронічного гепатиту С при різних варіантах поліморфізму гена IL28B



Д.Є. Телегін

Поява нових класів препаратів прямої противірусної дії суттєво збільшує шанси на досягнення успіху в терапії хронічного гепатиту С (ХГС). Загальноновизнаним критерієм повного вилікування ХГС є стійка вірусологічна відповідь (SVR), що визначається як авіремія протягом 24 тижнів після завершення курсу противірусної терапії (ПВТ). Однак не менш важливим показником одужання, що корелює з 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 покращення, а деколи навпаки – набуває ознак циротичної трансформації і гепатоцелюлярної неоплазії [1]. Тому вивченню закономірностей фіброгенезу при ХГС сьогодні присвячується багато досліджень [2, 3]. Зокрема, виявлено пряму кореляцію між Т-алелем гена IL28B та швидкістю прогресування ХГС до цирозу печінки й гепатоцелюлярної карциноми [4]. Однак залишаються нез'ясованими закономірності інтерферон-опосередкованої регресії фіброзу та його прогресування після завершення ПВТ. Метою нашої роботи стало дослідження 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 нами було ретроспективно проаналізовано результати лікування 324 хворих, які отримували стандартну ПВТ з приводу ХГС 1b генотипу у Львівській, Полтавській, Харківській обласних інфекційних клінічних лікарнях (167 осіб) та в гепатологічному відділенні лікарні Pitie-Salpetriere Hospital, м. Париж (157 осіб). Стандартом терапії 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 курсу лікування 12 міс. Із дослідження виключалися пацієнти, що були коінфіковані HBV чи мали іншу патологію печінки (алкогольну хворобу печінки, неалкогольний стеатогепатит, аутоімунний гепатит, гемахроматоз), а також пацієнти, яким проводили монотерапію PegIFN, лікування комбінацією лінійних IFN та рибавіріну, і ті, що переліковувалися повторно. У групах порівняння оцінювали три варіанти вірусологічної відповіді: швидку (RVR, 4-й тиждень ПВТ), ранню (EVR, 12-й тиждень ПВТ) і стійку (SVR, 24-й тиждень після завершення ПВТ). Вікову, гендерну та клінічну характеристику хворих наведено в таблиці 1.

Вірусне навантаження гепатиту С визначали при використанні проби кількісного аналізу Abbott

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 МО/мл)	75
Вихідна стадія фіброзу (METAVIR)	F1-F2	23,7
	F3-F4	37,4

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

M2000sp/rt HCV у реальному часі (Abbott, Ранжі, Франція). Генотипи вірусу гепатиту С встановлювали в ході часткового секвенування гена NS5B та порівняння отриманої послідовності нуклеотидів з еталонним штамом шляхом філогенетичного аналізу.

Стадію фіброзу оцінювали за шкалою METAVIR за допомогою методу ФіброТест, що обраховували за значеннями віку, статі та п'яти біохімічних показників: альфа-2-макроглобуліну, гаптоглобіну, гамма-глутамілтранспептидази (GGT), загального білірубину та аполіпопротеїну А1 [5, 6]. Співвідношення шкал FibroTest та METAVIR з описом відповідних гістологічних змін наведено в таблиці 2.

Рівень аполіпопротеїну А1, альфа-2-макроглобуліну та гаптоглобіну визначали методом турбідиметрії (з використанням систем Modular та Cobas Integra від Roche Diagnostics, Мангейм, Німеччина) та нефелометрії (BNII від Dade-Behring-Siemens Healthcare Diagnostics, Дірфілд, Іллінойс, США), а також при застосуванні реагентів виробника (Roche Diagnostics, Мангейм, Німеччина та Siemens Healthcare Diagnostics, Дірфілд, Іллінойс, США) і реагентів Diagam (Гіленг'ен, Бельгія) для турбідиметричного аналізу на альфа-2-макроглобулін. Коефіцієнт варіації всіх тестів становив <3%. Рівень GGT, аланінамінотрансферази (АЛТ), аспатамінотрансферази (АСТ), загального білірубину, загального холестерину, тригліцеридів та глюкози натше визначали, використовуючи аналізатори Hitachi 917, Modular та Cobas Integra (Roche Diagnostics, Мангейм, Німеччина). АктіТест урахував вищепераховані маркери й АЛТ. У 65 хворих стадію фіброзу було оцінено у кратних обстеженнях: до та після курсу ПВТ.

У всіх 324 пацієнтів визначали варіант поліморфізму гена IL28B за встановленим однонуклеотидним поліморфізмом рестрикційного фрагмента rs12979860 19-ї хромосоми, вивчаючи вільно циркулюючу ДНК сироватки крові після екстракції автоматизованою системою NucliSENS[®]easyMag[®]. Генотип IL28B встановлювали шляхом аналізу кривої плавлення гібридаційних зондів з використанням інструмента LightCycler[®]480 (Roche Diagnostics, Мелан, Франція). Генотипи IL28B було визначено як CC, CT або TT. Генотипування поліморфної ділянки проводили з використанням системи ABI TaqMan allelic discrimination kit та the ABI7900HT Sequence Detection System (виробництва Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

У статистичному аналізі застосовували: точний критерій Фішера, критерій хі-квадрат, критерій Стюдента, критерій Манна-Уїтні та складну логістичну регресію для багатоваріаційного аналізу. Для всіх аналізів використовували двосторонні статистичні випробування; р-значення, що становило $\geq 0,05$, вважалося значимим. Для оцінки всіх достовірностей застосовували програмне забезпечення Number Cruncher Statistical Systems 2003 (NCSS, Кайсвіль, Юта, США).

Результати та обговорення

Усі варіанти виявлених нами змін стадій фіброзу на момент завершення ПВТ порівняно з вихідними значеннями можна розподілити на такі групи:

Продовження на стор. 56.



лабораторная диагностика

Д.С. Телегін, к.м.н., Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, В.М. Козько, О.Є. Бондарь, Харківський національний медичний університет, Г.М. Дубінська, Є.Н. Минак, Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава, М. Мунтеану, гепатогастроентерологічне відділення клініки Pitie-Salpetriere, м. Париж (Франція)

Інтерферон-опосередкована регресія фіброзу в ході противірусної терапії хронічного гепатиту С при різних варіантах поліморфізму гена IL28B

Продовження. Початок на стор. 55.

перша – суттєве зниження фіброзу (понад 0,35 пункту за шкалою FibroTest або на два ступені за шкалою METAVIR; табл. 2) констатовано у 25% пролікованих пацієнтів, друга – помірне зниження фіброзу (в середньому на 0,17 пункту за шкалою FibroTest або на один ступінь за шкалою METAVIR) зареєстровано у 64% хворих, третя – незмінний ступінь фіброзу встановлено у 7,6% пацієнтів, зростання фіброзу (в середньому на 0,24 пункту за шкалою FibroTest або до 1 ступеня за шкалою METAVIR) – у 3,4% (рис. 1).

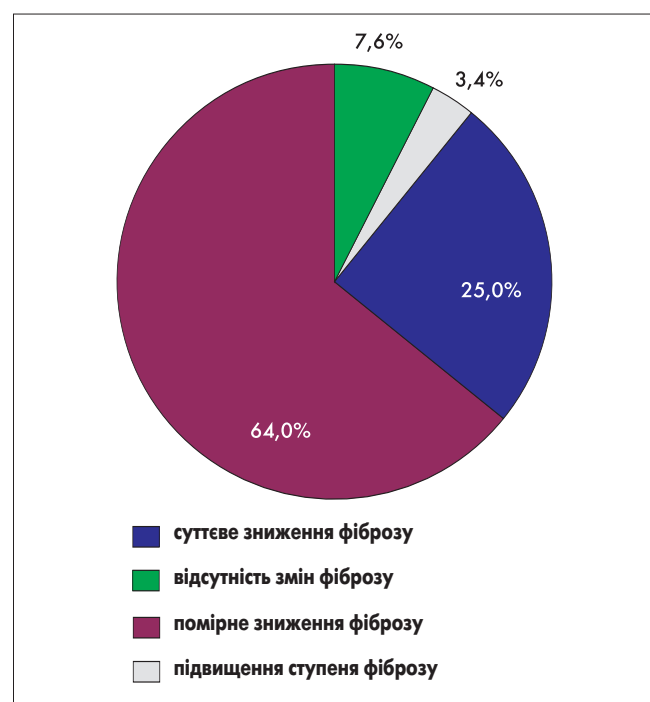


Рис. 1. Варіанти змін стадії фіброзу в ході ПВТ ХГС

Під час порівняльного аналізу таких традиційно визначальних предикторів SVR, як вірусне навантаження, генотип HCV, ступінь фіброзу, вік і стать, було виявлено, 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 значної кількості осіб негроїдної раси серед пацієнтів

Основні ознаки	Україна	Франція	p
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 МО/мл	82 (49%)	82 (52%)	0,68
«Сприятливі до лікування» генотипи G2/G3	30 (18%)	36 (23%)	0,36

клініки Pitie-Salpetriere (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 в частоті варіантів поліморфізму IL28B серед хворих українських і французьких клінічних центрів були статистично недостовірними (табл. 4).

Варіанти поліморфізму гена IL28B	Франція, %	Україна, %	Достовірність (p)
CC	33	35	0,46
CT	48	52	
TT	19	13	

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 ПВТ у цих групах показав статистично достовірну відмінність: частота SVR в українських пацієнтів досягла 63% проти 47% серед пацієнтів клініки Pitie-Salpetriere ($p < 0,05$). На перший погляд, таку високу ефективність ПВТ в українських клініках можна було б пояснити молодшим віком пацієнтів або гіршим комплаєнсом французьких хворих, однак дійсні 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 із п'яти прогностичних факторів: генотип IL28B, стадія фіброзу, ступінь запалення, генотип вірусу й вірусне навантаження. Значення співвідношення шансів (odds ratio, OR) з однією змінною групи перевірки достовірності становило 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) становило 4,84 (діапазон 2,59-12,50; $p = 0,0001$). Отже, основною причиною відмінностей у частоті SVR виявилася результуюча багатофакторного варіаційного аналізу, що враховувала п'ять основних ознак: IL28B, стадію фіброзу (FibroTest), ступінь запалення (ActiTest), генотип вірусу та вірусне навантаження.

Відповідно до мети дослідження нами співставлено динаміку фіброзу у ході ПВТ у двох групах пацієнтів: із відсутнім (n=110) та наявним (n=214) Т-алелем гена IL28B. Цілоком прогнозовано було констатовано найбільш значне зниження ступеня фіброзу серед хворих із сприятливим CC варіантом гена IL28B, адже саме в цій групі пацієнтів була найвища частота SVR (87 проти 44% при CT/TT генотипах). Однак, на нашу думку, більш важливими є виявлені нами відмінності в динаміці фіброзу всередині групи хворих, які 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

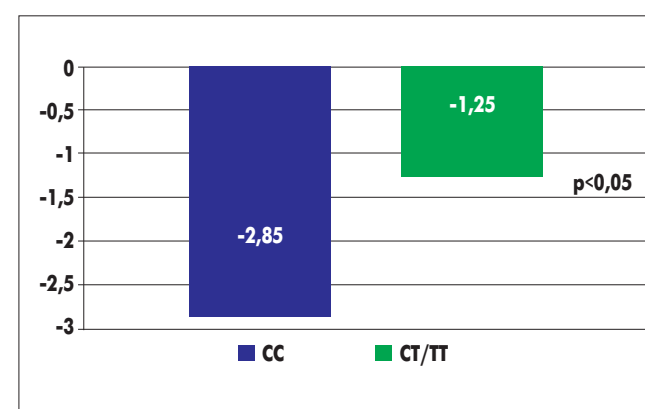


Рис. 2. Ступінь зниження фіброзу печінки у хворих, що досягли SVR після курсу ПВТ ХГС 1b генотипу, залежно від поліморфізму гена IL28B

однонуклеотидний поліморфізм IL28B відповідає генотипу CC ($p < 0,05$) (рис. 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. Ці 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 Ito та експресія білків-інгібіторів апоптозу (таких як Bcl-2), що підтримують процеси фіброгенезу, моно- та поліклональну проліферацію астроцитів і В-лімфоцитів з високим ризиком В-клітинної та гепатоцелюлярної неоплазії. Додатковими тригерами прогресування фіброзу в таких випадках, безперечно, можуть виступати ендегенні (стеатоз) та екзогенні (токсико-аліментарні) чинники. Тому, на нашу думку, доцільним є запровадження диспансерного спостереження з моніторингом фіброгенезу (FibroTest) і канцерогенезу (α -FP) не лише у хворих із наявним ХГС, а й у пацієнтів, що досягли авіремії, проте й надалі належать до груп ризику прогресування фіброзу, цирозу та гепатоцелюлярної карциноми.

Література

- 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 M.R., Thompson A., Veldt B.J., Watt K., Tillmann H., Poterucha J.J., Heimbach J.K., 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 post-transplant 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., Ratzu 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.