

2. Куличенко А.Н., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Зайцева О.А. Обеспечение готовности специализированных противоэпидемических бригад к работе при проведении массовых мероприятий. Журн. микробиол. 2014, 1: 76-80.
3. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., Зайцева О.А., Ефременко Д.В. Опыт стран-организаторов Олимпиад по обеспечению защиты от биологической угрозы. Журн. микробиол. 2014, 1: 70-75.
4. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Смоленский В.Ю., Малецкая О.В., Таран Т.В., Дубянский В.М., Семенко О.В., Агапитов Д.С., Грижебовский Г.М., Манин Е.А., Клиндухов В.П., Оробей В.Г., Антоненко А.Д. Анализ зарубежного опыта обеспечения биологической безопасности при проведении Олимпийских игр. Журн. микробиол. 2015, 2: 105-109.
5. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Топорков В.П., Смоленский В.Ю., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Современные угрозы и вызовы в области биологической безопасности и стратегия противодействия. Проблемы особо опасных инфекций. 2015, 3: 5-9.

Поступила 25.12.16

Контактная информация: Ефременко Дмитрий Витальевич, к. м. н., 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652) 26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

С.И.Семенов, А.И.Федоров, В.Л.Осаковский, С.С.Максимова, Ф.А.Платонов

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА IL28В И ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У НАСЕЛЕНИЯ ЯКУТИИ: КЛИНИЧЕСКИЕ ИСХОДЫ

НИИ здоровья Северо-Восточного федерального университета им. М.К.Аммосова, Якутск

Цель. Изучить клинические исходы у пациентов с хроническим гепатитом С (НСV) в зависимости от генотипа вируса гепатита С и полиморфизма гена IL28В. *Материалы и методы.* Обследованы 592 человека, из них у 75 методом ПЦР определены генотипы РНК НСV. Проведено генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов SNP — rs12979860 (С/Т) и rs8099917 (Т/Г) в гене IL28В методом ПЦР в режиме реального времени. *Результаты.* У 72 обследованных жителей Якутии была выявлена РНК НСV. Генотип 1b НСV определен в 74,2% случаев, 3a — в 11,4%, 1a и 2 — по 5,7%. Частота полиморфного варианта rs12979860 СС составила 72,2%, СТ — 27,8%, полиморфного варианта rs8099917 ТТ — 61,1%, ТГ — 23,2%. *Заключение.* При сочетании НСV 1b с полиморфными вариантами гена IL28В rs12979860 СС и rs8099917 СТ наблюдалось менее агрессивное течение болезни. С другой стороны, при инфицировании вирусом гепатита С с генотипом 3a лиц с полиморфизмом rs12979860 СС или rs809917 ТТ гена IL28В наблюдается более тяжелая клиническая картина. При наличии полиморфных вариантов rs8099917 Т/Г и rs12979860 С/Т наблюдались более тяжелые клинические исходы НСV-инфекции (вирусная нагрузка до 19035212 копий, цирроз с асцитом, гепатокарцинома).

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 86—92

Ключевые слова: вирусный гепатит С, генотип 2, генотип 1b, полиморфизм гена, интерлейкин 28В, гаплотипы СС, ТТ, ТГ

FREQUENCY OF OCCURRENCE OF POLYMORPHIC VARIANTS OF IL28B GENE AND GENOTYPES OF HEPATITIS C VIRUS IN POPULATION OF YAKUTIA: CLINICAL OUTCOMES

Research Institute of Health of Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia

Aim. Study clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C depending on genotype of hepatitis C virus (HCV) and IL28B gene polymorphism. *Materials and methods.* 592 individuals were examined, 75 of those had HCV RNA genotypes determined by PCR. Genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNP) — rs12979860 (C/T) and rs8099917 (T/G) in IL28B gene was carried out by real-time PCR. *Results.* HCV RNA was detected in 72 examined residents of Yakutia. HCV 1b genotype was determined in 74.2% of cases, 3a — in 11.4%, 1a and 2 — 5.7% each. Frequency of polymorph variant rs12979860 CC was 72.2%, CT — 27.8%, rs8099917 TT — 61.1%, TG — 23.2%. *Conclusion.* Combination of HCV 1b with polymorphic variants of IL28B gene rs12979860 CC and rs8099917 CT showed a less aggressive course of the disease. On the other hand, HCV infection of individuals with genotype 3a and polymorphism rs12979860 CC or rs809917 TT of IL28B gene showed a more severe clinical presentation. The presence of polymorph variants rs8099917 T/G and rs12979860 C/T showed more severe clinical outcomes of HCV infection (viral load up to 19035212 copies, cirrhosis with ascite, hepatocarcinoma).

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 86—92

Key words: viral hepatitis C, genotype 2, genotype 1b, gene polymorphism, interleukin 28B, haplotype CC, TT, TG

ВВЕДЕНИЕ

Вирусный гепатит С является одной из актуальных и нерешенных проблем медицины и здравоохранения, что определяется его повсеместным распространением и частым развитием хронических форм заболевания. В мире инфицированы вирусом гепатита С (HCV) более 500 млн человек, что составляет около 10% всего населения нашей планеты. На сегодняшний день «тихая» эпидемия гепатита С охватила многие страны. Установлено, что HCV является причиной 70% случаев хронического гепатита, 40% случаев цирроза печени, 60% случаев гепатоцеллюлярной карциномы [3, 7, 9]. Актуальность и важность дальнейшего исследования проблемы гепатита С обусловлены ростом заболеваемости среди разных этнических групп населения, частое поражение лиц молодого возраста, высокая частота случаев перехода в хроническую стадию с возможным развитием цирроза и первичного рака печени [2, 4].

Республика Саха (Якутия) является одним из регионов Российской Федерации с наименьшей плотностью населения и относится к территориям с умеренной частотой распространения вирусного гепатита С [5]. В Якутии из известных форм гепатита С наиболее распространены генотипы 1b и 3a. В последние годы наблюдается неуклонный рост заболеваемости хроническим вирусным гепатитом С (ХВГ С) среди коренного населения региона, что становится одной из социально значимых проблем республики. Это особенно заметно на фоне успешных иммунопрофилактических мероприятий по снижению заболеваемости вирусным гепатитом В. Эффективность лечения больного ХВГ С снижена ввиду продолжительного и дорогостоящего курса лече-

ния, а также возможности развития вторичных осложнений. В сложившейся ситуации поиск генов организма человека, кодирующих защитные белки против HCV-инфекции, является приоритетной задачей научных исследований в данном направлении. Ген IL28B, кодирующий интерферон лямбда, является одним из искомым генов. Полиморфизм смежных участков данного гена определяет прогноз заболевания и влияет на эффективность лечения гепатита С в зависимости от этнической принадлежности больного. Определение полиморфизма данного гена у больных ХГС позволило бы корректировать тактику и стратегию терапии, что может способствовать значительному снижению риска развития осложнений и соответственно стоимости лечения. Целью данного исследования было изучение клинических исходов у больных ХГС в зависимости от генотипа вируса гепатита С и полиморфизма гена IL28B.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено скрининговое исследование образцов периферической крови 592 жителей Якутии с целью выявления маркеров и РНК вируса гепатита С. По результатам исследования наличие хронического вирусного гепатита С установлено у 72 лиц из числа обследованных. На образцах крови с положительными результатами теста на ХГС проведено генотипирование РНК вируса гепатита С. Группу больных ХГС составили 36 пациентов отделения вирусных гепатитов, в том числе 17 жителей сельской местности республики. Анализ генотипов вируса гепатита С и показателя вирусной нагрузки (число копий вирусной РНК в 1 мл образца) проводился методом ПЦР в лаборатории Центрального НИИ эпидемиологии (Москва). Генотипирование двух SNP — rs12979860 (C/T) и rs8099917 (T/G) гена IL28B в образцах крови больных ХВГ С (n=36) и здоровых людей (n=36) проводился в лаборатории генетических исследований НИИ здоровья Северо-Восточного федерального университета (Якутск). Генотипирование проводили с помощью набора реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов SNP rs12979860 (C/T) и rs8099917 (T/G) в гене IL28B (кат: г-05-100-f) производства «ООО ИнтерЛабСервис» (Москва). Исследование проводилось методом ПЦР в режиме реального времени.

Статистический анализ полученных результатов проведен в пакете прикладных программ SPSS 20. Нормальность распределения количественных признаков проверялась при помощи одновыборочного критерия Колмогорова-Смирнова. Для сравнения частоты качественных признаков строили таблицы сопряженности с вычислением критерия χ^2 Пирсона. При сравнении средних значений количественных показателей использовали дисперсионный анализ (при нормальном распределении исследуемых показателей). Принимали 5% уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты проведенных нами исследований показали, что в якутской популяции также чаще всего встречается генотип 1b вируса гепатита С (выявлен у 77,2% больных). В то же время, генотип 3a встречается лишь у 11,4% обследованных лиц, а частота встречаемости генотипов 1a и 2 составила всего по 5,7%.

Методом генотипирования установлена частота встречаемости полиморфных вариантов гена IL28B (CC — 72,2%, CT — 27,7%, TT — 61,1% и TG — 23,2%) у представителей якутской популяции.

Таблица 1. Распределение полиморфных вариантов гена IL28B среди больных ХГС и здоровых людей

Группы исследования	Частота полиморфных вариантов гена IL28B											
	rs129979860						rs8099917					
	CC		p	CT		p	TT		p	TG		p
	n	%		n	%		n	%		n	%	
Больные ХГС (n=36)	26	72,2	0,012	10	27,8	0,012	22	73,3	0,017	8	26,7	0,017
Здоровые (n=36)	34	94,4		2	5,6		32	94,1		2	5,9	

Таблица 2. Клинические исходы у больных ХГС при разных вариантах сочетаний вирусных генопов и гаплотипов гена IL28B

Клинические исходы	Генотипы HCV и гаплотипы IL28B		F	p
	1b	3a		
	rs12979860 (C/T)	rs8099917(T/G)		
	n=11	n=4		
Вирусная нагрузка	Низкий уровень (до 600 000 копий РНК/мл)	Высокий уровень (739 321–19 035 212 копий РНК/мл)	—	—
АЛТ, ед/л	170,9±32,6	748,7±204,3	5,4	0,038
Общий белок, г/л	69,9±1,3	72,7±4,2	0,02	0,9
Билирубин, мкмоль/л	36,2±6,3	96,7±34,6	7,4	0,017
Цирроз печени	Не выявлен	Цирроз с проявлениями асцита, варикозного расширения вен пищевода с кровотечением	—	—
Карцинома печени	Не выявлена	Диагноз установлен у 1 больного	—	—

Примечание. F — критерий Фишера, p — уровень статистической значимости.

Результаты исследования распределения полиморфных вариантов гена IL28B, проведенного среди больных ХГС и практически здоровых людей, показали, что в группе здоровых людей генотипы rs129979860 CC (p=0,012) и rs8099917 TT (p=0,017) встречаются значительно чаще, чем в группе больных хроническим гепатитом С (табл. 1).

Проведен сравнительный анализ клинических проявлений хронического вирусного гепатита С при инфицировании генотипами 1b и 3a. При этом обнаружена более высокая вирусная нагрузка с повышенной цитолитической активностью и случаи цирроза печени при инфицировании генотипом 3a (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Геном вируса гепатита С состоит из однонитевой позитивной РНК с выраженной гетерогенностью размером до 10 000 нуклеотидных оснований. В настоящее время установлено существование до 34 генотипов вируса. Наиболее значимыми для практического здравоохранения являются 5 из них. Обозначаются они как 1a, 1b, 2a, 2b и 3a [6]. В Европейской части России в большинстве случаев (до 69,6%) встречается генотип 1b. Частота встречаемости остальных генотипов незначительна. В якутской популяции также чаще всего встречается генотип 1b вируса гепатита С (выявлен у 77,2% больных). В то же время, генотип 3a встречается лишь у 11,4% обследованных лиц, а частота встречаемости генотипов 1a и 2 составила всего по 5,7%.

Известно, что у носителей генотипа rs12979860 CC и rs8099917 TT может произойти спонтанная элиминация вируса, т.е. выздоровление после острого

вирусного гепатита С и последующее исчезновение вируса из организма. У данной группы больных отмечается высокая эффективность противовирусного лечения [11]. С другой стороны, наличие аллели G в rs8099917 ассоциируется с более тяжелыми формами ХГС, и среди носителей данной аллели вероятность неэффективной противовирусной терапии очень высока [10].

Известно, что при наличии полиморфного варианта генотипа rs8099917 ТТ возможно спонтанное излечение от HCV-инфекции вне зависимости от лечения. Кроме того, у больных с данным вариантом исследуемого гена сохраняется вероятность высокой эффективности противовирусной терапии. В исследованной выборке якутского населения наблюдается высокая частота встречаемости полиморфного варианта rs8099917 ТТ (данный вид генотипа встречается у 73,3% больных ХГС и 94,1% здоровых людей).

По мнению ряда авторов, наличие аллельных вариантов гена IL28B — rs12979860 СС и rs8099917 ТТ является фактором, повышающим вероятность благоприятного исхода при HCV-инфекции [Мицура В.М. и др., 2014]. На основании литературных данных и результатов собственных исследований мы провели анализ ассоциации клинической картины хронического гепатита С с частотой полиморфных вариантов гена IL28B в якутской популяции. Результаты показали, что у 100% больных хроническим гепатитом С без цирроза печени встречаются аллельные варианты rs12979860 СС и rs8099917 ТТ.

С другой стороны, у больных ХГС с циррозом печени установлена высокая частота встречаемости генотипов TG/CT и CT, достигающая в сумме 44,5%. Степень тяжести клинических проявлений болезни также отличалась и в зависимости от полиморфизма генов IL28B. При наличии полиморфных вариантов rs8099917 T/G и rs12979860 C/T наблюдались более тяжелые последствия HCV-инфекции. У больных с данным видом генотипа развивалась тяжелая стадия цирроза печени с проявлениями асцита и варикозное расширение вен пищевода с кровотечением. Вирусная нагрузка в указанной группе пациентов колебалась от 739321 до 19035212 копий вирусной РНК в 1 мл крови. Возраст обследованных больных не превышал 48 лет. Исключение составила больная 65 лет с вирусной нагрузкой 19035212 копий вирусной РНК в 1 мл крови. На момент обследования длительность ее заболевания составила 19 лет. Длительность заболевания остальных больных с данным генотипом не превышала восьми лет. По результатам ультразвуковой диагностики, компьютерной томографии и онкотестов АФП, РАЭ, СА19,9 у одного больного из исследуемой группы был установлен диагноз гепатокарциномы. Таким образом, по результатам наших исследований аллель G в rs8099917 ассоциируется с неблагоприятным прогнозом заболевания и высокой вирусной нагрузкой до 19035212 копий вирусной РНК в 1 мл крови. В то же время, наличие полиморфизмов rs12979860 СС и rs8099917 СТ гена IL28B при HCV-инфекции с генотипом Ib, как правило, обуславливает более благоприятное течение заболевания. С другой стороны, при инфицировании вирусом гепатита С с генотипом 3a лиц с полиморфизмом rs12979860 СС или rs809917 ТТ гена IL28B наблюдается более тяжелая клиническая картина.

Аналогичные с полученными нами результатами данные о преобладании частоты встречаемости генотипа rs12979860 СС у здоровых людей по сравнению с больными ХГС приводятся в работе [8]. В разных популяциях мира полиморфные варианты генотипа rs12979860 распределены неравномерно [1]. По литературным данным частота встречаемости полиморфного варианта

rs12979860 CC в мировой популяции варьирует от 16 до 39%, а rs12979860 CT — в пределах 48 — 49%.

В якутской популяции частота полиморфного варианта rs12979860 CC составила 72,2%, CT — 27,8%. В мировой популяции вариант TT данного генотипа встречается всего в 10,1 — 36,0% случаев.

Представляется важным, что у больных с HCV 1b и полиморфными вариантами гена IL28B rs12979860 CC и rs8099917 CT показатели цитолиза клеток (АЛТ) лишь вдвое превышали норму, что свидетельствует о менее агрессивном течении болезни.

На основании результатов анализа клинических исходов у больных ХГС с разными аллельными вариантами гена IL28B, инфицированных HCV с генотипами 1b и 3a, можно предположить, что иммунная система носителей аллелей rs12979860 C/T способна подавлять вирус гепатита С с генотипом 1b. С другой стороны, наличие аллели rs8099917(T/G) у больных ХГС, инфицированных HCV 3a, сопряжено с развитием таких тяжелых клинических исходов как гепатокарцинома и цирроз печени. Также в образцах крови данной группы больных установлен высокий уровень вирусной нагрузки и онкомаркеров АФП РАЭ, СА19,9. Данное наблюдение свидетельствует о важности проведения генетических исследований наряду с другими лабораторными тестами при обследовании больных ХГС. Следует отметить, что наибольшее значение полиморфизм гена IL28B приобретает при инфицировании больных HCV с генотипами 1b и 3a, а также, что результаты исследования полиморфизма гена IL28B могут иметь важное прогностическое значение при заболевании вирусным гепатитом С.

Таким образом, по результатам наших исследований установлена возможная ассоциация полиморфизма гена IL-28B (rs12979860 и rs8099917) со степенью тяжести поражений печени у больных ХГС. В связи с этим, результаты генетических исследований для определения полиморфных вариантов гена IL28B и генотипов HCV могут служить в качестве одного из важных предикторов для прогноза клинических исходов у больных хроническим вирусным гепатитом С и подбора эффективных методов лечения.

Результаты генетических исследований по установлению генотипов вируса гепатита С (1b, 3a) и полиморфизма гена IL28B на участках rs12979860 (C/T) и rs8099917 (T/G) могут служить в качестве одного из важных предикторов при прогнозе клинических исходов у больных хроническим вирусным гепатитом С.

Разные варианты сочетаний генотипов HCV (1b, 3a) и полиморфных вариантов гена IL28B на участках rs12979860 (CC, CT) и rs8099917 (TT, TG), индивидуальные для каждого больного ХГС, с большой долей вероятности могут влиять на эффективность стандартных методов лечения.

Работа проведена в рамках Государственного задания № 17.6344.2017/БЧ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акимов И.А., Прасолова М.А., Иванов М.К. Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов в регионе, прилежащем к гену IL28B, методом ПЦР с анализом кривых плавления. *Новости «Вектор-Бест»*. 2014, 2 (72): 2-7.
2. Львов Д.К., Самохвалов Е.И., Миширо С.И. др. Закономерности распространения вируса гепатита С и его генотипов в России и странах СНГ. *Вопросы вирусологии*. 1997, 4: 157-161.
3. Майер К.-П. Гепатит и последствия гепатита. Под ред. А.А. Шептулина. М., ГЭОТАР-Медиа, 1999.

4. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты в клинической практике. Санкт-Петербург, Теза, 1996.
5. Семенов С.И. Эпидемиологические особенности и клиническая характеристика вирусных гепатитов В, С и дельта в Республике Саха (Якутия). Автореф. дисс. д-ра мед. наук. М., 2007.
6. Учайкин В.Ф., Чередниченко Т.В., Смирнов А.В. Инфекционная гепатология: руководство для врачей. М., ГЭОТАР-Медиа, 2014.
7. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика). М., ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2003.
8. Mangia A., Thompson A.J., Santoro R. et al. An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. *Gastroenterology*. 2010, 139: 821-827.
9. Manns M.P. Hepatotropic viruses and autoimmunity. *J. Viral. Hepat.* 1997, 4 (1): 7-10.
10. Tanaka Y., Nishida N., Sugiyama M. et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* 2009, 41: 1105-1109.
11. Thomas D.L. et al. Genetic variation in IL28 B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009, 461 (7265): 798-801.

Поступила 10.10.16

Контактная информация: Семенов Сергей Иннокентьевич, д.м.н., Республика Саха (Якутия), 677010, Якутск, Сергеляхское шоссе, 4, корпус С-2, р.т. (411-2)35-32-75

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

С.И.Семенов, А.И.Федоров, С.С.Максимова, К.М.Степанов, Ф.А.Платонов

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО СТАТУСА БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В, С, D И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

НИИ здоровья Северо-Восточного федерального университета им. М.К.Аммосова, Якутск

Цель. Оценить иммунный статус у больных хроническим гепатитом (ХГ) в зависимости от типа возбудителя и тяжести инфекционного процесса. *Материалы и методы.* Были обследованы 232 жителя Якутии, из них 127 больных разными формами хронического гепатита и 105 здоровых лиц. Исследован относительный уровень содержания зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперов (CD4⁺), Т-супрессоров (CD8⁺), В-лимфоцитов (CD72⁺) и натуральных киллеров (CD16⁺) методом проточной цитометрии, а также концентрации сывороточных иммуноглобулинов классов А, М и G методом ИФА. *Результаты.* У больных хроническими гепатитами разных форм установлено снижение экспрессии на поверхности лимфоцитов дифференцировочных антигенов — CD3⁺, CD4⁺, CD72⁺ и концентрации сывороточных иммуноглобулинов. У больных ХГD в фазе монорепликации высокая активность инфекционного процесса сопровождается сдвигом иммунорегуляторного индекса (ИРИ) в сторону повышения активности цитотоксических клеток с одновременным развитием дефицита зрелых функционально активных Т-лимфоцитов. В группе больных гепатитом D с циррозом печени при снижении численности Т-хелперов и В-лимфоцитов сохраняется нормальная концентрация сывороточных иммуноглобулинов. *Заключение.* У больных различными формами вирусных гепатитов может возникать приобретенный иммунодефицит, часто сопровождаемый усилением активности НК-клеток.