



Сравнительный анализ однонуклеотидного полиморфизма гена *IL28B* у больных гепатитом С русских и тувинцев

Л.И. Николаева¹, Е.А. Лейбман^{1,2}, А.Е. Гришечкин¹, Г.В. Сапронов³,
В.А. Кичатова⁴, Т.В. Кожанова⁴, К.К. Кюрегян⁴, М.И. Михайлов⁴,
А.А. Сарыглар⁵

¹ – ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

² – ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Москва

³ – ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования», Москва

⁴ – ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАН, Москва

⁵ – ГУЧ «Инфекционная больница» Министерства здравоохранения Республики Тыва, г. Кызыл

Контактная информация: д.б.н. Николаева Людмила Ивановна, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16; тел.: (499)190-30-50; e-mail: L.I.Nikolaeva@mail.ru

Целью исследования явилось определение прогностически значимых для стандартной двойной терапии однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) около гена *IL28B* по двум локусам rs12979860 (C>T) и rs8099917 (T>G) у пациентов с хроническим гепатитом С русской (европеоиды) и тувинской (монголоиды) национальности. Определение ОНП выполняли методом ПЦР в режиме реального времени. В локусе rs12979860 достоверно чаще у тувинцев выявлялся С-аллель, а у русских – Т-аллель ($p=0,0466$). Статистически значимых различий по Т- и G-аллелям локуса rs8099917 не выявлено. Генотип С/С по локусу rs1297960 достоверно чаще определялся у тувинцев ($p=0,0231$), а генотип С/Т – у русских ($p=0,0425$). Генотип Т/Т по локусу rs8099917 достоверно чаще выявляется у тувинцев ($p=0,0259$), а генотип Т/G – у русских ($p=0,0188$). С учетом двух полиморфных локусов, у тувинских пациентов достоверно чаще ($p=0,0203$) выявлялся генотип С/С (rs12979860) – Т/Т (rs8099917), что дает лучший прогноз на успешное завершение терапии.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, ген *IL28B*, гепатит С, этногенетические различия.

Введение

До настоящего времени гепатит С остается одной из актуальных проблем гепатологии во всем мире. В нашей стра-

не сохраняются относительно высокими показатели впервые диагностированного хронического гепатита С (ХГС). В 2000 г. было выявлено 22,2 случая ХГС

на 100 тыс. населения, в 2014 г. – 39,94 случаев [5]. Специфическая терапия гепатита С в последние годы совершенствуется, появились препараты прямого противовирусного действия. Однако в нашей стране пока наиболее доступна двойная терапия пегилированным интерфероном-альфа-2а/б в сочетании с рибавирином. Применение такой терапии позволяет достичь устойчивого вирусологического ответа (УВО) у 50-60% пациентов с ХГС с небольшими колебаниями в зависимости от генотипа вируса [1]. Известно, что не только генотип вируса влияет на достижение УВО, но и генетические факторы пациента, среди которых наиболее значимым для больных гепатитом С является однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) около гена интерлейкина-28В (*IL28B*).

В 2009 г. три независимые группы исследователей при проведении полногеномных исследований установили ассоциацию полиморфизма около гена *IL28B* в локусе rs12979860 (С>Т), который расположен выше промоторной области гена, с достижением УВО при двойной терапии пациентов с ХГС [7, 13, 14]. Генотип С/С в этом локусе в 2 раза чаще встречался у пациентов, достигших УВО. Генотипы С/Т и Т/Т достоверно чаще обнаруживались у лиц, не достигших УВО. Вскоре Я. Танака (Y. Tanaka) и соавт. установили для больных ХГС из Японии, а В. Сяппиах (V. Supriah) и соавт. – для пациентов из Европы, что еще один ОНП около гена *IL28B* в локусе rs8099917 (Т>G), расположенном ниже гена, влияет на эффективность двойной терапии [13, 14]. Возможно, что последний полиморфизм несколько большую роль играет у пациентов монголоидного происхождения

[14, 12]. Установлена также связь генотипа С/С в локусе rs12979860 с самопроизвольной элиминацией вируса гепатита С (ВГС) при острой инфекции у европейцев и афроамериканцев [15].

Д.Л. Томас (D.L. Thomas) и соавт. выявили закономерность распространения С- и Т-аллелей (локус rs12979860) у здоровых людей по континентам [15]. Чаще всего генотип С/С встречается у жителей Восточной Азии, почти в 2 раза реже он определяется у коренных жителей Африки. Промежуточное положение по частоте обнаружения аллельной пары С/С занимают коренные жители Европы и Америки.

Ген *IL28B* локализован в 19-ой хромосоме в зоне 19q13.13 [7]. Он кодирует недавно открытый интерферон-λ3 (ИФН-λ3), который по многим биологическим эффектам похож на интерферон-α (ИФН-α). Установлено, что ИФН-λ3 ингибирует репликацию ВГС в зависимости от дозы и времени воздействия, усиливает экспрессию генов *ISG* (interferon stimulated genes) и повышает противовирусную активность ИФН-α [11]. На поверхности клеток ИФН-λ3 взаимодействует со своим специфическим рецептором IFNλR1 и стимулирует противовирусный путь JAK-STAT, который приводит к активации генов *ISG* [11, 6]. Молекулярный механизм влияния отдельных генотипов в локусах rs12979860 и rs8099917 гена *IL28B* на элиминацию ВГС пока дискутируется [6, 16]. Недавно выявлен еще один полиморфный локус около гена *IL28B*, значение которого изучается [8].

Данные по особенностям распространения отдельных генотипов по локусам rs12979860 и rs8099917 гена *IL28B* у жителей нашей страны и паци-

ентов больных ХГС с учетом этноса малочисленные и представлены публикациями, где исследовали небольшие группы людей [15, 2-4].

Учитывая прогностическую роль отдельных аллельных вариантов полиморфных локусов гена *IL28B* для оценки эффективности двойной терапии ХГС, в данной работе были установлены частоты встречаемости различных аллелей, аллельных пар и гаплотипов в группах русских (европеоиды) и тувинских (монголоиды) пациентов с ХГС.

Материалы и методы

Группа пациентов с ХГС русской национальности была представлена 122 взрослыми (средний возраст – $39,07 \pm 2,05$ лет) и 23 детьми (средний возраст – $9,54 \pm 1,01$ лет). Доля лиц мужского пола – 43,1%, доля женского – 56,9%. Группу пациентов тувинской национальности составили 161 взрослый человек, средний возраст – $47,2 \pm 1,9$ лет. Доля лиц мужского пола составила 31,2%, доля женского – 68,8%. В обеих группах преобладали женщины. Принадлежность к русской или тувинской национальности определяли по паспортным данным пациента и национальности родителей. Пациенты из группы русской национальности проживали в г. Москва, группы тувинской национальности – в г. Кызыл.

В больницах, где выполняли забор крови, были соблюдены этические требования, было получено разрешение этических комитетов на проведение данного исследования. Пациенты, родители или опекуны были информированы о цели забора крови и дали согласие на проведение генетических анализов.

ДНК из цельной крови пациентов

выделяли, используя набор реактивов «Проба-рапид-генетика» («ДНК-технология», Россия). ДНК из сухой капли крови (для пациентов из Тувы) выделяли, используя набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I с помощью автоматической станции MagNa Pure Compact («Roche Diagnostics GmbH», Германия). Первичный внешний лизис сухой капли с диска фильтровальной бумаги диаметром 1 см проводили с помощью буфера MagNa Pure DNA Tissue Lysis Buffer («Roche Diagnostics GmbH», Германия) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем лизаты загружали в автоматическую станцию и проводили выделение ДНК по протоколу производителя.

Генотипы пациентов по двум локусам rs12979860 и rs8099917 устанавливали методом ПЦР в режиме реального времени, используя методику и набор реактивов «Иммуногенетика IL28B», а также детектирующий амплификатор ДТлайт от производителя «ДНК-технология» (Россия).

Достоверность различий ($p < 0,05$) в группах пациентов устанавливали с помощью критерия хи-квадрат, используя пакет программ Statistica 10 (StatSoft, Inc. Tulsa, USA).

Результаты и их обсуждение

Распределение С- и Т-аллелей по локусу rs12979860 и Т- и G-аллелей по локусу rs8099917 гена *IL28B* в двух группах пациентов представлено на рис. 1. С-аллель локуса rs12979860 достоверно чаще определялся у тувинцев ($p = 0,0466$; $\chi^2 = 3,96$), а Т-аллель – у русских пациентов ($p = 0,0466$; $\chi^2 = 3,96$). Достоверных различий в частоте обнаружения Т- и

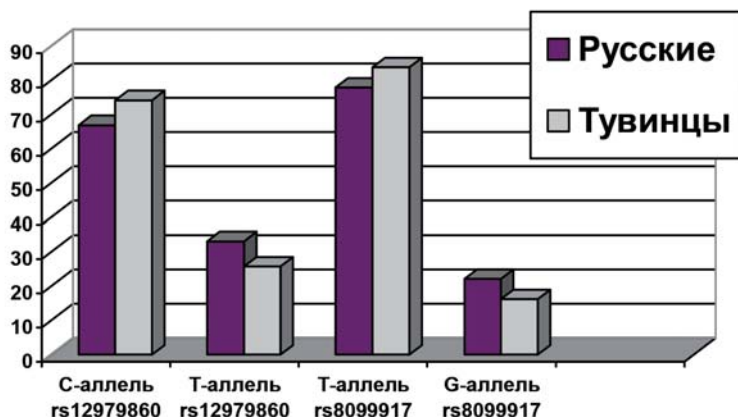


Рис. 1. Частота обнаружения С- и Т-аллелей в локусе rs12979860 и Т- и G-аллелей в локусе rs8099917 в сравниваемых группах русских и тувинцев.

G-аллелей по локусу rs8099917 не установлено. Ранее показано преобладание С-аллеля в локусе rs12979860 у коренных жителей Азии [15], к которым также относятся тувинцы, этнически очень близкие монголам. Однако данных по частоте выявления С-аллеля ни у монголов, ни у тувинцев пока не опубликовано. В одной из первых публикаций в 2009 г. по 32 образцам от русских людей (восточные славяне) определена частота С-аллеля в 64,1% [15]. В нашем исследо-

вании она составила 66,9%. У коренных жителей Польши (западные славяне) распространенность С-аллеля составила 68,2% [9]. По данным Д.Л. Томаса и соавт., у коренных жителей Южной Кореи, Китая и Японии доля С-аллеля составляет более 90,5% [15], что выше, чем у тувинцев в нашем исследовании.

Распределение аллельных пар по двум полиморфным локусам гена *IL28B* у пациентов русской и тувинской национальности представлено в таблице.

Таблица
Частота встречаемости отдельных аллелей в локусах rs12979860 и rs8099917 гена *IL28B* у пациентов русской и тувинской национальности

Генотипы (локус)	Тувинцы (n=161)	Русские (n=145)	Величины p (хи-квадрат)
C/C (rs12979860)	57,14 (n=92)	44,14 (n=64)	p=0,0231 (5,16)
C/T (rs12979860)	34,16 (n=55)	45,52 (n=66)	p=0,0425 (4,12)
T/T (rs12979860)	8,70 (n=14)	10,34 (n=15)	p=0,0623 (0,24)
T/T (rs8099917)	72,05 (n=116)	60,00 (n=87)	p=0,0259 (4,96)
T/G (rs8099917)	23,60 (n=38)	35,86 (n=52)	p=0,0188 (5,52)
G/G (rs8099917)	4,35 (n=7)	4,14 (n=6)	p=0,0927 (0,01)

У тувинцев достоверно чаще определялись генотипы С/С в локусе rs12979860 и Т/Т в локусе rs8099917. У русских пациентов преобладали генотипы С/Т и Т/Г в этих же локусах. Преобладание гетерозиготных генотипов по данным локусам ранее было обнаружено у здоровых лиц и больных пациентов европеоидного происхождения по сравнению с пациентами монголоидного происхождения, проживающими в г. Санкт-Петербург, Иркутск и Улан-Удэ [3, 2].

Статистически достоверных различий в частоте обнаружения отдельных гаплотипов в сравниваемых группах пациентов не обнаружено. Наиболее часто определялся гаплотип С (rs12979860) – Т (rs8099917). У тувинцев его доля составила 78,24% и у русских – 71,84%. Следующим по частоте обнаружения был гаплотип Т (rs12979860) – Т (rs8099917): у русских он составил 17,48% и у тувинцев – 13,36%. Два других гаплотипа Т (rs12979860) – G (rs8099917) и С (rs12979860) – G (rs8099917) вы-

являлись с невысокой частотой: 6,87% (тувинцы) и 8,74% (русские); 1,53% (тувинцы) и 1,94% (русские) соответственно. Следует отметить высокое выявление рекомбинантного гаплотипа Т (rs12979860) – Т (rs8099917) по сравнению с другим рекомбинантным гаплотипом С (rs12979860) – G (rs8099917).

Частота обнаружения в двух группах больных различных вариантов генотипов по двум локусам гена *IL28B* представлена на рис. 2. Генотип С/С (rs12979860) – Т/Т (rs8099917) чаще определялся в группе тувинских пациентов ($p=0,0203$; $\chi^2=5,39$), а генотип С/Т-Т/Г – в группе русских пациентов ($p=0,0334$; $\chi^2=4,53$). Статистически значимых различий в частоте обнаружения других вариантов генотипов не обнаружено.

Учитывая более частое обнаружение генотипов С/С (rs12979860) – Т/Т (rs8099917) у тувинцев, следует ожидать большую вероятность достижения УВО при двойной терапии у этих пациентов, чем у больных ХГС, имеющих русскую

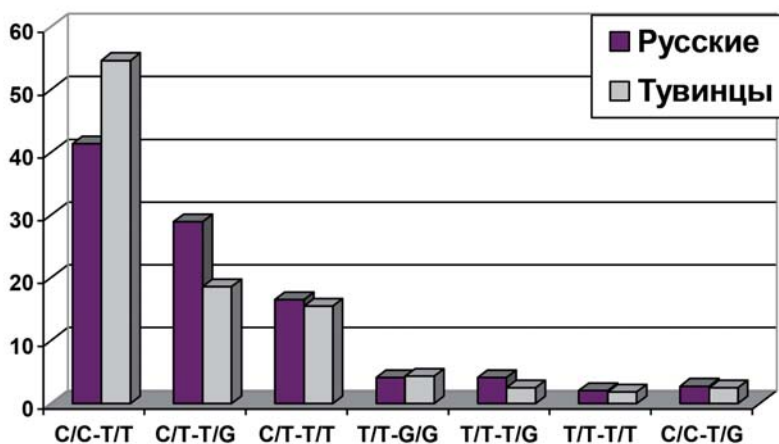


Рис. 2. Частота обнаружения различных вариантов генотипов с учетом двух полиморфных локусов гена *IL28B* в сравниваемых группах русских и тувинцев.

национальность. Однако достижение УВО определяется не только благоприятным генотипом по гену *IL28B*, но и зависит от ряда других факторов организма больного и свойств вируса: от длительности ХГС, возраста, стадии поражения печени и интенсивности мутирования вируса. Тем не менее, ряд исследователей предлагают рассматривать генотип C/C (rs12979860) - T/T (rs8099917) гена *IL28B* как независимый предиктор эффективности двойной терапии гепатита С [10].

Заключение

В группах русских и тувинских пациентов обнаружены различия в частоте выявления С- и Т-аллелей в локусе rs12979860 (С>Т). В этом локусе в группе тувинцев достоверно чаще выявлялся С-аллель, а у русских – Т-аллель. Статистически значимых различий по Т- и G-аллелям локуса rs8099917 не обнаружено. Генотип C/C по локусу rs12979860 и вариант T/T по локусу rs8099917 достоверно чаще определялся у тувинцев, а генотип C/T и T/G в соответствующих локусах – у русских. С учетом двух полиморфных локусов, у русских пациентов достоверно чаще выявлялся генотип C/T (rs1297960) - T/G (rs8099917), а у тувинцев – C/C (rs1297960) - T/T (rs8099917), который чаще ассоциируется с достижением УВО при двойной терапии.

Список литературы

1. *Абдурахманов Д.Т.* Перспективы в лечении хронического гепатита С // Клиническая гепатология. 2010. № 15. С. 50-53.
2. *Арсентьева Н.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В.* Полиморфизм гена *IL28B* у здоровых и больных хроническим вирусным гепатитом С жителей Санкт-Пе-

- тербурга // Сб. мат-лов конф. «Молекулярная диагностика-2014». – М. 2014. Т. 1. С. 120.
3. *Заматкина Л.Ф., Малов С.И., Суханова Е.В., Санжеева Д.Н., Хойкова О.Ч., Бимбаева Э.С.* Результаты исследования полиморфизма гена интерлейкина-28В при хроническом гепатите С // Сб. мат-лов конф. «Молекулярная диагностика-2014». – М. 2014. Т. 1. С. 136-137.
4. *Николаева Л.И., Колотвин А.В., Самоходская Л.М., Макашова В.В., Токмалаев А.К., Самохвалов Е.И., Альховский С.В.* Генетический полиморфизм и эффективность противовирусной терапии при хроническом вирусном гепатите С // Вестник Российского Университета дружбы народов. Серия «Медицина». 2012. № 2. С. 81-88.
5. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Российской Федерации [Электронный ресурс] / Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях в Российской Федерации. – Режим доступа: <http://75.gospotrebnadzor.ru>, свободный. Загл. с экрана. – Яз. рус.
6. *Asselah T.J., Bieche I., Narguet S., Sabbagh A., Laurendeau I., Ripault M.P., Boyer N., Martinot-Peignoux M., Valla D., Vidaud M., Marcellin P.* Liver gene expression signature is predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C // Gut. 2008. V. 57. P. 516-524.
7. *Ge D., Fellay J., Thompson A.J., Simon J.S., Shianna K.V., Urban T.J., Heinzen E.L., Qiu P., Bertelsen A.H., Muir A.J., Sulkowski M., McHutchison J.G., Goldstein D.B.* Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance // Nature. 2009. V. 461. P. 399-401.
8. *Hiramine S., Sugiyama M., Furusyo N., Uto H., Ido A., Tsubouchi H., Watanabe H., Ueno Y., Korenaga M., Murata K., Masaki N., Hayashi J., Thomas D.L., Mizokami M.* A thymine-adenine dinucleotide repeat polymorphism near *IL28B* is associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus // J. Gastroenterol. 2015. (PubMed information – до выхода в печать).
9. *Kaczor M.P., Seczyńska M., Szczeklik W., Sanak M.* *IL28B* polymorphism (rs12979860) associated with clearance of HCV infection in Poland: Systematic review of its prevalence in chronic hepatitis C patients and general popula-

- tion frequency // *Pharmacol. Rep.* 2015. V. 67. P. 260-266.
10. Li S., Hu P., Zhang Q.Q., Liu Y.H., Hu H.D., Zhang D.Z., Ren H. Single nucleotide polymorphisms of the IL28B and sustained virologic response of patients with chronic hepatitis C to PEG-interferon/ribavirin therapy: A meta-analysis: Meta-analysis of IL28B // *Hepat. Mon.* 2011. V. 11. P. 163-172.
 11. Marcello T., Grakoui A., Barba-Spaeth G., Machlin E.S., Kotenko S.V., MacDonald M.R., Rice C.M. Interferon alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics // *Gastroenterology.* 2006. V. 131. P. 1887-1898.
 12. Sinn D.H., Kim Y.L., Lee S.T., Gwak G.Y., Choi M.S., Lee J.H., Koh K.C., Yoo B.C., Paik S.W. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C virus in Asian patients // *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2011. V. 26. P. 1374-1349.
 13. Suppiah V., Moldovan M., Ahlenstied G., Berg T., Weltman M., Abate M.L., et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. P. 1100-1104.
 14. Tanaka Y., Nishida N., Sugiyama M., Matsuura K., Sakamoto N., Nakagawa M., Korenaga M., Hino K., Hige S., Ito Y., Mita E., Tanaka E., Mochida S., Murawaki Y., Honda M., Sakai A., Hiasa Y., Nishiguchi S., Koike A., Sakaida I., Imamura M., Ito K., Yano K., Masaki N., Sugauchi F., Izumi N., Tokunaga K., Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. P. 1105-1109.
 15. Thomas D.L., Thio C.L., Martin M.P., Qi Y., Ge D., O'Huigin C., Kidd J., Kidd K., Khakoo S.I., Alexander G., Goedert J.J., Kirk G.D., Donfield S.M., Rosen H.R., Tobler L.H., Busch M.P., McHutchison J.G., Goldstein D.B., Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus // *Nature.* 2009. V. 461. P. 798-801.
 16. Younossi Z.M., Bireddinc A., Ester M., Stepanova M., Afendy A., Baranova A. The impact of IL28B genotype on the gene expression profile of patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon alpha and ribavirin // *J. Translational Medicine.* 2012. V. 10. P. 25-35.

Comparative analysis of single nucleotide polymorphisms of gene *IL28B* in Russian and Tyvinian patients with hepatitis C

L.I. Nikolaeva, E.A. Leybman, A.E. Grishechkin, G.V. Sapronov,
V.A. Kichatova, T.V. Kozhanova, K.K. Kyuregян, M.I. Mikhaylov,
A.A. Sarygлар

The aim of the study was to detect single nucleotide polymorphisms (SNP) near gene *IL28B* on locus rs12979860 (C>T) and locus rs8099917 (T>G), which are prognostically significant for standard dual therapy in patients with chronic hepatitis C of Russian (European) and Tyvinian (Mongoloid) ethnicity. The SNPs were discovered by real-time PCA. The Tyvinian patients more frequently showed the C-allele, and Russian patients more frequently displayed T-allele ($p=0.0466$). There were no differences in T- and G-alleles on locus rs8099917. The Tyvinian patients more often showed genotype C/C ($p=0.0231$) and Russian patients more frequently displayed genotype C/T ($p=0.0425$) on locus rs1297960. Genotype T/T on locus rs8099917 significantly often detected in Tyvinian patients ($p=0.0259$) and genotype T/G more frequently detected in Russian patients ($p=0.0188$). When taken into account two polymorphic loci, genotype C/C (rs12979860) – T/T (rs8099917) significantly often detected in Tyvinian patients ($p=0.0203$), this genotype is associated with more ability to get sustained virologic response.

Key words: single nucleotide polymorphisms, gene *IL28B*, hepatitis C, ethno-genetic differences.