

ИммуноГенетика
IL 28B



Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с функциями интерлейкина 28В, методом полимеразной цепной реакции (ИммуноГенетика IL28В)

Вирусный гепатит С – широко распространенное во всем мире инфекционное заболевание, вызываемое вирусом гепатита С (HCV), которым инфицировано примерно 170 млн. человек [Szabo E. et all, 2003].

После острой фазы заболевания вирус гепатита С персистирует в крови у 85-90% больных и, независимо от пути заражения, у 50-70% пациентов заболевание в дальнейшем переходит в хронический гепатит. Нередко хронический гепатит прогрессирует медленно и долгое время не имеет клинических проявлений. Однако, даже при легком хроническом гепатите С, протекающем почти бессимптомно при умеренном повышении активности аминотрансфераз и незначительном изменении печеночной ткани в первое десятилетие от инфицирования, почти у 30% больных через десятилетия развивается цирроз печени, который при хроническом гепатите С, может привести к печеночноклеточному раку [Ferenci P. at all, Perz J. F. at all, 2006, Внутренние болезни по Тинсли Р.Харрисону, 2005].



При хроническом гепатите С, прежде считавшимся неизлечимым заболеванием, современная противовирусная терапия позволяет добиться эрадикации вируса, предотвратить развитие тяжёлых осложнений хронических вирусных гепатитов (цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК)) и сохранить трудоспособность 40-60% пациентов. На протяжении многих лет в основе лечения гепатита С лежала монотерапия интерфероном альфа [Carithers R. L., Jr., Emerson S. S., 2005]. Современная противовирусная терапия представляет собой комбинированную терапию пегилированным интерфероном и рибавирином (PEG-IFN/RBV) согласно рекомендациям Американской ассоциации по изучению болезней печени (AASLD) 2009 г. и Европейской ассоциации по изучению болезней печени (EASL) 2011 г. [Craxi A., 2011]. При этом цель лечения определяется как достижение устойчивого вирусологического ответа (УВО, SVR).

Устойчивый вирусологический ответ – длительное (не менее 6 месяцев) после отмены курса противовирусной терапии отсутствие определяемого уровня вируса в крови [Ghany M. G., 2009]. УВО сопровождается нормализацией биохимических показателей, улучшением гистологической картины в печени (уменьшением индекса гистологической активности и снижением индекса фиброза), повышением качества жизни больных [Fried M. W., 2002, Schiff E. R., 2009].

Тактика противовирусной терапии ХГС определяется скоростью вирусологического ответа, так называемая «тактика определяемая ответом» (Virological response-guided therapy). В последние годы разработан метод прогнозирования ответа на терапию на основании изучения вирусной кинетики ранней стадии лечения [Marcellin P. at all, 2007, Vermehren J. at all, 2009]. Длительность курса терапии также зависит от вирусологического ответа.

Выделяют следующие варианты ответа:

- Быстрый вирусологический ответ (БВО, RVR) (авиремия на 4-й неделе лечения)
- Ранний вирусологический ответ (РВО, EVR) (оценивается на 12-й неделе лечения)
 - a. полный (пРВО, сEVR) (авиремия).
 - b. частичный (чРВО, рEVR) (снижение вирусной нагрузки более, чем на 2 Log)
- Медленный вирусологический ответ (МВО) (авиремия на 24-й неделе лечения).

Длительность лечения, необходимая для достижения УВО, определяется темпами снижения вирусной нагрузки в крови и исходными характеристиками пациента, такими как стадия фиброза, уровень вирусной нагрузки HCV, генотип HCV. Тактику ведения пациента позволяет определить результат исследования вирусной нагрузки при помощи **ПЦР «в реальном времени»**, на 4-ой, 12-ой и 24-ой неделе терапии.

Устойчивый вирусологический ответ (УВО) – надёжный критерий элиминации вируса из организма. Наличие УВО можно рассматривать как излечение. Вероятность УВО прямо пропорциональна времени исчезновения РНК ВГС в процессе лечения.

Главным прогностическим фактором успеха терапии является достижение БВО при использовании количественного метода ПЦР с чувствительностью ≤50 МЕ/мл. Достижение БВО является предиктором наступления УВО, независимо от генотипа вируса и используемых режимов лечения [Craxi A., 2011].

К сожалению, на фоне длительной противовирусной терапии (48 или 72 недели при генотипе 1 ВГС) возможно ухудшение качества жизни пациента и развитие побочных эффектов лечения: преимущественно ней-

ропсихологические расстройства (раздражительность, бессонница, снижение настроения, общая слабость и недомогание), характерно повышение температуры, снижение уровня гемоглобина, изменения функции щитовидной железы, аллопеция, сухость кожных покровов. Иногда побочные эффекты столь выражены, что лечение приходится прекратить.

Очевидно, что выявление детерминант ответа на лечение, в том числе генетических, имеет большое значение, как для врача, которому необходимы критерии прогноза эффективности лечения, так и для пациента, который перед началом проведения стандартной терапии должен быть информирован о соотношении вероятности достижения УВО и риска развития побочных действий используемых противовирусных препаратов.

В настоящее время точно установлено, что изменения в кластере генов цитокинов (IL28A, IL28B и IL29), локализованных на 19 хромосоме (19q13) человека являются основным фактором, определяющим особенности противовирусной защиты организма. Наибольшее значение имеет полиморфизм в регионе, примыкающем к гену интерлейкина 28В (IL28В) [Ge D., 2009].

Показано, что полиморфизмы IL28В определяют как вероятность самопроизвольной элиминации HCV, так и ответ на терапию интерфероном и рибавирином.

Основную роль при инфицировании гепатитом С играют две однонуклеотидные замены:

- замена цитозина на тимин (C>T), имеющая обозначение **rs12979860** в базе данных dbSNP национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI).
- замена тимина на гуанин (T>G), имеющая обозначение **rs8099917**

У носителей генотипа **rs12979860 C/C** наблюдается повышение в два раза вероятности положительного ответа на лечение интерфероном и рибавирином, как среди пациентов, европейского происхождения ($p = 1,06 \cdot 10^{-25}$), так и афро-американцев ($p = 2,06 \cdot 10^{-3}$). При этом эффективность лечения в действительности напрямую не связана с расой или национальностью – просто афро-американцы более часто являются носителями генотипа T/T, чем европейцы и восточные азиаты. Также генотип C/C преимущественно выявляется среди людей со спонтанным разрешением инфекции, иммунная система носителей аллелей C/C более склонна самостоятельно побеждать вирус. Интересно, что при генотипе C/C вирусная нагрузка (количество вируса в крови) до лечения выше, чем у носителей аллелей T/T [Kempuraj D. at all, 2004].

Генотип **rs8099917 T/T** связан со спонтанным разрешением инфекции, независимо от лечения [Grebely J. at all, 2010].

Аллель **G** в **rs8099917** является аллелем риска, и ассоциирован с низким уровнем ответа на терапию пегилированным интерфероном и рибавирином [Grebely J. at 2009, Rauch A. at all, 2010].

Исследования по изучению роли генетического полиморфизма указанных регионов человеческого генома показали, что положительное предсказательное значение полиморфизма IL28В выше, чем других базовых характеристик – предикторов успеха терапии (индекса массы тела, возраста, стадии фиброза и вирусной нагрузки) [Stattemayer A. F. at all, 2008]. Однако, в исследованиях на больших популяциях больных ХГС [Stattemayer A. F. at all, 2011, O'Brien T. at all, 2011] с различным клиническим профилем (стадия фиброза печени от 0 до 4, исходный уровень виремии низкий и высокий) было показано, что предсказательное значение генотипа по IL28 для достижения УВО может существенно модифицироваться данными клиническими характеристиками и снижаться с 74,4% до 37,3% для пациентов с генотипом C/C. **Поэтому, по-прежнему необходимо учитывать базовые характеристики стадии болезни конкретного пациента, но в комплексе с его генетическими маркерами.**

Показано, что наибольшее значение полиморфизм IL28В имеет при инфицировании 1 субтипом HCV. На основании этого рекомендуется следующий **алгоритм обследования** при подготовке к лечению.

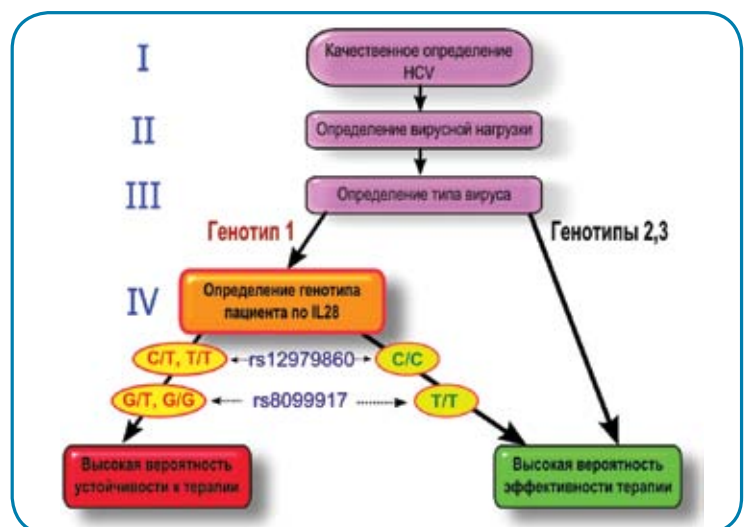


Рисунок 1. Рекомендованный алгоритм обследования перед началом терапии гепатита С.

Определение генотипа пациента по IL28B может изменить алгоритм принятия решения о лечении путем изменения длительности, как стандартного курса терапии ПЕГ ИФН/РИБ, так и длительности тройной терапии ХГС. Оптимизация терапии позволит избежать многих дополнительных проблем при лечении пациентов с высокой вероятностью положительного ответа при назначении терапии (избежать дополнительных побочных эффектов и дополнительных затрат на тройную терапию, с включением ингибиторов протеазы – теллапревира и боцепревира)

Генетические полиморфизмы, ассоциированные с устойчивостью к лечению хронического гепатита С (ХГС) интерфероном и рибавирином.

ПОЛИМОРФИЗМ: ГЕН, ЗАМЕНА [ОБОЗНАЧЕНИЕ В NCBI]	ГЕНОТИП	ВОЗМОЖНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА
IL28B C>T [rs12979860]	C/C	<ul style="list-style-type: none"> ■ Возможно спонтанное разрешение инфекции ■ Около 80% пациентов с ХГС отвечают на лечение ■ Характерна высокая вирусная нагрузка
	C/T	<ul style="list-style-type: none"> ■ 20-40% пациентов с ХГС отвечают на лечение
	T/T	<ul style="list-style-type: none"> ■ 20-25% пациентов с ХГС отвечают на лечение
IL28B T>G [rs8099917]	T/T	<ul style="list-style-type: none"> ■ Возможно спонтанное разрешение инфекции
	G/T	<ul style="list-style-type: none"> ■ Сниженный ответ на терапию интерфероном и рибавирином
	G/G	<ul style="list-style-type: none"> ■ Низкий ответ на терапию интерфероном и рибавирином

Исследования по созданию новых лекарственных средств для лечения вирусного гепатита С указывают грядущую перспективу – использование селективных противовирусных препаратов (ингибиторов протеазы и полимеразы HCV), эффективность которых не связана с изменениями в гене интерлейкина 28В. До выхода этих противовирусных препаратов на российский рынок пройдет как минимум 3-4 года, и в обозримом будущем они все равно будут применяться в комбинации с существующими лекарствами (пегилированный интерферон и рибавирин) ввиду быстро развивающейся резистентности у вируса к селективным противовирусным препаратам при монотерапии [Akuta N. et al, 2010].

Технические характеристики и состав комплектов реагентов:

Количество тестов в комплекте	48 тестов
Формат реагентов	Нераскапанный по пробиркам
Полимераза Taq АТ	2 пробирки (24 мкл)
ПЦР-буфер	2 пробирки (по 480 мкл)
Масло минеральное	2 пробирки (по 960 мкл)
Определяемые полиморфизмы	IL28B: rs12979860 C>T (1 пробирка – 960 мкл)
	IL28B: rs8099917 T>G (1 пробирка – 960 мкл)
Реагенты для выделения ДНК	ПРОБА-РАПИД – ГЕНЕТИКА ПРОБА-ГС – ГЕНЕТИКА
Дополнительные реагенты	Реагенты для контроля качества ДНК
Материал для анализа	Цельная кровь
Срок годности	6 месяцев
Температура хранения	+2 – +8 °С -20 °С (для Taq-АТ-полимеразы)

Оборудование, необходимое для проведения анализа:



Комплект реагентов предназначен для использования в лабораториях, оснащенных **детектирующими амплификаторами для ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (приборы серии ДТ)**.

Приборы **серии ДТ** оснащены специально разработанным русскоязычным программным обеспечением, поддерживающим автоматическую обработку данных и выдачу результатов исследования в удобной для интерпретации форме. Это значительно экономит время исследования и обеспечивает высокую пропускную способность лаборатории.

Кроме того, программа позволяет выдавать результаты в **удобной и наглядной форме** для анализа данных специалистами.



Показания к генетическому тестированию:

- Прогнозирование исхода заболевания и ответа на лечение
- Выбор между стандартным и пегилированным интерфероном в комбинации с рибавирином для лечения хронического гепатита С
- Выбор тактики «ожидание доступности тройной терапии с включением ингибиторов протеазы HCV» или лечение стандартной схемой двойной терапии интерфероном в комбинации с рибавирином для пациентов дополнительными факторами (кроме фиброза печени), уменьшающими вероятность излечения препаратами существующего стандарта противовирусной терапии

Дополнительные факторы, принимаемые во внимание при выборе терапевтической тактики:

Существует множество факторов, в той или иной степени влияющих на эффективность терапии и исход заболевания:

- Возраст, пол, масса тела, инсулинорезистентность
- Раса (у европейцев вероятность развития УВО в среднем в 3.1 раза выше чем у афроамериканцев)
- Фиброз (при уровне фиброза METAVIR F0-2 вероятность развития УВО в 3 раза выше, чем у пациентов с F3-4)
- Употребление алкоголя или наркотических препаратов.
- Сопутствующие заболевания и относительные и абсолютные противопоказания к лечению интерфероном или рибавирином
- Вирусная нагрузка (при вирусной нагрузке <600 000 МЕ/мл вероятность развития УВО в 4 раза выше, чем при высокой вирусной нагрузке)

Таким образом, при прогнозировании ответа на лечение альфа-интерфероном в комбинации с рибавирином необходимо учитывать негенетические факторы риска, также прогностическую ценность имеет выявление аллельных вариантов в гене IL28B.



ООО « ДНК-Технология »

Адрес: Москва, Варшавское шоссе, д. 125 Ж, корп. 6
 Тел./факс: (495) 980 4555
 mail@dna-technology.ru
 www.dna-technology.ru

