

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА E КАК ПРЕДИКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ C

О.Л. Лобанова¹, В.В. Рафальский¹, М.М. Храпцов¹, Э.В. Генерозов², А.Г. Чоговадзе²

¹ Смоленская государственная медицинская академия, Смоленск, Россия

² Научно-исследовательский институт физико-химической медицины, Москва, Россия

GENETIC POLYMORPHISMS OF APOLIPOPROTEIN E GENE AS PREDICTORS OF THE EFFICACY AND SAFETY OF ANTIVIRAL THERAPY OF CHRONIC HCV INFECTION

O.L. Lobanova¹, V.V. Rafalskiy¹, M.M. Khramtsov¹, E.V. Generozov², A.G. Chogovadze²

¹ Smolensk State Medical Academy, Smolensk, Russia

² Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

© Коллектив авторов, 2012

Изучена возможность использования данных о генетических полиморфизмах гена аполипопротеина E для прогнозирования исходов и развития нежелательных лекарственных реакций при проведении противовирусной терапии у пациентов с хроническим гепатитом C. В исследование были включены 52 пациента с хроническим гепатитом C (42 мужчины и 10 женщин, средний возраст $34 \pm 7,3$ года), получавших комбинированную терапию пег-ИФН + рибавирин. Генотипирование проводили методом MALDI TOF-минисеквенирования. Установлено, что наиболее распространенным генотипом у пациентов с HCV-инфекцией является генотип ApoE (3/3). Не установлено корреляции между выявлением у пациентов с HCV-инфекцией отдельных генотипов ApoE и эффективностью противовирусной терапии пегилированными интерферонами в сочетании с рибавирином. Выявлена достоверная корреляция между встречаемостью отдельных генотипов ApoE и развитием некоторых нежелательных реакций ПВТ – снижением массы тела (ApoE (2\3), развитием аллергического дерматита (ApoE (2\3), возникновением тромбоцитопении (ApoE (2/3).

Ключевые слова: хронический гепатит C, аполипопротеин E, предикторы эффективности противовирусной терапии, генетические полиморфизмы.

To investigate the possibility to use the identification of genetic polymorphisms of apolipoprotein E (ApoE) gene in patients with chronic HCV infections for prediction of efficacy and safety of antiviral therapy. Fifty-two patients with chronic hepatitis C (42 men and 10 women, mean age 34 ± 7.3 years old) treated by combined therapy peg-interferon + ribavirin took part in the research. Genetic typing was done by MALDI TOF minisequencing method. We did not find any significant differences in reaching of SVR among patients with different genotypes of ApoE. Determination of some genetic polymorphisms of apolipoprotein E (ApoE) gene in patients with chronic HCV infections can be useful for prediction of some adverse drug reactions but not an efficacy of antiviral therapy. Weight loss during antiviral therapy appeared more often in patients with ApoE (2/3) and none in patients with genotype of ApoE (3/3). During antiviral therapy allergic dermatitis and thrombocytopenia develop more often in patients with ApoE (2/3).

Key words: chronic hepatitis C, apolipoprotein E, prediction of efficacy and safety of antiviral therapy, genetic polymorphisms.

Введение

Хронический гепатит C (ХГС) по своей медицинской и социально-экономической значимости занимает одно из ведущих мест среди заболеваний человека [2, 11, 12]. В мире насчитывается свыше 170 млн человек, инфицированных вирусом гепатита C. Россия входит в число

стран с самым высоким уровнем распространения этого заболевания [1, 6]. В последнее десятилетие в терапии больных с ХГС достигнуты значительные успехи, в то же время существующие методы лечения не позволяют достичь вирусологического ответа у всех пациентов. В этой связи особую ценность приобретает

информация о наличии предикторов, предопределяющих успех противовирусной терапии.

В настоящее время изучается ряд аллельных полиморфизмов, предположительно влияющих на результаты противовирусной терапии ХГС [9]. В частности, предположительно ген ApoE расценивается как один из генов-кандидатов, полиморфизм которого оказывает влияние на течение ХГС [7].

Цель исследования: изучить возможность использования данных о генетических полиморфизмах гена ApoE для прогнозирования исходов противовирусной терапии у пациентов с ХГС.

Материалы и методы

В исследование были включены 52 пациента с подтверждённым диагнозом ХГС, получавших комбинированную терапию пегилированными интерферонами (пег-ИФН) в сочетании с рибавирином. Пациенты включались в исследование после получения письменного информированного согласия. Диагноз ХГС подтверждался данными клинико-эпидемиологического анамнеза, инструментального (ультразвукового), морфологического (исследования биоптата печени), серологического (определения анти-HCV и антител (АТ) к NS3, NS5 HCV методом ИФА) и генетического (полимеразная цепная реакция (Roche TagMan HCV Test, detection limit = 20 IU/mL) методов исследования).

Вирусологическая эффективность оценивалась спустя 24 недели после окончания противовирусной терапии – наличие вирусологического ответа определялось как неопределяемый уровень HCV RNA в крови. Для гистологического исследования печени использовали биопсийный фрагмент печеночной паренхимы. Оценка ИГА проводилась согласно системе Knodell [5].

Генотипирование проводилось с использованием метода MALDI TOF-минисеквенирования, который выполнялся в 5 этапов:

1. Выделение геномной ДНК пациента из цельной крови, обработанной ЭДТА.

2. ПЦР – амплификация участка генома, содержащего исследуемый SNP.

3. Дефосфорелирование дезоксинуклеотидтрифосфатов, не задействованных в ходе ПЦР-амплификации.

4. Реакция минисеквенирования – достройка олигонуклеотидного зонда на 1–2 нуклеотида, в зависимости от аллельного состояния исследуемого SNP.

5. Очистка и последующий анализ продуктов реакции с помощью MALDI TOF масс-спектрометра.

Выделение ДНК проводилось с помощью коммерческого набора «Wizard® Genomic DNA Purification Kit» (Promega®, USA), как было описано ранее [8].

Расчёт статистических данных выполнен программой Microsoft Excel 2007. В статистическом анализе вычислялись следующие параметры: минимум, максимум, среднее значение. Для сравнения средних значений двух зависимых образцов применяли парный t-тест или χ^2 -тест.

Результаты и их обсуждение

Обследованы 52 больных с ХГС, получивших курс комбинированной противовирусной терапии пегилированными интерферонами в сочетании с рибавирином – 38 пациентов (73,1%) пролечены пег-ИФН α 2а (Пегасис, Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд) в сочетании с рибавирином (Копегус, Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд) и 14 (26,9%) – пег-ИФН α 2в (ПегИнtron, Шеринг-Плау) в сочетании с рибавирином (Ребетол, Шеринг-Плау). Обследованы 42 мужчины (80,8%) и 10 женщин (19,2%). Средний возраст пациентов – 34 (\pm 7,3) года.

Распределение генотипов ApoE и частота их выявления приведены в табл. 1. Наиболее распространённым генотипом являлся ApoE (3/3) (63,5%), что совпадает с данными литературы [4]. На втором месте по частоте встречаемости находится ApoE (3/4) – 19,2%, ApoE (2/3) определялся в 13,5% случаев. Генотипы ApoE (2/4) и ApoE (4/4) определялись с одинаковой частотой (в 1,9 % случаев). Частота встречаемости генотипа ApoE (3/3) среди мужчин и женщин составила 70% и 61,8%, генотипа ApoE(2\3) – 10% и 14,3%, ApoE (3\4) 20% и 19,1%, соответственно. Генотипы ApoE (2\4) и (4\4) были представлены только у мужчин. Как видно из таблицы 1, при распределении генотипов среди мужчин и женщин не было выявлено достоверных различий.

В таблице 2 представлена частота возникновения СВО у пациентов с различными генотипами ApoE. Результаты проведенного анализа распределения частот встречаемости полиморфизма гена ApoE в исследуемых группах не выявили достоверных различий в формировании стойкого вирусологического ответа у пациентов с различными генотипами ApoE. Наиболее часто при всех вариантах HCV-инфекции СВО был достигнут при генотипах ApoE (3/3), ApoE (3\4) и

АпоЕ (2\3) – 87,9%, 80,0% и 71,4% соответственно. При анализе частоты возникновения СВО у пациентов с 1 генотипом HCV были получены сходные результаты: наиболее часто (в 87,5%) случаев СВО регистрировался у пациентов с генотипом АпоЕ (3\3), что совпадает с такими же результатами при анализе других генотипов

HCV-инфекции. На втором месте находится генотип АпоЕ(3\4), при котором СВО регистрируется в 75% случаев. Реже (в 66,7%) такой результат наблюдается при генотипе АпоЕ(2\3). СВО у пациентов с АпоЕ (2\4) и АпоЕ (4\4) не анализировался как в целом, так и при 1 генотипе, в связи с малым числом пациентов.

Таблица 1

Частота встречаемости генотипов АпоЕ в исследуемой группе

Генотип	Абсолютное число (n)	Частота встречаемости (%)	Женщины n/N (%)	Мужчины n/N (%)	p	χ^2
АпоЕ(3\3)	33	63,5	7/10 (70)	26/42 (61,8)	0,729	0,013
АпоЕ(3\4)	10	19,2	2/10 (20)	8/42 (19,1)	1,000	0,010
АпоЕ(2\3)	7	13,5	1/10 (10)	6/42 (14,3)	1,000	0,127
АпоЕ(2\4)	1	1,9	0/10 (0)	1/42 (2,4)	1,000	0,243
АпоЕ(4\4)	1	1,9	0/10 (0)	1/42 (2,4)	1,000	0,243
Итого	52	100	10 (100)	42 (100)		

Примечание: P – вероятность «0» гипотезы; χ^2 – критерий хи-квадрат.

Таблица 2

Частота возникновения СВО у пациентов с различными генотипами АпоЕ

Генотип	Все генотипы HCV					1 генотип HCV				
	СВО + n/N (%)	СВО – n/N (%)	p	χ^2	Итого n (%)	СВО + n/N (%)	СВО – n/N (%)	p	χ^2	Итого n (%)
АпоЕ(3\3)	29/33 (87,9)	4/33 (12,1)	0,260	0,851	33 (100)	21/24 (87,5)	3/24 (12,5)	0,229	1,100	24 (100)
АпоЕ(3\4)	8/10 (80,0)	2/10 (20,0)	1,000	0,063	10 (100)	6/8 (75)	2/8 (25)	0,650	0,156	8 (100)
АпоЕ(2\3)	5/7 (71,4)	2/7 (28,6)	0,590	0,096	7 (100)	4/6 (66,7)	2/6 (33,3)	0,580	0,110	6 (100)
АпоЕ(4\4)	1/1 (100)	0/1(0)	1,000	0,213	1 (100)	1/1 (100)	0/1 (0)	1,000	0,256	1 (100)
АпоЕ(2\4)	0/1(0)	1/1 (100)	0,173	0,761	1 (100)	0/1 (0)	1/1 (100)	0,200	0,577	1 (100)

Примечание: P – вероятность «0» гипотезы; χ^2 – критерий хи-квадрат.

Помимо оценки эффективности противовирусной терапии, проводилось изучение ряда параметров безопасности. Исследовались нежелательные лекарственные реакции (НЛР) со стороны показателей периферической крови: лейкопения, нейтропения, тромбоцитопения, анемия. Данные показатели учитывались с учётом степени выраженности, продолжительности и периода возникновения в зависимости от сроков терапии. В частности, было выявлено, что у пациентов с генотипом АпоЕ (2/3) тромбоцитопения достоверно чаще возникала на поздних сроках проведения противовирусной терапии ($p < 0,05$). При анализе взаимосвязи времени появления нежелательных гематологических проявлений с различными генотипами АпоЕ достоверных данных получено не было. При наиболее распространённом генотипе АпоЕ (3/3) тромбоцитопения наиболее часто возникала на ранних этапах лечения (18,9%) ($p > 0,05$). У пациентов

с генотипом АпоЕ (2/3) не было отмечено случаев возникновения тромбоцитопении на первых неделях терапии. Иных достоверных различий между степенью выраженности гематологических изменений и генотипом АпоЕ выявлено не было.

Кроме гематологических изменений, оценивались также и другие нежелательные лекарственные реакции, включающие в себя развитие гриппоподобного синдрома, местные изменения в местах инъекций, развитие микозов, аллергического дерматита, кожного зуда, бактериальные осложнения, развитие функциональных изменений со стороны щитовидной железы, артралгии, депрессия, выпадение волос, изменение концентрации глюкозы во время лечения, снижение массы тела. Так, достоверно выяснено, что у пациентов с генотипом АпоЕ (2/3) в 28,6% случаев развивался аллергический дерматит ($p < 0,05$). Снижение массы тела на протяжении

проведения ПВТ не было зарегистрировано ни у одного пациента с генотипом АпоЕ (3/3) ($p < 0,05$), в то же время при генотипе АпоЕ (2/3) в 42,9% случаев было выявлено достоверное снижение массы тела ($p < 0,05$). Иных достоверных взаимосвязей между генотипами АпоЕ и частотой, длительностью и степенью выраженности нежелательных лекарственных реакций выявлено не было. Основные достоверные показатели безопасности ПВТ в зависимости от наличия различных генотипов АпоЕ представлены на таблице 3.

Данное исследование проводилось с целью изучения возможности использования данных о генетических полиморфизмах гена АпоЕ для прогнозирования исходов противовирусной терапии у пациентов с хроническим гепатитом С.

Генотип АпоЕ (3/3), по данным литературы, [4] является самым распространённым, что совпадает с результатами нашего исследования, подтверждающими наличие генотипа АпоЕ (3/3) у 63,5% обследованных пациентов. Генотип АпоЕ (3/3) является наиболее общим, поскольку Апо Е3 считается «родительской» формой белка в различных популяциях [10]. В нашем исследовании лица с генотипом АпоЕ (3/3) составляли, как уже было указано ранее, 63,5%. Полученные данные позволяют предположить, что аллель $\epsilon 3$ является предиктором для персистенции вируса в организме, в то время как аллели $\epsilon 2$, $\epsilon 4$ снижают вероятность хронизации инфекции. Считается, что аллель $\epsilon 4$ проявляет протективные свойства при HCV-инфекции [13]. Возможно, это связано с аминокислотной последовательностью аполипопротеина Е. Согласно данным литературы, АроЕ3

в положении 112 имеет аминокислоту цистеин, который является единственным цистеином во всей аминокислотной последовательности. У АроЕ4 в этом положении находится аргинин. Данное замещение нейтральной аминокислоты на основную являются причиной различий в заряде, который у АроЕ2 равен 0, у АроЕ3 – +1 и у АроЕ4 – +2. Изоэлектрические точки у этих форм, соответственно, равны 5,89; 6,02 и 6,18 [3]. Исходя из этого, предполагается, что именно изоформа АроЕ3 легче проникает через мембрану клеток, имея более высокое сродство к рецепторам гепатоцитов, тем самым облегчая проникновение вируса внутрь клеток [7]. Вторым по частоте встречаемости генотипом в нашем исследовании является генотип АпоЕ (3/4). Его доля составляет 19,2%. На третьем месте находится генотип АпоЕ (2/3), доля которого составляет 13,5%. На долю генотипов АпоЕ (4/4) и АпоЕ (2/4) приходится по 1,9%.

При анализе распределения частот встречаемости полиморфизма гена АроЕ не было выявлено достоверных различий в зависимости от половой принадлежности. Так, генотип АпоЕ (3/3) встречался у 70% женщин и у 61,8% мужчин, на втором месте находится генотип АпоЕ (3/4), который определён у 20% женщин и 19,1% мужчин. На третьем месте по частоте встречаемости находится генотип АпоЕ (2/3). Он был зарегистрирован у 10% женщин и 20% мужчин. Генотипы АпоЕ (2/4) и АпоЕ (4/4) были определены только у мужчин.

При анализе взаимосвязи между формированием СВО и генотипом АпоЕ не было выявлено достоверных различий. Однако имелась тенденция к более частому формированию СВО

Таблица 3

Частота возникновения НЛР у пациентов с различными генотипами АпоЕ

Генотип	Признак							
	Снижение массы п/N (%)		Аллергический дерматит п/N (%)		Возникновение тромбоцитопении на 25–48 неделе п/N (%)		Лейкопения умеренной степени п/N (%)	
	+	–	+	–	+	–	+	–
АпоЕ(3/3)	0/33 (0) ⁽¹⁾	33/33 (100)	1/33 (3)	32/33 (97)	1/33 (3)	32/33 (97)	0/33 (0)	33/33 (100)
АпоЕ(3/4)	2/10 (20)	8/10 (80)	0/10 (0)	10/10 (100)	0/10 (0)	10/10 (100)	0/10 (0)	10/10 (100)
АпоЕ(2/3)	3/7 (42,9) ⁽²⁾	4/7 (57,1)	2/7 (28,6) ⁽³⁾	5/7 (71,4)	2/7 (28,6) ⁽⁴⁾	5/7 (71,4)	0/7 (0)	7/7 (100)
АпоЕ(4/4)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	1/1 (100)	1/1 (100)	0/1 (0)
АпоЕ(2/4)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	1/1 (100)

Примечание: Р – вероятность «0» гипотезы, χ^2 – критерий хи-квадрат; ⁽¹⁾ – $p \leq 0,05$, $\chi^2 = 6,819$; ⁽²⁾ – $p \leq 0,05$, $\chi^2 = 6,340$; ⁽³⁾ – $p \leq 0,05$, $\chi^2 = 7,736$; ⁽⁴⁾ – $p \leq 0,05$, $\chi^2 = 7,736$.

(87,9%) при генотипе АпоЕ (3/3) по сравнению с формированием СВО при других генотипах АпоЕ. При генотипе АпоЕ (3/3) СВО формировался в 87,9%. При генотипе АпоЕ (3/4) – в 80,0%, при генотипе АпоЕ (2/3) – в 71,4%. У одного больного с генотипом АпоЕ (4/4) было отмечено формирование СВО. Генотип АпоЕ (2/4) также был зафиксирован у одного больного, у которого СВО зарегистрирован не был.

Анализ частоты возникновения НЛР, в зависимости от генотипа АпоЕ показал, что при генотипе АпоЕ (3/3) не было зафиксировано ни одного случая снижения массы тела ($p \leq 0,05$). В то же время при генотипе АпоЕ (2/3) практически в половине случаев (42,9%) отмечалось снижение массы тела, возникшее на фоне противовирусной терапии. Достоверно выяснено, что аллергический дерматит наиболее часто (в 28,6%) случаев проявляется у пациентов с генотипом АпоЕ (2/3) ($p < 0,05$). Лейкопения умеренной степени выраженности наиболее часто встречалась у пациентов с генотипом АпоЕ (4/4) ($p < 0,05$), тромбоцитопения на поздних сроках противовирусной терапии достоверно чаще регистрировалась у пациентов с генотипом АпоЕ (2/3) ($p < 0,05$). Как уже было сказано выше, генотипы АпоЕ (4/4) и АпоЕ (2/4) были определены только в единичных случаях.

Выводы

1. Наиболее распространенным генотипом у пациентов с HCV-инфекцией является генотип АпоЕ (3/3).

2. Не установлено корреляции между выявлением у пациентов с HCV инфекцией отдельных генотипов АпоЕ и эффективностью противовирусной терапии пегилированными интерферонами в сочетании с рибавирином.

3. Выявлена достоверная корреляция между частотой выявления отдельных генотипов АпоЕ и развитием некоторых нежелательных реакций ПВТ – снижением массы тела (АпоЕ (2/3)), развитием аллергического дерматита (АпоЕ (2/3)), возникновением тромбоцитопении (АпоЕ (2/3)).

4. Определение предикторов развития нежелательных лекарственных реакций имеет важное клиническое значение и позволяет оценить степень выраженности НЛР и время их возникновения ещё до начала проведения противовирусной терапии.

Литература

1. *Ивкова, А.Н.* Роль цитокинов в развитии фиброза печени / А.Н. Ивкова [и др.] // Клинич. перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2006. – № 1. – С. 2–9.

2. *Катикова, О.Ю.* Болезни печени в пожилом возрасте: клинические проявления, особенности патогенеза, лечение / Катикова О.Ю. // Клини. геронтол. – 2004. – № 7. – С. 22–27.

3. *Коровайцева, Г.И.* Генетическая ассоциация между аллелями гена аполипопротеина Е и различными формами болезни Альцгеймера / Г.И. Коровайцева [и др.] // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 4. – С. 529–535.

4. *Костюк, И.Ф.* Метаболические аспекты атеросклероза / И.Ф. Костюк [и др.] // Вестник СумДУ. – 2009. – Т. 2, № 2.

5. *Павлов, Ч.С.* Современные возможности эластометрии, фибро- и акти-теста в диагностике фиброза печени / Ч.С. Павлов [и др.] // РЖГГК. – 2008. – Т. 18, № 4. – С. 43–52.

6. *Полунина, Т.Е.* Алгоритмы диагностики и лечения хронического гепатита С / Т.Е. Полунина, И.В. Маев // Мед. совет. – 2009. – № 1.

7. *Семёнова, Н.А.* Функциональная значимость полиморфизма генов АпоЕ и SOD2 в формировании хронической HCV-инфекции / Н.А. Семёнова, Н.В. Рязанцева // Бюллетень сибирской мед. – 2009. – № 3 – С. 64–69.

8. *Третьяков, В.* Генетическая паспортизация населения – новая технология профилактики и реабилитации в медицине / В. Третьяков [и др.] // Эстетическая мед. – 2008. – Т. VII, № 2. – С. 165–180.

9. *Bataller, R.* Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal / R. Bataller [et al.] // Hepatology. – 2003. – № 37(3). – P. 493–503.

10. *Kesaniemi, Y.A.* Intestinal cholesterol absorption efficiency is related to apolipoprotein E phenotype / Y.A. Kesaniemi [et al.] // J. Clin. Invest. – 1987. – Vol. 80. – P. 578–581.

11. *Marcellin, P.* Fibrosis and disease progression in hepatitis C / P. Marcellin [et al.] // Hepatology. – 2002. – Vol. 36 (suppl. 1). – P. 47–57.

12. *Marcellin, P.* Chronic hepatitis C / P. Marcellin, I.P. Benhamou ; Eds. I.G. Bouer, R.K. Ockneze // Progress in liver diseases – N.-Y., 1995. – Vol. B. – P. 39–49.

13. *Sazci, A.* Association of Apolipoprotein E Polymorphisms in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis / A. Sazci [et al.] // Dig. Dis. Sci. – 2008. – V. 53. – P. 218–224.

О.Л. Лобанова

e-mail: lobanova2006@mail.ru