

**ГЕНОТИПЫ ВИРУСА ГЕПАТИТА С (HCV) И НУКЛЕОТИДНАЯ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЛОКУСА NS3 HCV,
ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНТЕРФЕРОНОТЕРАПИИ**

Мицура В. М., Воропаев Е. В., Баранов О. Ю., ¹Ковалева Т. А.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

¹Учреждение здравоохранения

«Витебская областная инфекционная клиническая больница»

г. Витебск, Республика Беларусь

Введение

Одной из основных причин развития хронических поражений печени является гепатит С-вирусная инфекция (HCV-инфекция), т. к. у 50–75 % инфицированных людей, в конечном итоге, возникает хронический гепатит С (ХГС) [1].

Согласно принятой в настоящее время номенклатуре, выделяют, по крайней мере, 6 больших групп (генотипов), внутри генотипов выделяют подтипы (описано более 100) [1]. Генотипы HCV были пронумерованы от 1 до 6 в порядке их открытия. В Беларуси преобладают 1 и 3 генотипы HCV. Считается, что больные, инфицированные генотипом HCV 1b, имеют более тяжелое течение инфекции и хуже отвечают на лечение препаратами альфа-интерферона [2]. Снижение вирусной нагрузки в 100 раз и более после 12 недель терапии интерфероном (ИФН) считается хорошим прогностическим признаком ответа на лечение [2].

Роль факторов вируса в развитии устойчивости к лечению препаратами альфа-ИФН изучена еще крайне недостаточно. Известны мутации в гипервариабельном регионе гена NS₅, определяющие резистентность к препаратам интерферона, так называемый ISDR (Interferon-Sensitivity Determining Region) [1]. В то же время значение мутаций в других регионах генома HCV окончательно не выяснено. Имеются сообщения о возможной роли мутаций в гене NS₃ протеазы HCV 1b генотипа в развитии резистентности к ИФН [3]. Существует также мнение, что гетерогенность NS₃ региона HCV может использоваться для прогноза прогрессирования ХГС в цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному [4]. Секвенирование генома HCV в области NS₃ привлекает внимание исследователей для разработки новых препаратов для целевой (таргетной) терапии ХГС [5].

Цель исследования: изучение генотипов HCV, нуклеотидной последовательности гена NS₃ вируса гепатита С, их влияние на эффективность интерферонотерапии.

Материалы и методы

Обследовано 94 больных ХГС, находившихся на лечении препаратами альфа-интерферона в Гомельской областной инфекционной клинической больнице в 2006–2009 годах. Среди обследованных больных 59 (62,8 %) мужчин и 35 (37,2 %) женщин. Возраст больных колебался от 12 до 60 лет, средний возраст $31,5 \pm 1,2$ года. У 5 больных ХГС был в стадии компенсированного цирроза печени. Генотип HCV определялся методом ПЦР с помощью тест-систем фирмы «Амплисенс». Для анализа структуры HCV-NS₃ использовались РНК, выделенные из сывороток больных вирусным гепатитом С на первых этапах обследования с использованием наборов Рибо-Сорб фирмы «Амплисенс» и переведенных затем в кДНК с помощью стандартной реакции обратной транскрипции на реагентах фирмы Амплисенс (Реверта-L) согласно инструкции производителя. Амплификацию проводили, используя амплификатор- Palm Cycler фирмы «Corbett Research» (Австралия). Нами был применен гнездовой (Nested) вариант ПЦР и, полученные в результате двух ПЦР ампликоны, были использованы для проведения дальнейшей реакции секвенирования.

Для очистки полученного в результате ПЦР-продукта использовали инновационный набор фирмы «Fermentas-GeneJet PCR Purification Kit», согласно инструкции производителя, с учетом того, что длина ампликона менее 50 п.н. при очистке ПЦР продукта использовали дополнительный этап очистки с помощью изопропилового спирта. Высушенный осадок полученной ДНК растворяли в 20 мкл бидистиллированной и деионизированной воды во встряхивающей ванне (200 мин^{-1}) при 40°C в течение 30 мин. Растворенную ДНК хранили при -20°C для последующего секвенирования. Для секвенирования использовали метод терминации цепи или метод Сэнжэра, основанный на применении дидеооксинуклеотидтрифосфатов. Секвенирующую ПЦР проводили в специальных полипропиленовых тонкостенных пробирках, объемом 200 мкл. В ходе исследований была использована реакционная смесь с использованием BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit. После проведения секвенирующей ПЦР проводили очистку продуктов от непрореагировавших дидеооксинуклеотидтрифосфатов, деооксинуклеотидтрифосфатов, праймеров.

Статистическая обработка полученных данных проводилась на персональном компьютере с помощью программ «MS Excel 2002» и «STATISTICA v.6.0». Использовались критерий χ^2 и точный критерий Фишера для сравнения частот в квадратах 2×2 . Для описания данных применялись медиана и 25–75 перцентили — интерквартильный размах (ИQR).

Проанализирована встречаемость различных генотипов HCV у 94 больных ХГС, из них генотип 1b выявлен у 49 (52,1 %), 1a — у 2 (2,1 %), 3a — у 34 (36,2 %), 2a — у 5 (5,3 %), два генотипа 1b+3a — у 1 (1,1 %), 2a+3a — у 2 (2,1 %), три генотипа 1b+2a+3a — у 1 пациента (1,1 %). В зависимости от генотипа HCV больные разделены на 2 группы. В группу 1 включены 53 пациента с 1 генотипом HCV, сюда же отнесены смешанные генотипы 1b+3a и 1b+2a+3a. В группу 2 отнесен 41 пациент с не-1 (2 или 3 генотипом HCV, а также микстом 2a+3a).

Среди 53 лиц с генотипом 1 мужчин было 40 (75,5 %), женщин — 13 (24,5 %), а среди 41 пациента с генотипами 2 и 3 — 19 (46,3 %) и 22 (53,7 %) соответственно. При сравнении частот с помощью критерия χ^2 выявлены значимые различия по полу в зависимости от генотипа HCV ($\chi^2=8,39$; $p=0,004$).

Оценивались результаты лечения препаратами альфа-интерферона (ранний вирусологический ответ, РВО, стойкий вирусологический ответ, СВО). Всего РВО оценивался у 94 больных, а СВО — у 70. Для оценки влияния различных факторов (генотип HCV, вирусная нагрузка) на эффективность терапии использовалось отношение шансов (ОШ) и его 95 % доверительный интервал (ДИ). РВО имелся у 23 из 53 человек (43,4 %) с 1 генотипом HCV, и у 29 из 41 пациента (70,7 %) — с не-1 генотипом (ОШ 3,15; 95% ДИ 1,32–7,48; $p=0,008$). СВО имелся у 10 из 44 (22,7 %) пациентов с генотипом 1, и у 15 из 26 (57,7 %) пациентов — с не-1 генотипом (ОШ 4,64; 95% ДИ 1,62–13,25; $p=0,003$). Изучались нуклеотидные последовательности NS3 гена HCV вируса гепатита С 1b и 3 генотипов, выделенные от пациентов с ХГС, получающих терапию препаратами альфа-интерферона. Изучалась нуклеотидная последовательность NS3 гена HCV.

Идентификация изолятов была проведена с помощью программы «BLAST» в базе данных NCBI и HCV Sequence Database, на основании анализа полученных нуклеотидных последовательностей для каждого из образцов. Образцы 1, 2, 3, 4, 5, 7 были идентифицированы как 1b субтип, образец 6 — как 3a. Для сравнения образцов был также использован типичный вариант генома 1b субтипа HCV вируса из базы данных NCBI («Consensus»). Изучались нуклеотидные последовательности локуса HCV NS3 7 изолятов HCV вируса, выделенных из больных хроническим гепатитом С. Больные (2 мужчин и 5 женщин) были в возрасте от 15 до 52 лет (медиана 39 лет). Образцы крови были взяты у обследованных больных до начала курса интерферонотерапии. У двух больных (изо-

ленты 4 и 7) курс терапии был прерван из-за неэффективности терапии (отсутствие раннего вирусологического ответа), остальные пациенты продолжают курс лечения. Образец 3 не удалось секвенировать полностью, и из дальнейшего анализа он был исключен. Образец 6 обладает наибольшими отличиями от всех образцов, что указывает на его генетическую обособленность от других образцов.

Кроме того, среди изолятов 1b субтипа также были выявлены генетические различия. По результатам сравнительного анализа всех образцов, на основании метода UPGMA (невзвешенного парногруппового анализа), была построена дендрограмма, отражающая степень генетической дифференциации между проанализированными образцами (рисунок 1). Исходя из полученных результатов, наибольшими различиями обладает образец № 6 — 3a субтип, что согласуется с существующей системой классификации HCV вирусов.

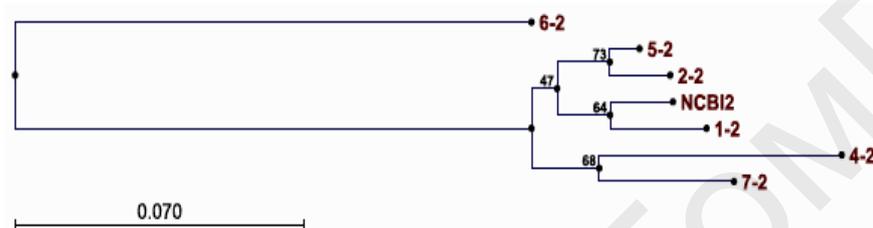


Рисунок 1 — Дендрограмма, иллюстрирующая степень генетической дифференциации между проанализированными образцами

Также следует отметить, что изоляты 1b субтипа разделились на два кластера, один из них включает два субкластера с образцами № 5, 2, 1. Альтернативный кластер представлен образцами № 4 и 7. Следует отметить, что данные образцы характеризуются устойчивостью к интерферонотерапии. Таким образом, можно сделать вывод, устойчивость вируса к данному типу препаратов в определенной степени зависит от его генотипа.

На рисунке 2 представлен один из выявленных вариантов однонуклеотидного полиморфизма (SNP), характерного для группы интерферонустойчивых изолятов.

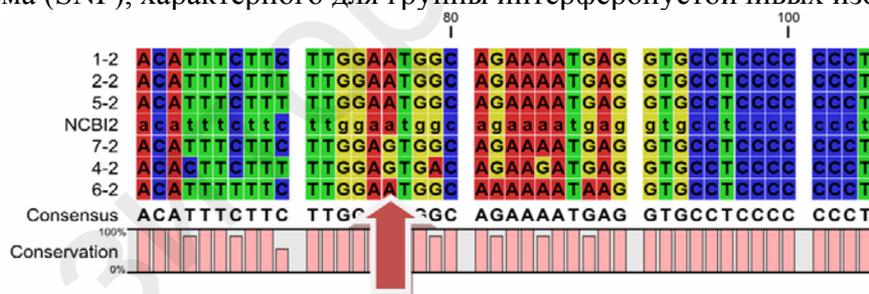


Рисунок 2 — Нуклеотидная последовательность участка NS3 гена HCV у 6 больных с ХГС

В ходе проведенного секвенирования были определены нуклеотидные последовательности 6 изолятов HCV вируса, выделенных от больных ХГС. Все 6 изученных изолятов характеризовались уникальным генотипом, что указывает на их принадлежность к различным штаммам. Анализ уровня генетической дифференциации выявил наличие двух наиболее генетически различающихся групп. Группы разделились по ответу к интерферону. Выявленные особенности в структуре генотипа, позволяют разработать методику ранней диагностики прогноза по интерферонотерапии.

Наиболее часто у пациентов с хроническим гепатитом С выявляются 1 генотип HCV (54,2 %) и генотип 3 (36,2 %), у части больных (4,3 %) выявлялись смешанные генотипы HCV. У мужчин генотип 1 HCV встречается чаще, чем у женщин ($p = 0,004$). У лиц с не-1 генотипом HCV ранний вирусологический ответ и стойкий вирусологический ответ отмечались чаще, чем у лиц с 1 генотипом (ОШ 3,15; $p = 0,008$, и ОШ 4,64; $p = 0,003$ соответственно).

Проведено секвенирование гена NS3 семи изолятов HCV, выделенных от больных ХГС. Было установлено, что 6 изолятов принадлежат генотипу 1b, а один – генотипу 3a. При анализе уровня генетической дифференциации выявлено наличие двух генетически различающихся групп, разделившихся по чувствительности к интерферону. Определение мутаций в локусе NS3 HCV требует дальнейшего изучения для прогноза эффективности интерферонотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лечение вирусных гепатитов / А. А. Ключарева [и др.]; под ред. А. А. Ключаревой. — Мн. : ДокторДизайн, 2003. — 216 с.
2. Шахгильдян, И. В. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика) / И. В. Шахгильдян, М. И. Михайлов, Г. Г. Онищенко. — М. : ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2003. — 384 з. Genetic diversity and response to IFN of the NS3 protease gene from clinical strains of the hepatitis C virus / C. A. Holland-Staley [et al.] // Arch Virol. — 2002. — Vol. 147. — P. 1385–1406.
4. Is hepatitis C virus NS3 protease quasispecies heterogeneity predictive of progression from cirrhosis to hepatocellular carcinoma? / S. Vallet [et al.] // Journal of Viral Hepatitis. — 2007. — Vol. 14. — P. 96–106.
5. Thompson, A. J. V. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C) // A. J. V. Thompson, J. G. McHutchison // Journal of Viral Hepatitis. — 2009. — Vol. 16. — P. 377–387.

УДК 616.89–008.441.35:616.36–002

АЛКОГОЛЬНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С В ИНФЕКЦИОННОМ СТАЦИОНАРЕ

Мицура В. М., Сквиря И. М.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

В поле зрения психиатра-нарколога большинство пациентов с алкогольной зависимостью попадают на этапах развернутой стадии болезни, когда из-за алкоголизма уже возникают серьезные социальные, семейные или клинические (эпиприпадки, психозы) проблемы. В то же время, накопленные научные знания позволяют диагностировать злоупотребление и алкогольную зависимость на ранних этапах развития болезни [1]. Для скрининга на наличие зависимости от алкоголя в мире используются опросники, такие как «CAGE» [4] или «MAST» (Michigan Alcohol Screening Test), впервые предложенный М. L. Selzer в 1971 году. Сочетание хронических вирусных гепатитов и систематического употребления алкоголя в значительной степени отягощает состояние больного и ухудшает прогноз, усиливает риск раннего развития осложнений проблемы [1, 2]. Есть данные, что пациенты с хроническим гепатитом С (ХГС), употребляющие значительные дозы алкоголя, имеют более выраженные поражения печени, и повышенный риск развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [2, 3]. Цель исследования — изучить зависимость среди больных хроническим гепатитом С, изучение их клинико-лабораторных показателей, разработка алгоритма ведения таких больных.

Материалы и методы

Было обследовано 127 пациентов с хроническим гепатитом С (85 мужчин и 42 женщины) в возрасте от 22 до 78 лет (средний возраст $44,4 \pm 1,2$ года), находившихся на лечении в отделении хронических вирусных гепатитов Гомельской областной инфекционной клинической больницы. У 41 пациента (32,3 %) имелись признаки цирроза печени. Учитывался прогностический класс цирроза по шкале Чайлд-Пью. Класс А выявлен у 11 больных (26,8 %), В — у 17 (41,5 %), класс С установлен у 13 больных (31,7 %). Скрининг алкогольной зависимости проводился с использованием тестов «CAGE» (3 или 4 балла) и MAST (6 и более баллов). Статистическая обработка данных проводилась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, различия долей — с помощью критерия Фишера.

Результаты исследования

Пациенты опрашивались об употреблении ими алкоголя в приемном покое и в отделении. При возможности собирались данные алкогольного анамнеза и у родственников