

УДК 616.36-002.2+616.36-004

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА РНКАЗЫ L И ЕГО ВОЗМОЖНОЕ КЛИНИЧЕСКОЕ
ЗНАЧЕНИЕ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С**

Мицура В. М., Воропаев Е. В., Осипкина О. В., Ковалева Т. А.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Учреждение здравоохранения

«Витебская областная инфекционная клиническая больница»

г. Витебск, Республика Беларусь

Введение

При хроническом гепатите С (ХГС) прогрессирование заболевания связано преимущественно не с вирусологическими факторами, а с особенностями макроорганизма. Генетические факторы организма человека влияют на эффективность лечения ХГС, как продемонстрировали недавние исследования генома человека. Полиморфизм некоторых генов оказывает влияние на частоту развития стойкого вирусологического ответа (СВО) при лечении пациентов пегилированным интерфероном альфа и рибавирином (PegIFN/RBV), которая является во многих странах стандартом помощи пациентам с ХГС. Современные схемы противовирусной терапии позволяют достичь стойкий вирусологический ответ (СВО) в среднем у 40–50 % пациентов с 1 генотипом вируса гепатита С (HCV) и до 70–80 % среди пациентов с генотипами HCV 2 или 3 [3].

Одну из ключевых ролей в регуляции противовирусного иммунного ответа играет система интерферона. Синтез интерферониндуцируемых белков (2',5'-олигоденилатсинтетаза, РНКазы L, протеинкиназа R, аденозиндезаминаза и др.) запускает каскад реакций, приводящих к нарушению сборки вирусных частиц посредством разрушения вирусной РНК и ингибированию трансляции в зараженной клетке. Рибонуклеаза L (РНКазы L) — это эндорибонуклеаза макроорганизма, которая является ключевым компонентом врожденного клеточного иммунитета, расщепляя вирусные и клеточные одноцепочечные РНК. 5' и 3' участки РНК HCV содержат двуспиральные структуры, которые отсутствуют в мРНК клетки хозяина. Данные структуры активируют 2'-5'-олигоденилатсинтетазу, фермент, синтезирующий из АТФ 2'-5'-связанные олигоденилаты длиной от двух до тридцати молекул. 2'-5'-олигоденилаты необходимы для превращения РНКазы L из неактивной мономерной формы в активную димерную. РНКазы L локализуется в цитоплазме и ядре и расщепляет вирусную РНК в области UA и UU динуклеотидов на фрагменты длиной 200–500 п.н. [1, 5].

Клиническое значение РНКазы L для ответа на терапию ХГС интерфероном-α неизвестно. HCV первого генотипа имеет меньшее количество UA и UU сайтов рестрикции и, таким образом, более резистентен к действию РНКазы L [2]. мРНК HCV относительно интерферон-устойчивых генотипов (HCV генотипов 1a и 1b) расщепляются на меньшее количество UA и UU динуклеотидов, чем мРНК HCV более интерферон-чувствительных генотипов HCV (2a, 2b, 3a, и 3b). Эти результаты позволяют предположить, что чувствительность HCV инфекции к терапии интерфероном может коррелировать с эффективностью, с которой РНКазы L расщепляет HCV-РНК. Однако ответ или отсутствие ответа на терапию интерфероном-α не объясняется различиями в сайтах расщепления РНКазы L [4].

Таким образом, РНКазы L участвует в механизмах противовирусной защиты организма от многих вирусов, включая HCV. Поэтому представляет интерес изучить полиморфизм гена РНКазы L у пациентов с ХГС и оценить его возможное клиническое значение.

Материалы и методы исследования

С целью изучения распространенности и клинического значения мутаций в гене РНКазы L было обследовано 84 пациента с хронической HCV-инфекцией. Из них было 55 (65,5 %) мужчин и 29 (34,5%) женщин в возрасте от 16 до 75 лет (средний возраст $36,4 \pm 1,8$ лет). У 17 (20,2 %) пациентов имелись признаки цирроза печени. Для сравнения частоты вариантов полиморфизма гена РНКазы L с относительно здоровыми лицами без признаков заболевания печени или наличия маркеров вирусного гепатита нами обследовано 77 человек (контрольная группа). Частота полиморфизма гена РНКазы L в популяции Центрально-Европейского региона взята нами из базы данных GenBank, найдено исследование 226 лиц HarMap-CEU ss48422436 и 120 лиц HarMap-CEU ss6878649.

Для выявления точечной мутации гена РНКазы L 6552G > A (rs486907) был применен метод ПЦР-ПДРФ с применением технологии миссматч-праймеров. При данной технологии праймер не соответствует полностью региону отжига, что позволяет в ампликонах искусственно получать нуклеотидные последовательности с заданной структурой, отличающейся от исходного образца ДНК. В данном случае, была построена структура праймера, создающего сайт рестрикции для эндонуклеазы AvaI. Используемые праймеры были синтезированы по нашему заказу фирмой «Primetech» (Беларусь). В качестве материала для исследования использовалась ДНК, выделенная из лейкоцитов с использованием коммерческих реагентов для выделения ДНК из клинического материала «Цитолизин» фирмы «АмплиСенс» (Россия).

Для расчета 95 % доверительного интервала (95 % ДИ) использован откорректированный метод Вальда.

Результаты и их обсуждение

Из 84 пациентов у 21 (25,0 %) был выявлен «благоприятный» вариант SNP rs486907 гена РНКазы L (GG), у 49 (58,3 %) — гетерозиготное носительство (GA), у 14 (16,7 %) пациентов выявлен «неблагоприятный» вариант — гомозиготное носительство аллеля А (AA). Результаты представлены далее в таблице 1.

Таблица 1 — Полиморфизм гена РНКазы L у пациентов с ХГС, лиц контрольной группы и в двух популяциях Центрально-Европейского региона

Популяции	Полиморфизм гена РНКазы L		
	GG, % (95 %ДИ)	GA, % (95 %ДИ)	AA, % (95 %ДИ)
Пациенты с ХГС (n = 84)	25,0 (16,9–35,3)	58,3 (47,7–68,3)	16,7 (10,1–26,2)
Контрольная группа (n = 77)	39,0 (28,8–50,1)	52,0 (41,0–62,8)	9,1 (4,2–17,9)
HarMap-CEU ss48422436 (n = 226)	36,3 (30,3–42,7)	50,4 (44,0–56,9)	13,3 (9,4–18,4)
HarMap-CEU ss68786496 (n = 120)	31,7 (24,0–40,5)	55,0 (46,1–63,6)	13,3 (8,3–20,7)

Генотип GG по сравнению с иными вариантами у лиц контрольной группы встречался несколько чаще, чем у пациентов с ХГС ($\chi^2 = 3,62$; $p = 0,057$), что можно объяснить восприимчивостью лиц с мутантной аллелью гена РНКазы L к хроническому течению вирусных инфекций, в частности, HCV-инфекции. Частота нормального генотипа GG была также несколько выше в популяции HarMap-CEU ss48422436 по сравнению с пациентами с ХГС ($\chi^2 = 3,51$; $p = 0,061$), однако значимо не отличалась от контрольной группы и двух групп сравнения.

Проанализированы генотипы вируса HCV (1 или не 1) у лиц с различными вариантами гена РНКазы L вне зависимости от назначенной терапии и ее эффективности у 73 пациентов. Так, из 44 пациентов с 1 генотипом HCV у 12 был генотип GG (27 %), у 26 — GA (59 %) и у 6 — AA (14 %). Из 29 пациентов с генотипом HCV 2/3 у 6 определялся генотип GG (21 %), у 16 — GA (55 %) и у 7 — AA (24 %). Различий в частоте выявления нормального генотипа GG у лиц с 1 и не-1 генотипами вируса не обнаружено ($\chi^2 = 0,41$; $p = 0,52$).

Для исследования роли вариантов SNP гена РНКазы L в зоне rs486907 в эффективности противовирусного лечения ХГС обследовано 46 пациентов, которые получали пре-

параты интерферона и рибавирина. Из них генотип 1 HCV имели 29 человек (63,0 %), генотип 2 или 3 — 17 (37,0 %) человек. Проанализированы результаты лечения препаратами интерферона (вирусологический ответ в конце курса лечения или стойкий вирусологический ответ, СВО) у 37 пациентов с ХГС, остальные продолжают лечение. На терапию ответили 15 пациентов, у 3 из которых был выявлен «благоприятный» вариант (GG), у 7 пациентов — генотип GA, у 5 — генотип AA. Не ответили на терапию 22 пациента, из которых 4 имели генотип GG, 16 — генотип GT, 2 — генотип GG.

В группах пациентов, ответивших и не ответивших на терапию интерфероном, частота нормального генотипа GG не различалась ($p = 0,61$, точный критерий Фишера), несколько чаще выявлялся мутантный вариант AA у лиц, ответивших на терапию ($p = 0,079$, точный критерий Фишера), что не имеет однозначного толкования. Наличие «благоприятного» генотипа GG не является прогностическим фактором ответа на терапию: отношение шансов (OR, 95 % ДИ) ответа на терапию у пациентов с генотипом GG по сравнению с генотипами GA или AA: OR = 1,15 (0,24–5,54).

Чтобы оценить роль вариантов SNP rs486907 гена RNКазы L в прогрессировании заболевания при ХГС, нами проводилось сравнение частот различных генотипов у лиц с циррозом печени (быстро прогрессирующее заболевание печени) и ХГС (медленно прогрессирующее заболевание печени). Из 17 пациентов с циррозом печени у 6 (35,3 %) был генотип GG, у 9 (52,9 %) — генотип GA и у 1 (5,9 %) — генотип AA. Из 67 пациентов с ХГС генотип GG был у 15 (22,4 %), генотип GA — у 39 (58,2 %), генотип AA — у 13 (19,4 %). Различий в частоте генотипа GG у лиц с циррозом печени и ХГС не выявлено ($\chi^2 = 1,56$; $p = 0,21$).

С целью выявить возможное влияние полиморфизма гена RNКазы L на течение заболевания проводилось сравнение уровней АЛТ и вирусной нагрузки HCV у лиц с генотипом GG в сравнении с генотипами GA и AA. Значимых различий не было выявлено (тест Манна-Уитни, $p = 0,52$ и $p = 0,79$ соответственно).

Заключение

В популяции пациентов с хронической HCV-инфекцией в Гомельском регионе гомозиготное носительство мутантного аллеля A SNP rs486907 RNКазы L встречается у 16,7 %, гетерозиготное — у 58,3 %. При сравнении с контрольной группой и популяцией Центрально-Европейского региона из базы данных GenBank частота генотипа GG у лиц с ХГС была несколько ниже ($p = 0,057$ и $p = 0,061$ соответственно), что можно объяснить большей восприимчивостью лиц с мутантным аллелем гена RNКазы L к хроническому течению HCV инфекции. Различий в частоте выявления нормального генотипа GG у лиц с 1 и не-1 генотипами вируса не обнаружено. У лиц с хроническим гепатитом С и циррозом печени различий в частоте генотипа GG не выявлено ($p = 0,21$). Различия вирусной нагрузки и значений АЛТ в зависимости от генотипа SNP rs486907 также отсутствовали. Наличие «благоприятного» генотипа GG не является прогностическим фактором ответа на интерферонотерапию (OR = 1,15; 95 % ДИ 0,24–5,54). Тестирование SNP rs486907 гена RNКазы L не позволяет прогнозировать ответ на интерферонотерапию, данный полиморфизм гена RNКазы L не имеет клинического значения у пациентов с ХГС. Вероятно, следует изучать полиморфизм иных участков RNКазы L, или экспрессию гена RNКазы L и оценить его взаимодействие с другими механизмами противовирусной защиты клеток печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bisbal, C. Diverse functions of RNase L and implications in pathology / C. Bisbal, R. H. Silverman // *Biochimie*. — 2007. — Vol. 89, № 6–7. — P. 789–798.
2. Clinical relevance of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase/RNase L system for treatment response in chronic hepatitis / U. Mihm [et al.] // *Journal of Hepatology*. — 2009. — Vol. 50, № 1. — P. 49–58.
3. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C: An update. / G. G. Marc [et al.] // *Hepatology*. — 2009. — Vol. 49. — P. 1335–1374.
4. Hepatitis C virus RNA: dinucleotide frequencies and cleavage by RNase L / C. L. Washenberger [et al.] // *Virus Res*. — 2007. — Vol. 130, № 1–2. — P. 85–95.
5. Silverman, R. H. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response / R. H. Silverman // *J. Virol*. — 2007. — Vol. 81, № 23. — P. 12720–12729.