

Полиморфные варианты гена интерферона-лямбда 3 и особенности иммунного ответа у детей с хроническим вирусным гепатитом С

Т.Б. Сенцова^{1,2}, И.А. Матинян¹, И.В. Ворожко¹, Л.И. Ильенко², Т.В. Строкова^{1,2}, О.О. Черняк¹

¹ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии», Москва;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

Polymorphic variants of the gene of interferon lambda 3 and features of immune response in children with chronic viral hepatitis C

T.B. Sentsova^{1,2}, I.A. Matinyan¹, I.V. Vorozhko¹, L.I. Ilyenko², T.V. Strokovaya^{1,2}, O.O. Chernyak¹

¹Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

С целью изучения иммунных проявлений полиморфизма гена интерферона-лямбда 3 (IFN-λ3) при хроническом вирусном гепатите С обследованы 110 больных детей русской национальности (54 девочки и 56 мальчиков) в возрасте от 3 до 17 лет. Все дети с хроническим вирусным гепатитом С находились на комбинированной терапии (пегелированный интерферон + рибавирин). Установлено, что среди изученных полиморфных вариантов гена IFN-λ3 у детей с хроническим вирусным гепатитом С аллель Т маркера rs12979860 ассоциирован с инфицированием и хронизацией инфекции. Генотип Т/Т rs12979860 гена IFN-λ3 является неблагоприятным для течения хронического вирусного гепатита С за счет низкого уровня активированных Т-лимфоцитов, интактности провоспалительных цитокинов TNF-α, IL-6, IL-1α, и интерферон-γ индуцибельного белка IP-10. Выявленная взаимосвязь полиморфных вариантов C/C + C/T локуса rs12979860 гена IFN-λ3 с экспрессией активированных Т-лимфоцитов свидетельствует о протективном характере этих генотипов в отношении развития хронического вирусного гепатита С у детей.

Ключевые слова: дети, интерферон-λ 3, генный полиморфизм, генотип, rs12979860, rs8099917, иммунитет.

Для цитирования: Сенцова Т.Б., Матинян И.А., Ворожко И.В., Ильенко Л.И., Строкова Т.В., Черняк О.О. Полиморфные варианты гена интерферона-лямбда 3 и особенности иммунного ответа у детей с хроническим вирусным гепатитом С. Рос вестн перинатол и педиатр 2017; 62(4): 32–36. DOI: 10.21508/1027-4065-2017-62-4-32-36

To study the immune manifestations of the interferon-lambda 3 genepolymorphism in chronic viral hepatitis C, 110 Russian children (54 girls and 56 boys) with chronic HCV infection aged from 3 to 17 years were examined. All children were on combined therapy (pegylated interferon + ribavirin). It was found that among the studied polymorphic variants of the IFN-λ 3 gene in children with chronic HCV infection, T allele of the marker rs12979860 is associated with infection and chronization of HCV. The T/T rs12979860 genotype of the IFN-λ3 gene is unfavorable for the course of chronic HCV infection due to low levels of activated T-lymphocytes, intactness of the proinflammatory cytokines TNF-α, IL-6, IL-1α, and interferon-γ inducible protein IP-10. The revealed relation of the polymorphic variants of C/C + C/T locus rs12979860 of INF-λ3 gene with the expression of activated T-lymphocytes discloses the protective nature of these genotypes to the development of chronic HCV infection in children.

Key words: children, interferon-λ 3, gene polymorphism, genotype, rs12979860, rs8099917, immunity.

For citation: Sentsova T.B., Matinyan I.A., Vorozhko I.V., Ilyenko L.I., Strokovaya T.V., Chernyak O.O. Features of immune response in children with chronic viral hepatitis C. Ros Vestn Perinatol i Peditr 2017; 62(4): 32–36 (in Russ.). DOI: 10.21508/1027-4065-2017-62-4-32-36

Клиническая реализация принципов персонализированной медицины предусматривает использование генетических исследований для прогноза развития и течения заболевания, а также эффективности проводимой фармакотерапии [1]. Новые возможности в лечении хронического вирусного гепатита С появились в связи с открытием ассоциативной связи

полиморфизма локуса ДНК гена IL28B, который по сути является представителем интерферона-лямбда 3 (IFN-λ3) и ответом на лечение интерфероном-α в комбинации с рибавирином [2, 3]. Многочисленными исследованиями, проведенными у взрослых, показано, что пациенты с 1-м генотипом вируса гепатита С, гомозиготные по С-аллелю rs 12979860 гена

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: Сенцова Татьяна Борисовна — д.м.н., проф., зав. лабораторией клинической биохимии, иммунологии и аллергологии клиники Федерального исследовательского центра питания и биотехнологии, проф. кафедры госпитальной педиатрии №2 педиатрического факультета РНИМУ имени Н.И. Пирогова. ORCID 0000-0002-3991-4702

Матинян Ирина Александровна — аспирант отделения педиатрической гастроэнтерологии, гепатологии и диетологии клиники Федерального исследовательского центра питания и биотехнологии. ORCID 0000-0002-7049-446X
Ворожко Илья Викторович — к.м.н., ст. научн. сотр. лаборатории клинической биохимии, иммунологии и аллергологии клиники Федерального исследовательского центра питания и биотехнологии. ORCID 0000-0003-2529-9152

Строкова Татьяна Викторовна — д.м.н., проф., зав. отделением педиатрической гастроэнтерологии, гепатологии и диетологии клиники Федерального исследовательского центра питания и биотехнологии, зав.кафедрой гастроэнтерологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова. ORCID 0000-0002-0762-0873

Черняк Ольга Олеговна — к.б.н., научн. сотр. лаборатории клинической биохимии, иммунологии и аллергологии клиники Федерального исследовательского центра питания и биотехнологии. ORCID 0000-0001-5914-930X
115446 Москва, Каширское шоссе, д. 21

Ильенко Лидия Ивановна — д.м.н., проф., зав. кафедрой госпитальной педиатрии №2 педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова
117997 Москва, ул. Островитянова, д. 1

IFN-λ3, имеют больше шансов достичь устойчивого вирусологического ответа в сравнении с пациентами, имеющими Т-аллель [4].

В настоящее время общепризнано, что прогрессирование хронического вирусного гепатита С и эффективность противовирусной терапии могут быть обусловлены соотношением структурных особенностей генома вируса гепатита С, определяющих репликативную активность вируса, и адекватным функционированием иммунных механизмов [5, 6]. Поскольку иммунный ответ на инфекционный агент генетически детерминирован, то становится очевидным интерес исследователей к поиску так называемых «генов-кандидатов» [7]. Обнадеживающие результаты были получены Е. Catamo и соавт. (2017), которые идентифицировали аллельные варианты генов HLA системы при элиминации вируса гепатита С [7]. В последующих работах исследовался уровень экспрессии генов интерферона-γ (IFN-γ), интерлейкина-1 (IL-1), фактора некроза опухоли-α (TNF-α), интерлейкина-10 (IL-10) и была определена их роль как предикторов персистенции или элиминации вируса гепатита С [9].

Благодаря достижениям экспериментальной и клинической иммунологии в последние годы в значительной степени изучены механизмы противовирусной защиты, в том числе системы интерферонов [10]. Доказано, что IFN-λ3 обладает способностью подавлять репликацию вируса гепатита С независимо от интерферонов I и II типов [11]. Кроме того, IFN-λ3 принимает участие в иммунорегуляции [12]. Вместе с тем до настоящего времени данные о частоте встречаемости полиморфных вариантов гена IFN-λ3 при развитии хронического вирусного гепатита С у детей носят противоречивый характер. Остается открытым вопрос об иммунных аспектах реализации регуляторных функций различных генотипов IFN-λ3 у детей с хроническим вирусным гепатитом С.

Цель работы: изучение иммунных проявлений полиморфных вариантов гена IFN-λ3 для прогноза развития и течения вирусного гепатита С у детей.

Характеристика детей и методы исследования

Обследованы 110 детей русской национальности (54 девочки и 56 мальчиков) в возрасте от 3 до 17 лет с хроническим вирусным гепатитом С. Распределение детей по генотипам вируса гепатита С [13] представлено в табл. 1: 1-й генотип выявлялся у 65 (59%) детей, 2-й генотип — у 7 (6%), 3-й генотип — у 38 (35%).

Исходно синдром цитолиза был выявлен у 47 (50%) пациентов: медиана аланинаминотрансферазы составила 43,6 [27–64,2] Ед/л, отмечалось повышение уровня маркеров холестаза. Все дети находились на комбинированной противовирусной терапии (пегилированный интерферон 60 мкг/м² 1 раз в неделю+рибавирин 15 мг/кг в сутки ежедневно). Курс лечения при 1-м генотипе вируса гепатита С составлял 48 нед, при 2-м и 3-м генотипах — 24 недели. Всем детям с хроническим вирусным гепатитом С до старта терапии и на ее фоне (4, 8, 12, 16, 24 и 48-я недели лечения) проводились антропометрические, биохимические, молекулярно-генетические и другие параклинические исследования. Контрольную группу составили 25 здоровых детей того же возраста русской национальности, обследование которых проводилось при диспансерном наблюдении в условиях поликлиники.

Для выделения ДНК использовали набор «Проба-Рapid-Генетика» фирмы «ДНК-Технология» (Россия). Анализ маркеров генетических полиморфизмов rs12979860 C>T и rs8099917 T>G гена IFN-λ3 проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени при использовании детектирующего амплификатора ДТ-96 и наборами для ДНК-диагностики фирмы «ДНК-Технология» (Россия). Содержание растворимой фракции активированных Т-хелперов (sCD134), провоспалительных цитокинов TNF-α, IL-1α, IL-6 и интерферон-γ индуцибельного белка (IP-10) определяли методом иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы «BCM Diagnostics», «Bender Medsystems» (США) на спектрофотометре «Tecan» (Австрия).

Таблица 1. Клиническая характеристика детей с хроническим вирусным гепатитом С (n=110)

Table 1. Clinical characteristics of children with chronic HCV (n=110)

Показатель	1-й генотип HCV, n=65 (59%)	2-й генотип HCV, n=7 (6%)	3-й генотип HCV, n=38 (35%)
Возраст, годы	10,6 [6,4;15]		10,5 [7,5;14,9]
Длительность инфицирования, годы	9,2 [5,6;12,95]		8,0 [5,9;11,7]
АЛТ, Ед/л	45 [29;63]		38 [24,5;68]
АСТ, Ед/л	43,9 [33,5;62]		33,7 [27,2;55]
ГГТ, Ед/л	27 [17,4;28,9]		18,7 [16,2;23,3]
Щелочная фосфатаза, Ед/л	192 [140;245]		204 [164;255]
Степень фиброза (METAVIR)	F0		F0

Примечание. АЛТ — аланинаминотрансфераза; АСТ — аспартатаминотрансфераза; ГГТ — гамма-глутамилтранспептидаза; HCV — вирус гепатита С.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета прикладных программ «Statistica for Windows» v.6.0, Stat Soft Inc (США). Различия в частотах аллелей и генотипов выявляли с помощью метода χ^2 с поправкой Yates. Оценка доверительных интервалов (CI) для расчетных значений отношения шансов проводилась методом максимального правдоподобия по Wald. Различия в концентрации sCD134, TNF- α , IL-1 α , IL-6, IP-10 при различных вариантах гена IFN- λ 3 оценивали, используя непарный t-тест Aspin–Welch, данные выражали как среднее (M) и ошибку среднего (m).

Исследование явилось открытым, проспективным, было одобрено локальным комитетом по этике ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» и соответствует принципам, изложенным в декларации Хельсинкского соглашения. Информированное согласие было получено от всех родителей детей либо от их опекунов.

Результаты и обсуждение

При изучении частоты встречаемости полиморфных маркеров rs12979860 и rs8099917 гена IFN- λ 3 у детей с хроническим вирусным гепатитом С и в контрольной группе (здоровые дети) были получены результаты, представленные в табл. 2.

У детей с хроническим вирусным гепатитом С выявлялась достоверно повышенная частота встречаемости аллеля Т сайта rs12979860 гена IFN- λ 3 ($OR=2,69$, $p=0,008$) как в гомозиготном Т/Т, так и в гетерозиготном Т/С состоянии, что дает основание рассматривать его в качестве прогностического маркера, ассоциированного с риском развития хро-

нического вирусного гепатита С. Напротив, у здоровых детей чаще обнаруживалось носительство аллеля С ($OR=0,37$, $p=0,008$) и генотипа С/С, нежели у детей с хроническим вирусным гепатитом С. Можно предположить, что носительство этого аллеля является протективным в отношении инфицирования вирусом гепатита С. При анализе частоты встречаемости полиморфных маркеров в локусе rs8099917 у детей с хроническим вирусным гепатитом и в контрольной группе не выявлено различий в отношении как аллелей, так и гомо- и гетерозиготных генотипов.

Принципиально важным следует считать поиск иммунологических маркеров, характеризующих экспрессию гена IFN- λ 3 у детей с хроническим вирусным гепатитом С. Попытки секвенирования данного гена с определением аминокислоты, подлежащей замене, не выявили связи с результатами противовирусной терапии, однако был сделан вывод о том, что мутации в основном связаны с регуляцией транскрипции, влияющей на функциональную активность генома [14]. Учитывая это обстоятельство, мы изучали концентрацию провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 α , IL-6, sCD134, IP-10 у детей с хроническим вирусным гепатитом С. Как показало проведенное исследование, у детей с гомозиготным генотипом Т/Т rs12979860 гена IFN- λ 3 отмечалось статистически достоверное ($p<0,0001$) снижение содержания sCD134 по сравнению с пациентами, имеющими С/С и С/Т генотип (табл. 3).

Изменений в концентрации провоспалительных цитокинов и IP-10 в исследуемых группах не выявлено ($p>0,05$). У детей с хроническим вирусным гепатитом С при полиморфных вариантах G/G и T/G rs 8099917 гена IFN- λ 3 развитие заболевания проис-

Таблица 2. Распределение частот аллелей и генотипов гена IFN- λ 3 у детей с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) и в контрольной группе

Table 2. Frequency distribution of alleles and genotypes of the IFN- λ 3 gene in children with chronic HCV and in the control group

Аллели, генотипы	Частоты аллелей и генотипов		OR [95% CI]	p
	дети с ХВГС (n=110)	контрольная группа (n=25)		
Полиморфный маркер IFN-λ3 C>T [rs12979860]				
Аллель С	0,464	0,700	0,37 (0,18–0,78)	0,008
Аллель Т	0,536	0,300	2,69(1,28–5,65)	0,008
Генотип С/С	0,119	0,480	0,15(0,04–0,50)	0,004
Генотип С/Т	0,667	0,440	2,55(0,92–7,04)	0,004
Генотип Т/Т	0,214	0,080	3,14(0,62–15,88)	0,004
Полиморфный маркер IFN-λ3 T>G [rs8099917]				
Аллель Т	0,702	0,800	0,59 (0,26–1,36)	0,21
Аллель G	0,298	0,200	1,69 (0,73–3,91)	0,21
Генотип Т/Т	0,452	0,640	0,46(0,17–1,29)	0,32
Генотип Т/G	0,500	0,320	2,13(0,75–5,98)	0,32
Генотип G/G	0,048	0,040	1,20(0,10–3,95)	0,32

Таблица 3. Содержание TNF- α , IL-1 α , IL-6, sCD134 и IP-10 (в пг/мл) у детей с хроническим вирусным гепатитом С при различных полиморфных вариантах гена INF- λ 3

Table 3. TNF- α , IL-1 α , IL-6, sCD134 and IP-10 levels in children with CVHC and various polymorphic variants of the INF- λ 3 gene

Группа	sCD134	TNF- α	IL-1 α	IL-6	IP-10
Полиморфный маркер INF- λ 3 C>T [rs12979860]					
1. C/C+C/T	416,8 \pm 192,7	0,7033 \pm 0,086	0,3527 \pm 0,0063	0,4954 \pm 0,0073	199,5 \pm 21,2
2. T/T	95,67 \pm 54,46	0,8135 \pm 0,222	0,3438 \pm 0,0077	0,5124 \pm 0,018	240,9 \pm 43,12
p_{1-2}	< 0,0001	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Полиморфный маркер INF- λ 3 T>G [rs8099917]					
1. T/T	638 \pm 349	0,7039 \pm 0,085	0,3548 \pm 0,0085	0,5112 \pm 0,009	254,2 \pm 31,36
2. G/G+T/G	168 \pm 114	0,722 \pm 0,116	0,3481 \pm 0,0066	0,4923 \pm 0,0094	182,3 \pm 22,54
p_{1-2}	< 0,0007	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

ходило при более низких уровнях ($p < 0,0007$) sCD134, нежели в группе детей с T/T генотипом. Изменения в содержании цитокинов и IP-10 отсутствовали у пациентов с полиморфным вариантом T/T и G/G +TG rs1299860, а также у детей с полиморфизмом сайта rs8099917.

На основании полученных данных можно предположить, что носители генотипа T/T rs1299860 гена INF- γ 3 в случае заболевания вирусным гепатитом С будут иметь прогрессирующее течение за счет низкого уровня активированных Т-клеток. Факт сниженных концентраций sCD134 у детей с генотипами G/G+T/G rs8099917 гена IFN- λ 3 предусматривает проведение дополнительных исследований ввиду отсутствия разницы распределения этого генотипа у здоровых и больных детей.

Таким образом, оценка ассоциаций исследуемых полиморфизмов гена INF- λ 3 с иммунными показателями позволила выявить интактность некоторых маркеров клеточного звена, что, по-видимому, отражает низкую противовирусную активность сформировавшегося воспаления и может рассматриваться как один из факторов негативной реализации аллеля T/T rs12979860 у детей с хроническим вирусным гепатитом С. Напротив, повышенные значения концен-

трации sCD134 у детей с вариантами C/C+C/T локуса rs12979860 гена INF- λ 3 указывают на определенное протективное влияние этих полиморфизмов в условиях хронического течения вирусного гепатита С и характеризует значительный адаптационный эффект клеточного иммунитета, несмотря на отсутствие значимых различий в синтезе провоспалительных цитокинов и IP-10.

Выводы

1. Среди изученных полиморфных вариантов гена INF- λ 3 у детей с хроническим вирусным гепатитом С аллель T rs12979860 ассоциирован с инфицированием и хронизацией инфекции.
2. Генотип T/T гена IFN- λ 3 rs12979860 является неблагоприятным для течения хронического вирусного гепатита С за счет низкого уровня активированных Т-лимфоцитов, интактности провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6, IL-1 α и IP-10.
3. Выявленная взаимосвязь полиморфных вариантов C/C+CT rs12979860 гена IFN- λ 3 с экспрессией активированных Т-лимфоцитов свидетельствует о протективном характере этого локуса в отношении развития хронического вирусного гепатита С у детей.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Дедов И.И., Тюльпачов А.Н., Чехонин В.П., Баклаушев В.П., Арчаков А.И., Мошковский С.А. Персонализированная медицина: современное состояние и перспективы. Вестн РАМН 2012; 67 (12): 4–12. [Dedov I.I., Tyul'pakov A.N., Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Archakov A.I., Moshkovskii S.A. Personalized Medicine: State-Of-The-Art And Prospects. Annals of the Russian academy of medical sciences 2012; 67(12):4–12. (In Russ)] DOI:10.15690/vramn.v67i12.474
2. Daneshvar M., Nikbin M., Talebi S., Javadi F., Aghasadeghi M.R., Mahmazi S., Sadat S.M. Role of IL28-B Polymorphism (rs12979860) on Sustained Virological Response to Pegylated Interferon/Ribavirin in Iranian Patients With Chronic Hepatitis C. Iranian Red Crescent Med J 2016; 18 (9): e28566. <http://doi.org/10.5812/ircmj.28566>
3. Ивашкин В.Т. Иммунная система и повреждения печени при хронических гепатитах В и С. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 2009; 19 (6): 4–10. [Ivashkin V.T. Immune system and liver damage in chronic hepatitis B and C. Russ J Gastroenterol Hepatol Coloproctol 2009; 19 (6): 4–10 (in Russ)]
4. Fateh A., Aghasadeghi M., Siadat S.D., Vaziri F., Sadeghi F., Fateh R., Keyvani H. et al. Comparison of Three Different Methods for Detection of IL28 rs12979860 Polymorphisms as a Predictor of Treatment Outcome in Patients with Hepatitis C Virus. Osong Public Health Res Perspect 2016; 7 (2): 83–89. DOI: 10.1016/j.phrp.2015.11.004
5. Pfeffer L.M., Li K., Fleckenstein J.F., Marion T.N., Diament J., Yang C.H. An Interferon Response Gene Signature Is Associated with the Therapeutic Response of Hepatitis C

- Patients. PLoS ONE 2014; 9 (8): e104202. DOI:10.1371/journal.pone.0104202
6. Кистенева Л.Б., Сускова В.С., Московская И.А., Холодник Г.Е. Особенности клеточного иммунитета новорожденных, родившихся у матерей с гепатитом С. Рос вестн перинатол и педиатр 2009; 54 (5): 74–81. [Kisteneva L.B., Suskova V.S., Moskovskaya I.A., Kholodnyak G.E. The specific features of cell immunity in neonatal infants born to mothers with hepatitis C. Ros vestn perinatol pediatri 2009; 54 (5): 74–81. (in Russ)]
 7. Heim M.H., Bochud P.Y., George J. Host - hepatitis C viral interactions: The role of genetics. J Hepatol 2016; 65 (1 Suppl): S22–32. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.07.037
 8. Waldron P.R., Belitskaya-Lévy I., Chary A., Won J., Winters M., Monto A., Ryan J., Lazzeroni L.C., Holodniy M. Genetic Variation in the IL-6 and HLA-DQB1 Genes Is Associated with Spontaneous Clearance of Hepatitis C Virus Infection. J Immunol Res 2016; 2016: 6530436. DOI: 10.1155/2016/6530436.
 9. Fritsch S.D., Weichhart T. Effects of Interferons and Viruses on Metabolism. Front Immunol 2016; 7: 630. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00630.
 10. Bruening J., Weigel B., Gerold G. The Role of Type III Interferons in Hepatitis C Virus Infection and Therapy. J Immunol Res 2017; 2017: 7232361. DOI: 10.1155/2017/7232361
 11. Boisvert M., Shoukry N.H. Type III Interferons in Hepatitis C Virus Infection. Front Immunol 2016; 7: 628. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00628
 12. Egli A., Santer D.M., O'Shea D., Tyrrell D.L., Houghton M. The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. Emerg Microbes Infect 2014; 3 (7): e51. DOI:10.1038/emi.2014.51
 13. Walker A., Bergmann M., Camdereli J., Kaiser R., Lübke N., Timm J. A genotype independent, full-genome reverse-transcription protocol for HCV genotyping and resistance testing. J Clin Virol 2017; 91: 42–48. DOI: 10.1016/j.jcv.2017.04.008
 14. O'Brien T.R., Prokunina-Olsson L., Donnelly R.P. IFN-λ4: the paradoxical new member of the interferon lambda family. J Interferon Cytokine Res 2014; 34 (11): 829–838. DOI: 10.1089/jir.2013.0136

Поступила 31.03.17

Received on 2017.03.31

Конфликт интересов:

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, финансовой или какой-либо другой поддержки, о которых необходимо сообщить.

Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the absence conflict of interests, financial or any other support which should be reported.