

# **РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ЦИТОКИНОВ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ КОМБИНИРОВАННОЙ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С**

## **КРАТКОЕ РЕЗЮМЕ**

Хронический вирусный гепатит (ХГС) является одной из основных причин цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Методом профилактики осложнений ХГС, является комбинированная противовирусная терапия (ПВТ) интерфероном (ИФН) + рибавирином +/- ингибиторы вирусных протеаз. Принимая в расчет ее высокую курсовую, крайне важно выявить предикторы эффективности и безопасности ПВТ. Цель исследования - выявить такие предикторы с использованием фармакогенетического подхода. Будет проведен анализ влияния полиморфизмов генов медиаторов иммунной системы ( $\gamma$ -IFN, IL-1, IL-6, IL-10, IL-28, CTLA4, MxA, FCGR2A, TGF  $\beta$ ) на исходы ПВТ пациентов с ХГС. Исследуемая популяция - пациенты с ХГС, получившие комбинированную ПВТ (пег-ИФН + рибавирин). Исследование SNP цитокинов человека будет выполнено с использованием метода пиросеквенирования. Результаты исследования позволят проводить количественное прогнозирование эффективности и безопасности ПВТ у пациентов с ХГС, разработать оптимальную стратегию отбора пациентов для проведения ПВТ, а также предупредить развитие потенциальных НЛР, снизить расходы на закупку ПВТ.

## **СООТВЕТСТВИЕ ПРОЕКТА ТЕМАТИКЕ ЗАЯВЛЕННОЙ НАУЧНОЙ ПЛАТФОРМЫ**

В ходе реализации проекта будут использованы фармакогенетические методы оптимизации противовирусной терапии хронического гепатита С. Таким образом проект соответствует платформе «фармакология».

## **АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Проект направлен на решение проблемы повышения эффективности и безопасности противовирусной терапии хронического гепатита С (ХГС).

Вирусным гепатитом С страдают около 170 млн. пациентов в мире. Вирус гепатита С является основным инфекционным агентом, ответственным за развитие таких тяжелых состояний как хронический гепатит С (ХГС), цирроз печени, гепатоцеллюлярная карцинома. Установлено, что более 45% случаев рака печени, 30% циррозов печени ассоциированы с вирусными гепатитами [AASLD, 2013]. Смертность, ассоциированная с вирусными гепатитами входит в 10 самых частых причин смерти в США. Показано, что наличие у пациента HCV инфекции является независимым фактором снижающим продолжительность жизни на 22-23 года [CID 2014; 58: 40].

В то же время, число инфицированных HCV в мире с 1990 по 2005 года возросло с 2,3% до 2,8% [Hepatology 2013; 57:1333]. В России заболеваемость хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) также увеличивается - в 2011 году она достигла 39,9 на 100 тыс. населения. Среди регистрируемых в последние годы случаев ХГС половина приходится на лиц моложе 40 лет [И.В.Шахгильдян, 2011 г.].

Единственным методом профилактики осложнений ХГС, на сегодняшний день, является комбинированная противовирусная терапия (ПВТ), включающая в себя, как правило, пегилированный интерферон (пег-ИФН) и рибавирин, а, в ряде случаев, ингибиторы вирусных протеаз [EASL, 2013 г; AASLD, 2011-2014 г]. Длительные наблюдения за большими (> 360 тысяч пациентов) популяциями пациентов показывают, что смертность у пациентов, с ХГС 3,5 раза ниже в случае

эффективной ПБТ и достижения вирусологического ответа [JAMA IM. 2014;174:204].

Основная проблема ПБТ пациентов с ХГС заключается в том добиться стойкого вирусологического ответа (СВО) можно не у всех пациентов. Основными причинами, снижающими шанс развития СВО являются особенности HCV (генотип 1), развитие нежелательных лекарственных реакций (нейтропения, тромбоцитопения, анемия, депрессия и др.), низкая комплаентность пациентов, особенности состояния иммунной системы (наличие отдельных аллелей IL-28b). В связи с вышесказанным, принимая в расчет высокую стоимость современной ПБТ, крайне важно иметь возможность выявлять показатели, позволяющие прогнозировать эффективность и безопасность ПБТ у пациентов с ХГС еще до начала лечения.

В ходе выполнения исследования будут собраны данные о возможных корреляциях между полиморфизмами генов медиаторов иммунной системы, цитокинов и их рецепторов ( $\gamma$ -IFN, IL-1, IL-6, IL-10, IL-28, CTLA4, MxA, FCGR2A, TGF  $\beta$ ) у пациентов с ХГС.

Прикладной потенциал планируемого исследования заключается в использовании полученных данных для количественного прогнозирования эффективности и безопасности комбинированной ПБТ у пациентов с ХГС. Анализ частоты встречаемости подобных полиморфизмов у пациентов с ХГС позволит разработать оптимальную стратегию отбора пациентов для проведения противовирусной терапии, а также предупредить развитие потенциальных нежелательных реакций. В свою очередь, оптимизация терапии пациентов с ХГС позволит существенно сократить расходы на лечение, повысить его эффективность, снизить частоту и выраженность нежелательных реакций. Это особенно важно, учитывая, что ХГС является социально-значимой инфекцией, широко распространен в РФ, особенно у лиц молодого, трудоспособного возраста. Принимая во внимание, что курс современной противовирусной терапии у пациентов с ХГС составляет около 1,2 – 1,5 млн. руб., оптимизация отбора кандидатов для противовирусной терапии является крайне важной не только с медицинской, но и с экономической точки зрения.

## **НАУЧНЫЙ КОЛЛЕКТИВ**

Число ученых – основных исполнителей (включая руководителя) - 6

В состав научной группы будет входить не менее:

- 2 кандидата наук в возрасте до 35 лет,
- 2 студента очной формы обучения.

### **Сведения о руководителе проекта**

Фамилия, имя, отчество - Рафальский Владимир Витальевич

Возраст – 46 лет

Ученая степень, год присуждения – д.м.н, 2004

Основное место работы – заведующий лабораторией ГБОУ ВПО СГМА МЗ РФ

Число публикаций за пять лет, предшествующих конкурсу - 72,

из них - 13 - опубликованы в изданиях, индексируемых в Web of Science;

15 - опубликованы в изданиях, индексируемых в Scopus;

44 - опубликованы в изданиях, индексируемых в РИНЦ.

Руководитель 1 докторской и 4 кандидатских диссертаций, в настоящее время выполняется 5 кандидатских диссертаций.

Область научных интересов – фармакология, антимикробная терапия, антибиотики, противовирусная терапия, фармакогенетика,

генетические полиморфизмы, вирусные гепатиты, HCV, вирусология, цитокины  
 Главный редактор журнала "Вестник практического врача". Член международных научных обществ: ESCMID, ASM, EASLD, ICIS. Член диссертационного совета Д 208.097.02 при ГОУВПО СГМА Росздрава. Председатель проблемной комиссии "Фармакология, клиническая фармакология, фармация" при ГОУВПО СГМА Росздрава.

Автор инновационной системы последипломного обучения врачей с помощью онлайн семинаров, реализованной на базе сайта [www.medlector.ru](http://www.medlector.ru). За 2010-2012 года проведено более 200 онлайн семинаров и лекций. Участник национального образовательного проекта по антимикробной терапии для врачей амбулаторного звена, проводящегося Альянсом клинических микробиологов и химиотерапевтов.

### **Соисполнители проекта**

ФИО	Ученая степень, год присуждения	Основное место работы, должность	Возраст	Количество публикаций, за последние 5 лет	Область научных интересов
Розинкова Ольга Сергеевна	К.м.н., 2013	Каф. Инфекционных болезней ГБОУВПО СГМА МЗ РФ, ассистент	34	18	хронические вирусные гепатиты, противовирусная терапия
Лобанова Ольга Леонидовна	Нет	Каф. Инфекционных болезней ГБОУВПО СГМА МЗ РФ, ассистент	27	6	хронические вирусные гепатиты, противовирусная терапия
Абрамова Елена Сергеевна	К.м.н., 2013	Научно-исследовательский центр ГБОУВПО СГМА МЗ РФ, снс	29	12	гастроэнтерология, клиническая лабораторная диагностика
Прокудина Наталья Владимировна	Нет	ГБОУВПО СГМА МЗ РФ, студент 6 курса, лечебного факультета	27	3	Экспериментальная медицина, генетика
Никольская Ксения Игоревна	Нет	ГБОУВПО СГМА МЗ РФ, студент 3 курса, лечебного факультета	20	Нет	Молекулярная биология, генетика

## **ФИНАНСОВАЯ МОДЕЛЬ**

Планируемый объем финансирования проекта на 2015 г. – 3000 тыс. руб. Реализация проекта будет осуществляться по принципу со-финансирования. Запрашиваемая сумма финансирования составляет 2000 тыс. руб. Со-финансирование в размере 1000 тыс. руб. будет осуществлено за счет внебюджетных средств ГБУ ВПО СГМА МЗ РФ.

## **КОНКУРЕНТНЫЕ ПРЕИМУЩЕСТВА ПРОЕКТА**

В мировой научно литературе существует ограниченное число публикаций по тематике проекта. Публикации по данной теме появились в библиографических базах (Medline, Scopus, Embase) в течение последних двух лет. Практически все исследования носят пилотный, предварительный характер, выполнены на небольшом числе пациентов, при исследовании включают неполный набор потенциальных маркеров. В Российской Федерации масштабных исследований по данному направлению не ведется.

В настоящий момент исследовательский коллектив располагает базой данных, содержащей сведения о 180 пациентов, получивших комбинированную ПВТ (пег-ИФН + рибавирин) у которых зафиксированы исходы терапии (ранний, полный, стойкий вирусологический ответ) и показатели безопасности и переносимости лечения. Для более чем 100 пациентов получены образцы крови и выделена ДНК.

Для реализации проекта исследовательский коллектив обладает соответствующими лабораторными помещениями, мебелью, инфраструктурой, специализированным оборудованием (ПЦР-боксы, ДНК-амплификаторы, ПЦР-детекторы, системы для электрофореза в агарозном геле), общелабораторным оборудованием (термостаты, минитермостаты, центрифуги общелабораторные, миницентрифуги, вортексы, вошеры, автоматические дозаторы и т.д.).

Исследовательская команда в течение последних 15 лет принимает активное участие в многоцентровых международных исследованиях эффективности и безопасности противовирусных препаратов у пациентов с хроническим гепатитом С. Исследования TMC435-TiDP16-C213, VX-950HPC3007, TMC435HPC3002, TMC435HPC3007, TMC435-TiDP16-C208, WV19432 NEPTUNE и др.). Участие в данных проектах позволило накопить большой пул данных по эффективности современных противовирусных средств, а также сформировать базу данных пациентов.

В России нами впервые показана возможность использования генетических полиморфизмов некоторых генов для прогнозирования эффективности и безопасности терапии ХГС [V. Rafalskiy e.a. 18th United European Gastroenterology Week UEGW, Barcelona 2010. Abstract P1078].

## **ИННОВАЦИОННОСТЬ**

Инновационность данного научного проекта обусловлена использованием фармакогенетического подхода, базирующегося на современной методологической базе молекулярной генетики (определение одиночных генетических полиморфизмов с использованием ПЦР, пиросиквенсинга) для решения проблемы повышения эффективности и безопасности противовирусной терапии ХГС. Научная новизна предлагаемого направления научных исследований подтверждается анализом публикационной активности – первые работы появились в международных библиографических базах всего 5 лет назад и ограничивались изучением генетических полиморфизмов одного интерлейкина,

в то время, как в последние 2 года количество публикаций и исследований резко возросло, происходит расширения спектра и объема исследований. Научная новизна также обусловлена существующими географическими различиями в распространенности отдельных генетических полиморфизмов и необходимости получения данных для РФ.

## **ИНФОРМАЦИЯ О ПРОФИЛЬНЫХ ПУБЛИКАЦИЯХ, ГРАНТАХ И СО-ИСПОЛНИТЕЛЯХ**

В настоящее время исследовательской командой выполнено несколько работ по смежной тематике. Изучены генетические полиморфизмы гена аполипопротеина Е как предикторов эффективности и безопасности противовирусной терапии пациентов с хроническим вирусным гепатитом С. Обследовано 52 пациента с ХГС, получивших курс комбинированной противовирусной терапии пегилированным интерфероном в сочетании с рибавирином. Результаты опубликованы в тезисах зарубежных и российских конференций, статье в российском журнале

1. Olga Lobanova; Mikhail M Khramcov; Eduard V Generozov GENETIC POLYMORPHISMS OF APOLIPOPROTEIN E GENE AS PREDICTORS OF THE EFFICACY AND SAFETY OF ANTIVIRAL THERAPY OF CHRONIC HCV INFECTION. 18th United European Gastroenterology Week UEGW, Barcelona 2010. October 23 – 27, 2010. Barcelona, Spain. Abstract P1078.]
2. Rafalskiy, V. Simeprevir (TMC435) with peginterferon/ribavirin for chronic hcv genotype-1 infection in treatment-naïve patients: results from QUEST-1, a phase III trial [Текст] / Jacobson, I., G. J. Dore, G. R. Foster, M. W. Fried, M. Radu, L. Moroz et al.// Journal of Hepatology 2013; vol. 58: S574. (Impact Factor = 9,858)
3. Рафальский, В.В. Лобанова О.Л., Храмцов М.М, Генерозов Э.В., Чоговадзе А.Г Генетические полиморфизмы гена аполипопротеина е как предикторы эффективности и безопасности противовирусной терапии пациентов с хроническим вирусным гепатитом С [Текст] / // Вестник северо-западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова.- 2012.- Том 4.- №3.- С. 43-47.

## **ПРЕДЛАГАЕМЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ, ОБЩИЙ ПЛАН РАБОТЫ**

Выполнение исследования будет включать в себя несколько последовательных этапов:

1. Формирование исследуемой популяции пациентов
2. Оценка эффективности и безопасности комбинированной ПВТ ХГС.
3. Анализ генетических полиморфизмов
4. Обработка данных

Этап 1. Формирование исследуемой популяции пациентов.

Исследуемая популяция будет включать пациентов страдающих ХГС, получивших комбинированную ПВТ пег-ИФН + рибавирин в стандартных дозах. Критерии включения пациентов в исследование:

1. Наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании.
2. Установленный диагноз ХГС.
3. Завершение курса комбинированной терапии ХГС пег-ИФН + рибавирин.
4. Возможность собрать биообразцы, предусмотренные протоколом исследования.

Диагноз ХГС будет подтверждаться 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.

Этап 2. Оценка эффективности и безопасности комбинированной ПБТ ХГС. Вирусологическая эффективность оценивается спустя 24 недели после окончания ПБТ – наличие вирусологического ответа определяется как неопределяемый уровень HCV RNA в крови. Для гистологического исследования печени используется биопсийный фрагмент печеночной паренхимы. Оценка ИГА проводится согласно системе Knodell.

Этап 3. Анализ генетических полиморфизмов В качестве метода генотипирования будет использоваться пиросеквенирование. Анализ этим методом будет проводиться в 5 шагов:

1. Выделение геномной ДНК пациента из цельной крови, обработанной ЭДТА.
2. ПЦР – амплификация участка генома, содержащего исследуемый SNP.
3. Получение одноцепочечной ДНК.
4. Проведение секвенирования.
5. Анализ данных.

Выделение ДНК будет выполнено с помощью коммерческого набора «Wizard® Genomic DNA Purification Kit» (Promega®, USA) согласно инструкции. Для ПЦР-амплификации фрагментов ДНК, содержащих искомые SNP, будут подобраны пары праймеров при помощи онлайн-ресурса "Информационная система по медицински-значимым полиморфизмам генома человека" (<http://www.genepassport.ru/>). При амплификации фрагмента ДНК будет проведен прямой анализ (forward analysis) - с биотином будет связан обратный праймер для амплификации. Реакция амплификации будет выполняться в амплификаторе MAXYGENE Gradient.

После амплификации будет проведена пробоподготовка ампликона. ПЦР-фрагмент будет инкубирован с частицами сефарозы, покрытыми стрептавидином. При помощи полуавтоматической вакуумно-фильтрационной станции (Vacuum Prep Workstation) будет проводится щелочная денатурация ампликона и серия отмывок, в результате которых образуется одноцепочечный ПЦР-продукт, который иммобилизуется на твердую поверхность (планшет для секвенирования) и используется как матрица в реакции пиросеквенирующего синтеза. При проведении очистки и щелочной денатурации ПЦР-продукта может быть использован набор для пробоподготовки "ПИРО-преп" (Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).

К одноцепочечному ПЦР-продукту будет добавляться секвенирующий праймер, который отжигается в области анализируемого генетического локуса, образуя дуплекс ДНК-матрица / секвенирующий праймер, необходимый для проведения реакции пиросеквенирующего синтеза. Заключительным этапом анализа является секвенирование ПЦР-продукта – проведение реакции пиросеквенирующего синтеза и анализ полученных результатов. Детекция результатов пиросеквенирующего синтеза проводится автоматически в режиме реального времени с помощью пиросеквенатора PyroMark Q24.

Статистическая обработка результатов будет проведена при помощи программных пакетов SPSS 15.0 (SPSS Inc., США), Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США), MacChiSquare 1.2.0.0 (Marley W. Watkins, США). Риск развития заболевания (OR) рассчитывался при помощи онлайн ресурса «Odds Ratio Calculator».