

¹Tadeusz Wojciech Łapiński, ¹Joanna Pogorzelska, ²Oksana Kowalczyk, ²Jacek Nikliński, ¹Robert Flisiak

WPLYW SNP RS12979860 NA SPONTANICZNĄ ELIMINACJĘ HCV WŚRÓD PACJENTÓW Z KOINFEKCJĄ HCV/HIV-1

¹Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

²Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

STRESZCZENIE

Genotyp CC u osób z SNP rs12979860 sprzyja spontanicznej eliminacji zakażenia HCV.

CELEM PRACY była ocena wpływu polimorfizmu rs12979860 na wiremę HIV, HCV oraz liczbę CD3, CD4 i CD8, a także ewentualną eliminację zakażenia HCV u chorych ze współzakażeniem HCV/HIV.

MATERIAL I METODY. Badaniem objęto 41 chorych ze współzakażeniem HCV/HIV. U wszystkich badanych pacjentów oznaczano HIV RNA, HCV RNA, genotyp HCV, a także genotyp miejsca polimorficznego rs12979860 oraz liczbę CD3, CD4 i CD8.

WYNIKI. Genotyp CC rs12979860 stwierdzono u 16 z 41 chorych. W trakcie 4-letniej obserwacji u pięciu chorych z genotypem CC (31%) stwierdzono eliminację HCV RNA, czego nie odnotowano u żadnego chorego z genotypami CT i TT. Nie stwierdzono istotnych różnic poziomu wirerii HIV oraz liczby CD3, CD4 i CD8 w odniesieniu do polimorfizmu rs12979860. Wyjściowy poziom HCV RNA u osób z genotypem CC był znacznie niższy w porównaniu z chorymi z genotypami nie-CC (88546 ± 74181 vs. 726021 ± 30709 IU/mL).

WNIOSEK. Genotyp CC miejsca polimorficznego rs12979860 może wpływać na niższą wiremę HCV w porównaniu z chorymi z genotypami CT i TT oraz sprzyja spontanicznej eliminacji zakażenia HCV u chorych współzakażonych HIV/HCV.

Słowa kluczowe: współzakażenie HIV/HCV, SNP rs12979860, eliminacja zakażenia HCV

WSTĘP

Około 2, 4% osób na świecie jest zakażonych HCV (1, 2). Jednym z najważniejszych problemów w okresie badań nad nowymi lekami przeciw HCV jest określenie początkowych czynników predykcyjnych wpływających na skuteczność leczenia przeciwwirusowego lub spontaniczną eliminację wirusa (3). Spontaniczna eliminacja HCV może być związana z polimorfizmem nukleotydów (SNP) w obrębie genu rs12979860 chromosomu 19. Pacjenci zakażeni HCV z genotypem CC rs12979860 wykazują spontaniczny klirens HCV częściej niż osoby z genotypem CT lub TT. (4) Wyższa skuteczność leczenia pegylovanym interferonem alfa (PegIFN α) i rybawiryną (RBV) została wykazana zarówno wśród zakażonych jedynie HCV, jak i u chorych z koinfekcją HCV/HIV z genotypem CC w porównaniu z pacjentami z genotypem nie-CC (5).

Celem badania była ocena wpływu polimorfizmu SNP rs12979860 na spontaniczny klirens HCV, wiremę HCV i HIV, jak i liczbę CD3, CD4 i CD8 wśród chorych z koinfekcją HCV/HIV.

MATERIAL I METODY

Badaniem objęto 41 chorych (10 kobiet i 31 mężczyzn) w wieku od 27 do 50 lat, z rozpoznaniem zakażenia HIV oraz z obecnością przeciwciał anty - HCV. Pacjenci byli obserwowani, przez co najmniej 4 lata (średnia $5,6 \pm 0,2$ 2) i w tym czasie nie otrzymywali leczenia przeciwwirusowego przeciwko HCV oraz HIV. Wiremę HIV, obecność HCV - RNA oraz liczbę CD3, CD4 i CD8 określono na początku badania.

Rozpoznanie zakażenia HIV oparto na wykryciu przeciwciał anty - HIV metodą ELISA i dodatnim teście

Western Blot (Cambridge Biotech Corporation, USA). Ilościową ocenę HIV określono metodą RT - PCR, przy użyciu 1,5 Cobas Amplicor JEGO (Ultra-Sensitive). Subpopulacje CD3, CD4 i CD8 we krwi analizowano za pomocą cytometrii przepływowej używając cytometru Becton Dickinson 2. HCV - RNA i jego genotyp były oznaczane metodą RT - nested - PCR (Syngen Biotech, USA), której czułość wynosiła 25 IU/mL. Ocenę sekwencji polimorfizmu nukleotydów rs12979860 przeprowadzono przez bezpośrednie sekwencjonowanie produktu metodą PCR. DNA izolowano z krwi obwodowej za pomocą zestawu odczynników i urządzenia do automatycznego izolowania kwasów nukleinowych (Biomereueix EasyMag, Francja) zgodnie z protokołem producenta. Mieszano 50 µl pełnej krwi mieszano z 500 µl Lysis Buffer (Biomereueix, Francja) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 godzinę z 30 µl Proteinazy K (10 mg/ml, Sigma). Następnie przeprowadzono proteolizę wiązań DNA dodając krzemionkę (proteoliza magnetyczna), (Biomereueix, Francja), płukano w 50 µl Washing Buffer 3 (Biomereueix, Francja). Wszystkie etapy proteolizy krwi przeprowadzono automatycznie przy użyciu EasyMag. Fragmenty zmienne genu IL28B powielono w reakcji PCR przy użyciu 20 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 1xPCR bufor, 200 µM dNTPs, 0,5 µM startery kodon i antykodon, 1 U TaqRed polimerazę DNA (EURx, Polska, Gdańsk) i około 50 ng DNA. Sekwencja starterów była następująca: kodon-5'-GCT-TATCGCATACGGCTAGG-3', antykodon-5'-AGGCT-CAGGGTCAATCACAG-3'. Warunki reakcji PCR dla cyklu były następujące: początkowo umieszczano próbki przez 5 minut w 95°C, następnie próbki poddawano cykлом w 95°C 40 razy przez 15 sekund, w ciągu 1 minuty 60°C, a następnie do zakończenia reakcji PCR przez 5 minut w temperaturze 72°C. Produkty PCR przenoszono na żel agarozowy celem przeprowadzenia kolejnego etapu (A&A Biotechnology, Polska, Gdańsk). Produkty PCR sekwencjonowano przy użyciu "Big Dye Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit" i 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę z Komisji Etycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Świadoma zgoda, w tym zgody na badania genetyczne została uzyskana od każdego pacjenta.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu Manna -Whitneya. Wartości $p < 0,05$ uznano za statystycznie znaczącą. W badaniach używano programu Statystyka 10,0 dla systemu Windows (StatSoft Inc, Tulsa, USA).

WYNIKI

Genotyp CC stwierdzono u 16 pacjentów, natomiast CT i TT polimorfizmu rs12979860 odpowiednio u 20 i 5

chorych. U dwudziestu dwóch pacjentów stwierdzono zakażenie genotypem 1 HCV, u siedmiu - genotypem 4 i również u siedmiu - genotypem 3. W trakcie obserwacji pacjentów, HCV - RNA stał się niewykrywalny u pięciu pacjentów, wszystkich z genotypem CC rs12979860 (31%). U tych pacjentów nie określono genotypu HCV. Nie obserwowano eliminacji HCV u pacjentów z genotypami nie - CC rs12979860. Wyjściowe stężenie HCV - RNA u pacjentów CC (88546 ± 74181 IU / ml) było znamienne niższe w porównaniu do pacjentów z genotypami nie - CC (726021 ± 30709 IU/ml, $p = 0,048$). Stężenie HIV - RNA było niższe wśród pacjentów z CC w porównaniu do chorych z genotypami nie - CC, ale różnica nie była istotna statystycznie (32073 ± 9165 vs. 52735 ± 17730 IU/ml). Nie stwierdzono istotnych różnic między liczbą CD3, CD4 i CD8 pacjentów z genotypami CC i nie - CC (Tab.1).

DYSKUSJA

Pierwsze publikacje wykazujące korzystny wpływ genotypu CC rs8099917 na spontaniczną eliminację HCV oraz skuteczność leczenia przeciwwirusowego chorych z genotypem 1 HCV, a zakażonych HIV/HCV zostały opublikowane w 2010 roku (6). Jednak publikacje na temat spontanicznej eliminacji zakażenia HCV wśród zakażonych HCV/HIV są sporadyczne. *Sajadi* wsp. (7) wskazali na brak związku między zakażeniem HIV, jego wirusiem, a polimorfizmem rs12979860, ale z istnieniem prawdopodobieństwa spontanicznej eliminacji HCV wśród chorych z koinfekcją HCV/HIV z genotypem CC rs12979860. Wyniki badań własnych wydają się potwierdzać taką sytuację. W badaniach własnych wykazano znacznie mniejszą wirusiem HCV wśród chorych z genotypem CC w porównaniu do chorych z genotypami nie - CC, co samo w sobie wskazuje na możliwość samoistnej eliminacji HCV. Można przyjąć, że genotyp CC rs12979860 może być użytecznym predyktorem klirensu HCV wśród chorych z koinfekcją HCV/HIV (8). Jednak, aby potwierdzić tę koncepcję powinny być przeprowadzone szerokie, wieloletnie badania prospektywne w tej populacji. *Lunge* wsp. (9) stwierdzili spontaniczną eliminację HCV u 24,6% Brazylijczyków żyjących z HIV/HCV, znamienne częstszą wśród pacjentów z genotypem CC. W badaniach *Clausen'a* wsp. (10) opisano po raz pierwszy częstą spontaniczną eliminację HCV (23%) wśród Europejczyków zakażonych jednocześnie HCV/HIV z genotypem CC (23%).

PODSUMOWANIE

Genotyp CC miejsca polimorficznego rs12979860 może wpływać na niższą wirusiem HCV w porówna-

niu z pacjentami z genotypami CT i TT oraz sprzyja spontanicznej eliminacji zakażenia HCV u chorych współzakażonych HIV/HCV. Polimorfizm rs12979860 nie ma wpływu na BMI, wiremę HIV i liczbę subpopulacji limfocytów wśród współzakażonych zakażonych HIV/HCV.

Otrzymano: 02.04.2013 r

Zaakceptowano do druku: 22. 05.2013 r

Adres do korespondencji:

Tadeusz Wojciech Łapiński
15-134 Białystok ul. Żurawia 14
e-mail twlapinski@wp.pl