

IL28B CC genotípus: védő tényező és az interferonválasz prediktora krónikus hepatitis C-vírus- infekcióban

Pár Alajos dr.^{1*} ■ Pár Gabriella dr.^{1*} ■ Tornai István dr.⁵
Szalay Ferenc dr.⁶ ■ Várszegi Dalma dr.² ■ Fráter Edit dr.⁵
Papp Mária dr.⁵ ■ Lengyel Gabriella dr.⁷ ■ †Fehér János dr.⁷
Varga Márta dr.⁸ ■ Gervain Judit dr.⁹
Schuller János dr.¹⁰ ■ Nemes Zsuzsanna dr.¹ ■ Péterfi Zoltán dr.¹
Tusnádi Anna dr.¹¹ ■ Hunyady Béla dr.^{1,12} ■ Haragh Attila dr.¹²
Szinku Zsolt dr.¹² ■ Pálinkás László dr.³ ■ Berki Tímea dr.³
Vincze Áron dr.¹ ■ Kisfali Péter dr.⁴ ■ Melegh Béla dr.^{1,5}

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvos- és Egészségtudományi Centrum,

¹I. Belgyógyászati Klinika, ²Dermatológiai Klinika,

³Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, ⁴Orvosi Genetikai Intézet, Pécs

⁵Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. Belgyógyászati Klinika, Debrecen

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar,

⁶I. Belgyógyászati Klinika, ⁷II. Belgyógyászati Klinika, Budapest

⁸Réthy Pál Kórház, Békéscsaba

⁹Szent György Kórház, Székesfehérvár

¹⁰Fővárosi Önkormányzat Egyesített Szent István és Szent László Kórház, Budapest

¹¹Hetényi Géza Kórház, Szolnok

¹²Kaposi Mór Oktató Kórház, Kaposvár

Bevezetés: Krónikus hepatitis C-vírus-fertőzésben a citokinek kódoló génvariánsok szerepének kutatása az érdeklődés előterébe került. **Célkitűzés:** A szerzők krónikus hepatitis C-vírus-fertőzöttekben vizsgálták az IL28B-polimorfizmusok előfordulását és az egyes variánsok hatását az interferonalapú antivirális kezelés kimenetelére. Meghatározták az összefüggést az IL28B genotípusok és a betegek perifériás vérében az aktivált monocyták és lymphocyták Th1/Th2 citokin termelése között. **Módszer:** A genetikai tanulmányba 748 krónikus hepatitis C-vírus-fertőzött egyént vontak be. Közülük 420 beteget kezeltek pegilált interferon alfa 2a/2b injekcióval és per os ribavirinnel 24–72 héten át. A kezelés utáni követési időszak tartama 24 hét volt. A peginterferonnal és ribavirinnel kezelt betegek közül 195 (46,4%) ért el tartós virológiai választ, vagyis 24 héttel a kezelés befejezése után hepatitis C-vírus-RNS-negativitást. Kontrollként 105 egészséges egyén szolgált, normális májpróbákkal és negatív hepatitis B- és C-vírus, valamint humán immundeficienciavírus-szerológiaiával. Genotipizáltak még 475 egészséges roma egyént (230 férfi, 245 nő, átlagéletkor 47±8 év). Az IL28B rs12979860 polimorfizmust Custom Taqman SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster, CA, USA) segítségével határozták meg. A Th1/Th2 citokinszint-vizsgálatokhoz 40 hepatitis C-vírus-fertőzött beteg TLR-4 ligand lipopoliszacharidával aktivált perifériás vér monocytáinak, valamint PMA+Ionomycin stimulált lymphocytáinak tumornekrózis-faktor- α -, interleukin-2-, interferon- γ -, interleukin-2- és interleukin-4-termelését mérték a sejtek felülírszójában FACS-CBA, Becton–Dickinson-teszttel. **Eredmények:** Az IL28B rs12979860 CC genotípus hepatitis C-vírus-fertőzött betegekben kisebb gyakorisággal fordult elő, mint a kontrollban (26,1% vs. 51,4%, OR 0,333, $p < 0,001$), míg a T-allél a betegekben volt gyakoribb (73,9% vs. 48,6%, OR 3,003, $p < 0,001$). Az IL28B CC genotípusú peginterferonnal és ribavirinnel kezelt betegekben a tartós virológiai válasz aránya 58,6%, a CT genotípusúakban 40,8% (OR 2,057, $p = 0,002$), míg a

*A két szerző a kézirat elkészítésében egyenlő arányban vett részt.

T-allélt hordozókban 41,8% volt (OR 1,976, $p = 0,002$). Az aktivált monocyták tumornekrózis-faktor- α -termelése magasabb volt IL28B CC genotípusú betegeknél, mint a nem CC genotípusúak esetében ($p < 0,01$). Hasonlóképpen, az aktivált lymphocyták tumornekrózis-faktor- α -, interleukin-2- és interferon- γ -termelése is szignifikánsan magasabb volt IL28B CC-hordozó egyénekben ($p < 0,01$). *Következtetések:* Az IL28B CC protektív hatású krónikus hepatitis C-vírus-fertőzéssel szemben, és pozitív prediktora a tartós virológiai válasznak az interferonalapú antivirális terápia során. Hepatitis C-vírus-fertőzött betegeknél IL28B CC genotípus esetén fokozott Th1 citokin termelése indukálható a perifériás vér monocytáiban és lymphocytáiban, ami szerepet játszhat a vírus gyors immunológiai kontrolljában és a tartós virológiai válasz létrejöttében. *Orv. Hetil., 2013, 154, 1261–1268.*

Kulcsszavak: hepatitis C-vírus, IL28B-polimorfizmus, interferon, tartós virológiai válasz, Th1/Th2 citokinek

IL28B CC genotype: a protective factor and predictor of the response to interferon treatment in chronic hepatitis C virus infection

Introduction: In chronic hepatitis C-virus infection the possible role of gene variants encoding cytokines has become the focus of interest. *Aim:* The aim of the study was to investigate the effect of IL28B polymorphisms on the outcome of chronic hepatitis C-virus genotype 1 infection in the Hungarian population. In addition, the association between IL28B genotypes and the Th1/Th2 cytokine production of activated peripheral blood monocytes and lymphocytes was evaluated. *Method:* Total of 748 chronic hepatitis C-virus genotype 1 positive patients (365 males and 383 females, aged between 18 and 82 years; mean age, 54 ± 10 years) were enrolled, of which 420 patients were treated with pegylated interferon plus ribavirin for 24–72 weeks. Of the 420 patients, 195 patients (46.4%) achieved sustained virological response. The IL28B rs12979860 polymorphism was determined using Custom Taqman SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster, CA, USA). For cytokine studies, tumour necrosis factor- α , interleukin-2, interferon- γ , interleukin-2 and interleukin-4 production by LPS-stimulated monocytes and PMA-ionomycin activated lymphocytes were measured from the supernatant of the cells obtained from 40 hepatitis C-virus infected patients, using FACS-CBA Becton Dickinson test. The cytokine levels were compared in patients with different (CC, CT, TT) IL28B genotypes. *Results:* The IL28B rs12979860 CC genotype occurred in lower frequency in hepatitis C-virus infected patients than in healthy controls (26.1% vs 51.4%, OR 0.333, $p < 0.001$). Patients carried the T allele with higher frequency than controls (73.9%, vs 48.6%, OR 3.003, $p < 0.001$). Pegylated interferon plus ribavirin treated patients with the IL28B CC genotype achieved higher sustained virological response rate than those with the CT genotype (58.6% vs 40.8%, OR 2.057, $p = 0.002$), and those who carried the T allele (41.8%, OR 1.976, $p = 0.002$). LPS-induced TLR-4 activation of monocytes resulted in higher tumour necrosis factor- α production in patients with the IL28B CC genotype compared to non-CC individuals ($p < 0.01$). Similarly, increased tumour necrosis factor- α , interleukin-2 and interferon- γ production by lymphocytes was found in the IL28B CC carriers ($p < 0.01$). *Conclusions:* The IL28B CC genotype exerts protective effect against chronic hepatitis C-virus infection and may be a pretreatment predictor of sustained virological response during interferon-based antiviral therapy. The IL28B CC polymorphism is associated with increased Th1 cytokine production of activated peripheral blood monocytes and lymphocytes, which may play a role in interferon-induced rapid immune control and sustained virological response of pegylated interferon plus ribavirin treated patients. *Orv. Hetil., 2013, 154, 1261–1268.*

Keywords: hepatitis C-virus, IL28B gene polymorphism, interferon, Th1/Th2 cytokine production, sustained virological response

(Beérkezett: 2013. június 11.; elfogadva: 2013. június 27.)

Rövidítések

DAA = (direct acting antiviral) direkt ható antivirális szer; GWAS = (genome-wide association study) teljes genomtársulás vizsgálata; HCV = hepatitis C-vírus; HLA = humán leukocyt-antigén; IFN = interferon; IL = interleukin; KIR = killer sejt immunglobulinszerű receptor; LPS = lipopoliszacharid; MHC = fő hisztokompatibilitási komplex; NK-sejt = (natural killer) természetes ölósejt; PEG-IFN = pegilált IFN; PMA = phorbol myristate acetate; RBV = ribavirin; SNP = (single nu-

cleotide polymorphism) egy nukleotidot érintő polimorfizmus; SVR = (sustained virological response) tartós virológiai válasz; Th = T-helper; TNF = tumornekrózis-faktor

A hepatitis C-vírus- (HCV-) fertőzés a világon 170 millió embert érint, és okozója lehet a tünetmentes vírushordozástól a krónikus hepatitisen át a cirrhosishoz és a hepatocellularis carcinomáig, egyben a leggyako-

ribb indikációja a májtranszplantációnak [1]. A HCV-infekció kimenetelét meghatározó tényezők között – a vírus sajátosságai és bizonyos környezeti faktorok mellett – kulcsfontosságú a gazdaszervezet immunreakciója. A HCV eliminálása egyrészt a *természetes* (innate) immunválasz, másrészt az *adaptív*, poliklonális CD4 és CD8 T-sejt-válasz függvénye. E folyamatokban jelentősek egyrészt az antigén-prezentációban részt vevő *fühisztokompatibilitási komplex* (MHC) molekulái, másrészt az immunsejtek által termelt *citokinek*, amelyek expressziója genetikai kontroll alatt áll [2]. Korábban vírushepatitisekben elsősorban a *humán leukocita-antigének* (HLA) és a betegség-társulás összefüggéseit vizsgálták [3, 4, 5], ilyen adatokat magunk is közöltünk [6]. Ugyanakkor a *citokinek* kódoló *génvariánsok* szerepe is az érdeklődés előterébe került [7]. Az utóbbit illetően mérőföldkőnek számít, hogy az úgynevezett *teljes géntársulás tanulmány* (genome-wide association study – GWAS) módszerével és az egy nukleotidot érintő polimorfizmusok (single nucleotide polymorphism – SNP) analízisével igazolták az interleukin-28B (IL-28B) (interferon-lambda-3, IFN- λ 3) génrégió közelében lévő génvariánsok hatását a HCV spontán [8] és terápia indukálta [9, 10, 11, 12] eliminációjára. Az e téren végzett első hazai vizsgálatokról magunk nemzetközi fórumon is beszámoltunk [13, 14], majd folytatásképpen országos, multicentrikus tanulmány keretében több mint hétszáz krónikus C-hepatitises beteg IL28B genotipizálását végeztük el. Jelen munkánkban ezeket az eredményeket ismertetjük, amelyek megerősítették előzetes közlésünk adatait, miszerint az IL28B CC genotípus egyrészt védő tényező lehet a HCV-infekcióval szemben, másrészt az interferon- (IFN-) alapú antivirális kezelés pozitív prediktora. Ezenkívül dolgozatunkban bemutatjuk azokat az immunológiai vizsgálatainkat, amelyekben az IL28B genotípusok, valamint a perifériás vér aktivált monocytáinak és lymphocytáinak Th1/Th2 citokin termelése közötti összefüggést kívántuk megállapítani HCV-fertőzöttekben.

Betegek és módszerek

Betegek

A genetikai vizsgálatokba 748 HCV-fertőzött beteget (365 férfi, 383 nő, 18–82 éves korú egyén, átlagéletkor 54 ± 10 év) vontunk be. Közülük 420 beteget kezeltünk *pegilált interferon alfa 2a/2b* injekcióval (Pegasys, Hoffmann-La Roche Inc./Pegintron, SP Labo N. V. Belgium) $135\text{--}180 \mu\text{g}/1,0\text{--}1,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ sc. hetente), és per os *ribavirin*nel (RBV) (Copegus, Hoffmann-La Roche Inc./Rebetol, SP Labo N. V. Belgium), testsúlytól függően $1000\text{--}1200 \text{ mg}/\text{napi dózisban}$ $24\text{--}72$ héten át. A kezelés utáni követési időszak tartama 24 hét volt. A peginterferon- (P-) és RBV-kezelt (P/R) betegek közül 195 (46,4%) ért el tartós virológiai választ (sustained virological response – SVR), vagyis 24 héttel a kezelés befejezése után HCV-RNS negativitást.

Kontrollként 105 egészséges egyén (64 férfi, 41 nő, átlagéletkor 45 ± 3 év) szolgált, önkéntes véradók normális májpróbákkal és negatív HBV-, HCV- és HIV-szerológiaiával. Genotipizáltunk még 475 egészséges roma egyént (230 férfi, 245 nő, átlagéletkor 47 ± 8 év).

A krónikus C hepatitis diagnózisát >6 hónapon át fennálló kóros transzamináz- (GPT-) értéken vagy $>F2$ fibrosis, valamint az anti-HCV és HCV-RNS pozitivitás alapján állítottuk fel. Az anti-HCV kimutatása ELISA-technikával, a HCV-RNS valós idejű reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) történt. A HCV-betegek 70%-ában készült percutan májbiopszia. *Gervain és mtsai* szerint Magyarországon a vizsgálatok idején a HCV-betegek $>95\%$ -a HCV1-genotípussal (HCV1) fertőzött [15].

Genotipizálás

Az EDTA-val antikoagulált teljes vérből a DNS-t standard kisozásos módszerrel izoláltuk. Az IL28B rs12979860 SNP-t Custom Taqman SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster, CA, USA) segítségével határoztuk meg, a használati utasítás szerint.

Immunológiai vizsgálatok

Negyven krónikus C hepatitiszes beteg perifériás vérmintáiból a mononukleáris sejteket (PBMC) Ficoll-Hypaque-gradienssel izoláltuk. Egymillió sejtet $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ *E. coli* 0127–B8 lipopoliszachariddal (LPS) (a TLR-4 természetes ligandja) vagy $25 \text{ ng}/\text{ml}$ PMA és $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Ionomycinnel (Sigma-Aldrich) stimuláltunk 10%-os FCS-t tartalmazó RPMI mediumban (Gibco, Life Technologies) 24 órán át 37 Celsius-fokon. A stimuláció után centrifugálással elkülönítettük a felülülőzt és azonnal vizsgáltuk: Th1/Th2 Cytokin CBA Kit (Becton Dickinson Biosciences) alkalmazásával mértük a sejtek IL-2-, IL-4-, IL-6-, TNF- α - és IFN- γ -képzését, a gyártó instrukcióinak megfelelően, FACS Calibur citométerben. Az adatokat FCAP Array programmal elemeztük (Slow Flow Hungary Kft.) [16]. Vizsgáltuk a citokinszintek alakulását a különböző (CC, CT, TT) IL28B genotípusú betegek csoportjaiban.

A vizsgálatok az 1975-ös Helsinki Deklaráció elveinek megfelelően történtek, az ETT Kutatás-Értékelési Bizottságának (ETT TUKEB Budapest, No 490/010) és a Pécsi Tudományegyetem Regionális Etikai Bizottságának a jóváhagyásával. A részt vevő betegek felvilágosítás után írásbeli beleegyezésüket adták.

Statisztikai értékelés

A statisztikai számításokat SPSS 16.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) alkalmazásával végeztük. Az IL28B allél- és genotípusgyakoriság összehasonlítására

1. táblázat | IL28B genotípusok megoszlása egészséges egyénekben és krónikus hepatitis C-vírus-fertőzött betegekben

| IL28B genotípus | HCV1 (n = 748) | Kontroll (n = 105) | OR |
|-------------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| CC | 195 (26,1%)* | 54 (51,4%) | 0,333 (0,22–0,505) p<0,001* |
| CT | 411 (54,9%)* | 39 (37,1%) | 2,064 (1,354–3,145) p = 0,001* |
| TT | 142 (19,0%) | 12 (11,4%) | 1,816 (0,969–3,404) p = 0,059 |
| T-allél (nem CC genotípus) | 553 (73,9%)* | 51 (48,6%) | 3,003 (1,981–4,552) p<0,001* |

Pearson's χ^2 -próbát használtunk. Binary logistic regression analysis történt a polimorfizmusok individuális szerepének meghatározására. A p<0,05 értéket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

Génpolimorfizmusok

Az egészséges populáció és a HCV-betegek IL28B genotípus frekvenciamegoszlását vizsgálva kimutattuk, hogy a CC genotípus szignifikánsan ritkábban fordult elő a betegekben, mint a kontrollban, ami a CC genotípus védőhatására utalt. Ugyanakkor a CT heterozigóta genotípus és a T-allél gyakoribb volt a HCV-betegekben, ami a T-allél hajlamosító szerepét jelezte (1. táblázat).

A roma populációban a kontrollcsoporthoz hasonló IL28B-genotípusmegoszlást találtunk. (Az IL28B CC genotípus 51,9%; a CT genotípus 36,5% és a TT genotípus 11,6% gyakorisággal fordult elő roma egyénekben.)

A P/R kezelt IL28B CC genotípusú betegek magasabb arányban értek el virológiai gyógyulást (SVR), mint a CT genotípusú (58,6% vs. 40,8%, p = 0,002) vagy a T-allélt hordozó betegek (41,8%, p = 0,002) (2. táblázat).

2. táblázat | Tartós virológiai válasz (SVR) előfordulása pegilált interferon- és ribavirininterápiára különböző IL28B genotípusú krónikus hepatitis C-vírus-fertőzött betegekben

| IL28B genotípus | Kezelték n | SVR (virológiailag gyógyultak) | |
|----------------------------|---------------|--------------------------------|--------|
| | | Betegek száma | % |
| CC | 116 | 68 | 58,6% |
| CT | 228 | 93 | 40,8%* |
| TT | 76 | 34 | 44,7% |
| T-allél (nem CC genotípus) | 304 | 127 | 41,8%* |

IL28B CC vs. CT OR: 2,057 (1,305–3,236), p = 0,002*

IL28B CC vs. TT OR: 1,751 (0,975–3,134), p = 0,059

IL28B CC vs. T (nem CC genotípus) OR: 1,976 (1,263–3,058), p = 0,002*

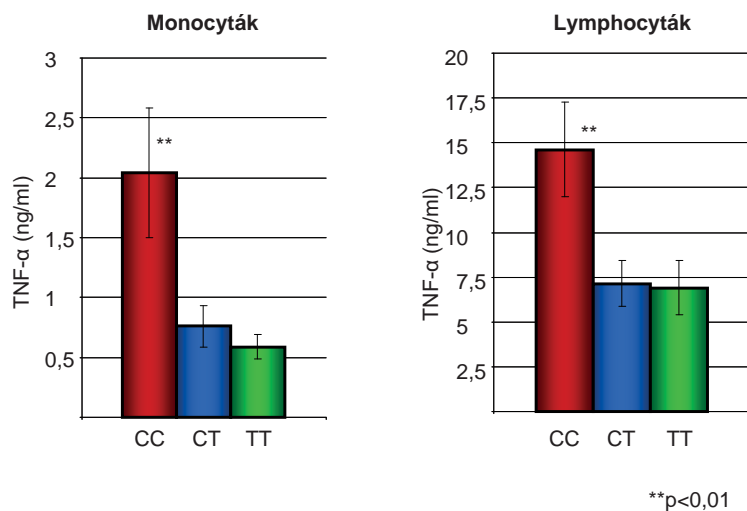
Immunológiai vizsgálatok

A TLR4-en LPS-sel aktivált monocyták és lymphocyták TNF- α -termelése szignifikánsan magasabb volt IL28B CC genotípusú betegekben, mint nem CC genotípusúak esetén (p<0,01) (1. ábra). Hasonlóképpen, a PMA+Ionomycin stimulált lymphocyták IL-2- és IFN- γ -termelése is szignifikánsan magasabb volt IL28B CC genotípusú betegekben (p<0,01) (2. ábra).

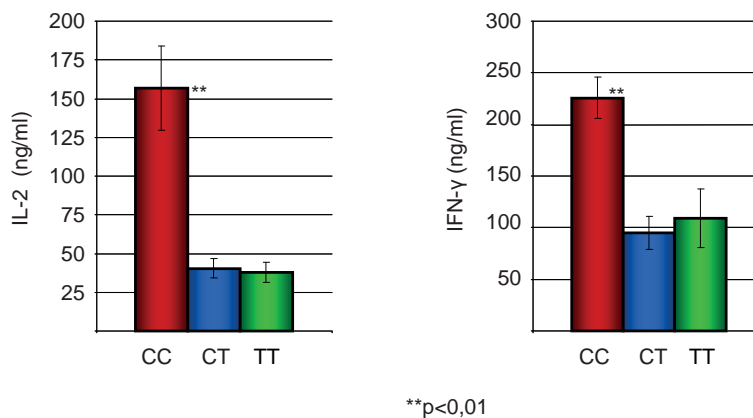
Megbeszélés

Nagyszámú krónikus C-hepatitises beteg IL28B-genotípusa megerősítette korábbi előzetes vizsgálataink következtetéseit, miszerint az IL28B CC genotípus egyrészt védő hatású genetikai tényező HCV1-infekcióban, másrészt a peginterferon plusz ribavirin (P/R) kezelés során az SVR pozitív prediktora. A CC genotípus HCV1-fertőzöttekben ritkábban fordult elő, mint az egészséges kontrollnépességben (26,1% vs. 51,4%, OR: 0,333), ez a CC variáns protektív szerepére utalt. Ugyanakkor az SVR aránya szignifikánsan magasabbnak bizonyult az IL28B CC-hordozó P/R kezelt betegekben, mint a nem CC egyénekben (58,6% vs. 41,8%, OR: 1,976). Ezek az eredmények, tudomásunk szerint, az első, Kelet-Közép-Európából származó adatok az IL28B és HCV-infekció kapcsolatát illetően, amelyek egyébként megfelelnek más régiókból történt közléseknek [9, 10, 11, 12], és arra utalnak, hogy az IL28B-genotípus hasznos kiegészítő vizsgálat lehet a HCV antivirális kezelése során.

Az IL-28B (IFN- λ 3) 200 aminosavból álló fehérje, a III-as típusú IFN- λ család tagja, Th1 citokin. A mononukleáris és dendritikus sejtek termelik vírusinfekcióra vagy kettős fonalú RNS hatására. Az IFN- λ 3 strukturálisan távoli kapcsolatot mutat az IL-10 molekulával, korlátozott a szekvenciahasonlósága és a funkcionális sajátossága az I-es típusú (α és β) IFN-ekkel. Szerepet játszik az intracelluláris IFN-stimulált gén (ISG-) expresszió regulációjában. Antivirális sajátosságú, mint az IFN- α , de enyhébb a toxicitása, mert az IL-28B receptorok kevesebb sejttípuson expresszálódnak, döntően hepatocytákon, epithelsejteken. Az IL-28B receptor α - és



1. ábra | A TLR4-en aktivált perifériás mononukleáris sejtek TNF- α -termelése különböző IL28B genotípusokban



2. ábra | PMA+Ionomycin stimulált lymphocytták IL-2- és IFN- γ -termelése

β -láncból áll, a jelátvitelben az IL-10R- β és IL-28R- α heterodimer szerepel. A HCV és az IFN- α is fokozza az IFN- λ -expressziót. Az IFN- λ aktiválja a Jak/STAT utat, indukál számos IFN-stimulált gént (ISG), fokozza az ISG és az oligoadenilinszintázszerű gén expresszióját, az NK-aktivitást és az antigén-specifikus CD8 T-sejt citotoxicitását. Az eredmény: gátolt a vírusreplikáció és a virális fehérjeszintézis [17, 18, 19, 20, 21].

Az *IL28B* gén a 19q kromoszómán található. *Ge* és *mtsai* 1137 pegilált interferon (PEG-IFN) plusz ribavirin (RBV) kezelt HCV-beteg DNS-mintáin több mint 500 000 egy nukleotidot érintő polimorfizmust (SNP) elemeztek, és az IFN- λ 3-at kódoló IL-28B gén régiójában hét olyan variánszt találtak, amelyek kapcsolatot mutattak az IFN-terápiára adott válasszal. Közülük a legfontosabbnak az rs12979860 SNP bizonyult: ennek CC (cisztein) genotípusa esetén a PEG-IFN plusz RBV (P/R) kezelés kétszer hatékonyabb volt, mint a TT (treonin) variáns mellett. Azt is kimutatták, hogy az afroamerikai etnikumú betegekben alacsony a CC és magas a TT genotípus prevalenciája, ami (részben) magyarázhatja az e populációban ismert alacsonyabb gyó-

gyulási arányt az IFN-alapú anti-HCV-kezelésre. A CC genotípus ritkábban fordult elő HCV1 genotípusú betegekben, mint egészségesekben, ami a variáns *protektív hatására* utalt [9]. Mindezt többen megerősítették [10, 11, 12, 13], és magunk is ezt találtuk. Mások pedig azt igazolták, hogy a CC variáns hajlamosít a HCV-infekció spontán gyógyulására is [8].

Thompson és mtsai [22] elemzése szerint P/R kezelés alatt a gyors (négyhetes) virológiai válasszal (RVR) reagáló HCV1-betegek között magas volt a gyógyulás (tartós virológiai válasz, SVR) aránya, függetlenül az IL28B genotípustól. Akik viszont nem mutattak ugyan RVR-t, de IL-28B CC genotípusúak voltak, kétszer nagyobb arányban gyógyultak, mint a nem CC-betegek. Az IL28B CC tehát prediktívnek bizonyult az SVR-re akkor is, ha nem volt RVR. (A kinetikai leletek arra utaltak, hogy a CC genotípus a 12 héten belüli víruseliminációra volt hatással.) Az SVR tekintetében ily módon az IL28B CC genotípus mint *negatív prediktor* érzékenyebb, mint az RVR, ez utóbbi viszont érzékenyebb *pozitív prediktor*. Az RVR felülírja a genetikai marker pozitív prediktív értékét, és a legfontosabb kezelés alatti

3. táblázat | Tartós virológiai válasz (SVR) aránya IL28B (rs12979860) genotípusok szerint proteázinhibitorokkal folytatott hármas kombinációs (P/R+DAA) kezelések esetén

| Boceprevir (BOC) | | | | |
|---|--------|-----|-----|-----|
| | Összes | CC | CT | TT |
| SPRINT-2 [33] (BOC, kezeletlen betegek) | | | | |
| Kontroll (P/R48) | 38% | 78% | 28% | 27% |
| BOC44/P/R48 | 66% | 80% | 71% | 59% |
| RESPOND-2 [34] (BOC, már kezelt, de nem gyógyult betegek) | | | | |
| Kontroll (P/R48) | 21% | 46% | 17% | 50% |
| BOC44/P/R48 | 66% | 77% | 73% | 72% |
| Telaprevir (TVR) | | | | |
| | Összes | CC | CT | TT |
| ADVANCE [35] (TVR, kezeletlen betegek) | | | | |
| Kontroll (P/R48) | 38% | 64% | 25% | 23% |
| TVR12/P/R48 | 78% | 90% | 71% | 73% |
| REALIZE [36] (TVR, már kezelt, de nem gyógyult betegek) | | | | |
| Kontroll (P/R48) | n.a. | 29% | 16% | 13% |
| TVR12/P/R48 | n.a. | 79% | 60% | 61% |

P/R48 = 48 hetes peginterferon plusz ribavirin kezelés; BOC44 = 44 hetes boceprevir; TVR12 = 12 hetes telaprevirkezelés; n.a. = nincs adat.

(on-treatment) prognosztikai mutató [23]. HCV1-infekcióban az SVR-t illetően az rs12979860 CC genotípus 75%-os specificitásának és 65%-os érzékenységnének bizonyult [22].

Az IL28B gén közelében egyébként az rs12979860 SNP-n kívül további polimorfizmusokat is kimutattak. *Tanaka és mtsai* japán [11], *Rauch és mtsai* [12] pedig európai HCV1-betegekben igazoltak olyan major IL28B SNP-t (rs80999917G), amely *negatívan* befolyásolta a P/R kezelésre bekövetkező SVR-t. Feltételezik, hogy mindezek a polimorfizmusok kapcsoltsági kiegyensúlyozatlanságban (linked disequilibrium) vannak a legfontosabbnak tekintett rs12979860 variánsal [9, 12].

Nem tisztázott a mechanizmus, amely által az IL28B az antivirális választ befolyásolja. Az IFN- λ az IFN- α -tól eltérő jelátviteli utat képvisel a természetes immunvédelemben [17]. Kostimulációs kísérletben IFN- λ additív hatásának bizonyult az IFN- α -val, rekombináns IFN- λ 1 antivirális aktivitását pedig *in vivo* is kimutatták HCV1-fertőzésben [18, 19, 20, 21].

Az IL28B-polimorfizmus „rossz válasz” alléljei (rs80999917G és rs12979860T) esetén a perifériás vér mononukleáris sejtjein és a májszövetben is igazolták az IL28B csökkent expresszióját, ami összefüggött a gyengült IFN-válasszal [10, 11]. Az IL28B TT genotípussal az NK inhibitorreceptor-expresszió fokozódása is társult [24, 25]. Ezzel szemben az IL28B CC-t hordozó HCV-betegek májában fokozott necroinflammációt, a szérumban magas ALT-értéket is leírtak, aminek a hátterében az alacsony endogén IFN-aktivitást (alacsony ISG-expressziót), elégtelen antivirális választ és fokozott vírusreplikációt tételeznek fel, és ez magyarázhatja az ilyen esetekben észlelt magas szérumban HCV-RNS-szintet is [26]. Jelen munkánkban kimutat-

tuk, hogy HCV-betegekben a perifériás vér aktivált monocytáinak és lymphocytáinak Th1-citokin-termelése szignifikánsan magasabb volt IL28B CC esetén, mint nem CC genotípusú betegekben. Ez pozitív szerepet játszhat a HCV1 rapid immunológiai kontrolljában és a SVR-ben. Korábban már igazoltuk, hogy a HCV-betegek P/R kezelése előtt a TLR-4-aktivált monocyták TNF- α - és IL-6-termelése szignifikánsan magasabb volt azokban, akik a terápiára később rapid virológiai válasszal (RVR) reagáltak [27].

Az IL28B és az interferonstimulált gén (ISG) aktiválása közötti kapcsolatot illetően igazolták, hogy az IFN-kezelésre *nem reagáló*okban a jelátviteli utak és az ISG aktiváltak. A fokozott ISG-expresszió esetén az endogén IFN-út refrakter stádiumban van, nem hat az exogén IFN. Az ISG-expressziót szignifikánsan magasabbnak találták a nem reagálóokban, mint az IFN-re gyógyulóokban [26].

Asselah és mtsai HCV-betegek P/R kezelés előtti májbiopsziás mintáiban 58 gén expresszióját vizsgálták és három ISG (IFI-6-16, IFI27 és ISG15) fokozott expresszióját találták IFN-re nem reagálóokban az IFN-re gyógyuló betegekhez képest. Az IFI27 és CXCL9 két génszignatúra 100%-os pontossággal jelezte a nem választ, és 70%-os pontossággal az SVR-t [28]. *Dill és mtsai* szerint bár a minor (TT) IL28B genotípus társul ugyan az ISG fokozott expressziójával, nem volt igazolható direkt kapcsolat az IL28B genotípus és az ISG-indukció között [29]. A fokozott ISG-expresszió (refrakter állapot) független volt az IL28B genotípustól: a különbség a nem reagáló és a gyógyuló között volt, nem pedig a CC vagy TT genotípust hordozók között. A fentiek alapján *az IL28B és az ISG az SVR independens prediktorainak* tekinthetők. A svájci szerzők HCV-be-

tegek májbiopsziás szövetmintáiban vizsgálták az ISG-expressziót, az IL28B-allélváriánsokat és az SVR alakulását. Az IL28B három polimorfizmusa (rs12979860T, rs8099917G és rs1298275G, úgynevezett minor allélek) mellett kvantitatív PCR-módszerrel mRNS-meghatározással a májszövetben 58 gén expresszióját vizsgálták. A legerősebb genetikai prediktornak egy négy génből álló csoport (IFI27, ISG15, RSAD2 és a HTATIP2) hepatitis expresszióját találták. A génexpresszió kvantifikációját a P/R terápia tervezéséhez alkalmasabbnak tartják, mint az IL28B genotípus meghatározását. Probléma, hogy biopsziás mintákra van szükség, a perifériás mononukleáris sejtek (PBMC) erre a vizsgálatra nem alkalmasak.

Az IL28B-génpolimorfizmusok mint *prognosztikai mutatók* szerepet kaptak a HCV-infekció antivirális kezelésében. Az IL28B-genotipizálás eszköz lehet az individualizált kezelés tervezésében, jelentősége azonban eltérő a P/R kettős kezelés és a direkt ható antivirális szerekkel (DAA) folytatott hármas kombinációs terápia kapcsán. A terápiás döntéshozatalban egyébként mindig tekintetbe kell venni a súlyosságot, tolerabilitást, az előző kezelésre kapott választ („null-response”) és a negatív prediktorokat (idős életkor, cirrhosis, obesitas, inzulinrezisztencia), amelyek csökkenthetik az SVR valószínűségét, az úgynevezett „jó válasz” IL28B CC genotípusban is. Negatív prediktorok jelenléte esetén a „való élet” körülményei között gyengülhet a genetikai tényező kedvező hatása. Az obszervációs tanulmányokban az IL28B CC-betegekben észlelt, a feltételezettnél alacsonyabb SVR azzal magyarázható, hogy a mindennapi gyakorlatban kezelt betegek nem szigorúan szelektált homogén csoportot képviselnek, hanem számos, említett kedvezőtlen tényező is jelen lehet, beleértve az elégtelen adherenciát. Mindez nem zárható ki a hazai multicentrikus vizsgálat esetén sem, ami a CC genotípusban észlelt (mérsékelt) 58%-os SVR-arányt illeti.

Az IL28B-génvariánsok vizsgálata a *kezelés előtt* – figyelembe véve a már ismert virális és gazdaszervezeti tényezőket is – értékes lehet korábban nem kezelt (naiv) betegek prognosztizálásában. A kezelés *alatt* azonban már az RVR a legfontosabb prediktor [23]. Az IL-28B CC genotípusú HCV-beteg várhatóan jól fog reagálni, ha nincsenek az említett negatív tényezők, ilyenkor a kezelést a P/R kettős kombinációval érdemes elkezdeni. A CC variáns ismerete fokozhatja mind a beteg, mind az orvos motiváltságát.

A „rossz válasz” (IL28B TT) genotípusú betegek számára, főleg korábbi nem reagálók vagy steatosis, illetve cirrhosis, magas HCV-RNS-szint vagy inzulinrezisztencia esetén, egyértelműen a direkt ható antivirális ágensekkel (DAA), például proteázgátlókkal kombinált terápia indikált.

A legújabb adatok alapján a *hármas kombináció* kapcsán korlátozottabb az IL28B prognosztikai jelentősége [30, 31, 32], és ez valószínűleg különösen érvényes lesz majd az IFN nélküli kezelésmódokban. Bár a „jó

válasz” genotípus itt is javítja a gyógyulás esélyét, de gyengébb a genetikai faktor prediktív szerepe, mint a kettős P/R terápia kapcsán: a „poor-response” genotípus esetén is jó SVR-arány érhető el. A P/R kezelés proteázgátlóval történő kombinációja „kivédi” a „rossz genotípus” negatív hatását [33, 34, 35, 36]: a 3. táblázat a nemzetközi vizsgálatok eredménye alapján ezt mutatja.

Ugyanakkor, az IL28 CC-variáns esetén lehetséges a kombinált kezelés időtartamának csökkentése: CC genotípusú, korábban nem kezelt, nem cirrhotikus betegekben a rövidebb tartamú terápia is hatásos volt: a 12 hetes proteázgátló telaprevir plusz P/R kombináció 100%-ban SVR-hez vezetett [37].

Akut C-vírus hepatitisben Thomas és mtsai azt állapították meg, hogy IL28B CC genotípusú betegekben háromszor ritkább volt a krónikussá válás, mint nem CC esetén [8]. *Tillmann és mtsai* [38] szerint anti-D-izomimmunizációval HCV-fertőzött nőkben a *spontán vírusclearance* (gyógyulás) aránya IL28B CC-betegekben 65%, CT esetén 24% és TT esetén 6% volt. A CC-hordozók gyakrabban voltak icterusosak a hepatitis során. A „rossz genotípus” (TT) ritkábban járt sárgasággal, de aki sárga volt, az jobban gyógyult. A szerzők felvetik, hogy akut C-hepatitisben IL28B CC esetén megengedhető három hónapos várakozás, mert >50% spontán gyógyulhat. Ugyanakkor, a nem CC genotípusú beteg azonnali kezelése indokolt lehet (főleg, ha nem volt icterusos), bár ezt eddig nem bizonyították.

Májtranszplantáció után a HCV-rekurrezcencia gyógyulási aránya P/R kezelésre 86%, ha a donor és a recipiens is IL28B CC genotípusú, 42–50%, ha egyikük IL28B CC genotípusú (a recipiens vagy a donor) és 16%, ha mindkettő TT-hordozó [39]. A májtranszplantációt követő HCV-reinfekcióban tehát mind a recipiens, mind a donor IL28B genotípusa befolyásolja az antivirális terápia hatékonyságát [40].

Következtetések

HCV-infekcióban a genetikai tényezők szerepét illetően, az IL28B-polimorfizmus felfedezése révén, olyan kezelés előtti prediktor birtokába jutottunk, amely a víruskinetikával együtt értékes mutató lehet a krónikus C-hepatitis IFN-alapú individualizált terápiájában. A hazai IL28B-genotipizálási eredmények HCV-betegeinkben megfelelnek az irodalomban közölteknek. Immunológiai vizsgálataink szerint IL28B CC genotípus esetén a nem CC variánshoz képest fokozott Th1 citokintermelés indukálható a perifériás vér monocytáiban és lymphocytáiban, ami szerepet játszhat a HCVI rapid immuneliminációjában és végeredményben az SVR kialakulásában.

Köszönetnyilvánítás

A munka OTKA-támogatással (K81454) készült. Köszönettel tartozunk *Dr. Polgár Noéminek* a statisztikai analízis elvégzéséért.

Irodalom

- [1] *Gravitz, L.*: Introduction: a smouldering public-health crisis. *Nature*, 2011, *474*, S2–S4.
- [2] *Dustin, L. B., Rice, C. M.*: Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, *25*, 71–99.
- [3] *Thimme, R., Neumann-Haefelin, C.*: Genetics in viral hepatitis: role of MHC class I and II alleles in hepatitis C virus infection. In: Blum, H. E., Cox, D. W., Haussinger, D. (eds.): *Genetics in liver disease*. Springer Verlag, Dordrecht, 2007, 18–31.
- [4] *Neumann-Haefelin, C., McKiernan, S., Ward, S.*: Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. *Hepatology*, 2006, *43*, 563–572.
- [5] *Carneiro, V. L., Lemaire, D. C., Bendicho, M. T., et al.*: Natural killer cell receptor and HLA-C gene polymorphisms among patients with hepatitis C: a comparison between sustained virological responders and non-responders. *Liver Int.*, 2010, *30*, 567–573.
- [6] *Pár, A., Paál, M., Horányi, M., et al.*: Are HLA B8, DR3, HLA DQ2 predisposing factors for chronicity in hepatitis C virus (HCV) infection and negative predictors of response to interferon-2b? *J. Hepatol.*, 1998, *28* (Suppl. 1), 119.
- [7] *Thio, C. L.*: Host genetic factors and antiviral immune responses to hepatitis C virus. *Clin. Liver Dis.*, 2008, *12*, 713–725.
- [8] *Thomas, D. L., Thio, C. L., Martin, M. P., et al.*: Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, 2009, *461*, 798–801.
- [9] *Ge, D., Fellay, J., Thompson, A. J., et al.*: Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 2009, *461*, 399–401.
- [10] *Suppiah, V., Moldovan, M., Aghlenstiel, N.*: IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alfa and ribavirin therapy. *Nat. Genet.*, 2009, *41*, 1100–1104.
- [11] *Tanaka, Y., Nishida, N., Sugiyama, M., et al.*: Genom-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.*, 2009, *41*, 1105–1109.
- [12] *Rauch, A., Kutalik, Z., Descombes, P., et al.*: Genetic variation in IL-28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genom-wide association study. *Gastroenterology*, 2010, *138*, 1338–1345.
- [13] *Pár, A., Kisfalvi, P., Melegh, B., et al.*: Genetic polymorphisms in IL-10R, IL-28B and LTA genes in HCV infection. Do they have protective role and predict sustained virological response? *J. Hepatol.*, 2010, *52* (Suppl. 1), S457.
- [14] *Pár, A., Kisfalvi, P., Melegh, B., et al.*: Cytokine (IL-10, IL28B and LTA) gene polymorphisms in chronic hepatitis C virus infection. *CEMED*, 2011, *5*, 9–19.
- [15] *Gervain, J., Simon, G. Jr., Simon, J., et al.*: Genotype distribution of hepatitis C virus in the Hungarian population with chronic viral hepatitis C. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2003, *15*, 449–450.
- [16] *Pár, G., Szereday, L., Berki, T., et al.*: Increased baseline proinflammatory cytokine production in chronic hepatitis C patients with rapid virological response to peginterferon plus ribavirin. *PLoS ONE*, 2013. In press.
- [17] *Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., et al.*: Interferon-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.*, 2003, *4*, 69–77.
- [18] *Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., et al.*: IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28B. *Nat. Immunol.*, 2003, *4*, 63–68.
- [19] *Rodek, M. D., Boyd, B. S., Chisari, F. V.*: Lambda-interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J. Virol.*, 2005, *79*, 3851–3854.
- [20] *Zhu, H., Butera, M., Nelson, D. R., et al.*: Novel type I interferon IL-28A suppresses hepatitis C viral RNA replication. *Virol. J.*, 2005, *2*, 80.
- [21] *Uzé, G., Monneron, D.*: IL-28 and IL-29: Newcomers to the interferon family. *Biochimie*, 2007, *89*, 729–734.
- [22] *Thompson, A. J., Muir, A. J., Sulkowski, M. S., et al.*: Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology*, 2010, *139*, 120–129.
- [23] *Fried, M. W., Hadziyannis, S. J., Shiffman, M. L., et al.*: Rapid virological response is the most important predictor of sustained virological response across genotypes in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, 2011, *55*, 69–75.
- [24] *Khakoo, S. I., Thio, C. L., Martin, M. P., et al.*: HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*, 2004, *305*, 872–874.
- [25] *Carneiro, V. L., Lemaire, D. C., Bendicho, M. T., et al.*: Natural killer cell receptor and HLA-C gene polymorphisms among patients with hepatitis C: a comparison between sustained virological responders and non-responders. *Liver Int.*, 2010, *30*, 567–573.
- [26] *Soriano, V., Poveda, E., Vispo, E., et al.*: Pharmacogenetics of hepatitis C. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012, *67*, 523–529.
- [27] *Par, G., Berki, T., Palinkas, L., et al.*: Pretreatment increased T-helper 1 type cytokine production of peripheral blood monocytes may predict rapid virological response to PEG-IFN+RBV therapy in patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.*, 2007, *46* (Suppl. 1), S174.
- [28] *Asselah, T., Bieche, I., Narguet, S., et al.*: Liver gene expression signature to predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gut*, 2008, *57*, 516–524.
- [29] *Dill, M. T., Duong, F. H., Vogt, J. E., et al.*: Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology*, 2011, *140*, 1021–1031.
- [30] *Jensen, D. M., Pol, S.*: IL28B genetic polymorphism testing in the era of direct acting antivirals therapy for chronic hepatitis C: ten years too late? *Liver Int.*, 2012, *32* (Suppl.1), 74–78.
- [31] *King, L. Y., Chung, R. T.*: IL28B testing in a rapidly changing world: Still relevant? *J. Hepatol.*, 2013, *58*, 847–849.
- [32] *Pol, S., Aerssens, J., Zeuzem, S., et al.*: Limited impact of IL28B genotype on response rates in telaprevir-treated patients with prior treatment failure. *J. Hepatol.*, 2013, *58*, 883–889.
- [33] *Poordad, F., McCone, J. Jr., Bacon, B. R., et al.*: Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.*, 2011, *364*, 1195–1206.
- [34] *Bacon, B. R., Gordon, S. C., Lawitz, E., et al.*: Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.*, 2011, *364*, 1207–1217.
- [35] *Jacobson, I. M., McHutchison, J. G., Dusheiko, G., et al.*: Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.*, 2011, *364*, 2405–2416.
- [36] *Zeuzem, S., Andreone, P., Pol, S., et al.*: Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N. Engl. J. Med.*, 2011, *364*, 2417–2428.
- [37] *Bronowicki, J. P., Hezode, C., Bengtsson, L., et al.*: 100% SVR in IL28B CC patients treated with 12 weeks of telaprevir, peginterferon and ribavirin in the PROVE2 trial. *J. Hepatol.*, 2012, *56* (Suppl. 2), S430–S431.
- [38] *Tillmann, H. L., Thompson, A. J., Patel, K., et al.*: A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. *Gastroenterology*, 2010, *139*, 1586–1592.
- [39] *Charlton, M. R., Thompson, A. J., Veldt, B. J., et al.*: Interleukin-28B polymorphisms are associated with histological recurrence and treatment response following liver transplantation in patients with hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 2011, *53*, 317–324.
- [40] *Clark, P. J., Thompson, A. J.*: Host genomics and HCV treatment response. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2012, *27*, 212–222.

(Pár Alajos dr.,
Pécs, Rákóczi u. 2., 7623
e-mail: alajos.par@aok.pte.hu)