

UNIVERSITATEA "OVIDIUS" DIN CONSTANȚA 2016

ȘCOALA DOCTORALĂ A FACULTĂȚII DE MEDICINĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ

TEZĂ DE DOCTORAT
- REZUMAT -

Conducător de doctorat:

Prof. Univ. Dr. SORIN RUGINĂ

Student- doctorand:

LOREDANA MARIANA GHEORGHE

UNIVERSITATEA "OVIDIUS" DIN CONSTANȚA 2016

ȘCOALA DOCTORALĂ A FACULTĂȚII DE MEDICINĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ

**CORELAȚII IMUNOLOGICE ȘI CLINICO-TERAPEUTICE ÎNTRE
VARIAȚIA SPECTRULUI GENETIC AL GAZDEI ȘI EVOLUȚIA
INFECȚIEI CU VIRUSUL HEPATITEI C**

Conducător de doctorat

Prof. Univ. Dr. **Sorin Rugină**

Student- doctorand:

Loredana Mariana Gheorghe

Motto:

"Somewhere, something incredible is waiting to be known.

Science is a way of thinking much more than it is a body of knowledge."

— Carl Sagan

Cuvinte cheie: HLA- antigenul leucocitar uman; alelele HLA-DRB1; alelele HLA-DQB1; virusul hepatitei C; terapia cu Peg Interferon-alpha/ Ribavirină- PegIFN- α / RBV

CUPRINS

INTRODUCERE	11
MOTIVAȚIA ȘI IMPORTANȚA CERCETĂRII	13
Cap 1. Stadiul actual al cunoașterii	16
1.1. Prevalența bolii	16
1.2. Epidemiologie	17
1.3 Evoluție și manifestări clinice	20
1.3.1. Introducere	20
1.3.2. Hepatita acută C	20
1.3.3. Hepatita cronică C	21
1.3.4. Evoluția clinică	22
Cap 2. Patogenie	27
2.1. Ciclul replicativ viral	27
2.2. Răspunsul imunologic în infecția cu HCV	30
Cap 3. Aspecte de genetică virală	33
3.1. Structura genomică a HCV	34
3.2. Distribuția globală și prevalența genotipurilor virale HCV	39
Cap 4. Tratamentul în hepatitele virale C	40
4.1. Terapia cu interferon și ribavirină în hepatita C	40
4.2. Definirea răspunsului la tratament	41
4.3. Factorii genetici ai gazdei implicați în răspunsul la terapia cu IFN	42
4.3.1. Genotipul viral ca factor de predicție pentru SVR	42
4.3.2. Implicarea regiunii de sensibilitate la interferon	43
4.3.3. Alte gene din calea de semnalizare a IFN	43
4.3.4. Importanța celulelor natural kiler (NK) în răspunsul la tratament	46

4.3.5. Genotipul IL28B, predictor al răspunsului la tratament în hepatita C	49
Cap 5. Organizarea Complexului Major de Histocompatibilitate	50
5.1. Organizarea genomică a regiunii MHC	51
5.2. Nomenclatura alelelor HLA	52
5.3. Gene și molecule HLA	57
Cap 6. Studii anterioare ce au raportat diferite asocieri HLA cu hepatita virală C	58
6.1. Alelele HLA cls. I asociate cu autolimitarea/ severitatea infecției cu HCV	58
6.2. Alelele HLA cls. II asociate cu autolimitarea/severitatea infecției cu HCV	60
6.3. Asocierea alelelor HLA cu răspunsul la terapia cu Interferon în hepatita C	61
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
Cap 1. Obiectivele lucrării	64
Cap 2. Metodologie generală	65
2.1. Alcătuirea studiului	65
2.1.1 Subiecții luați în studiu	66
2.2. Metode folosite în studiu	68
2.2.1. Fișa de lucru	68
2.2.2. Tehnici de laborator folosite	71
2.2.3. Metode de statistică folosite în realizarea studiului	75
Cap. 3. Studiul 1- Determinarea distribuției alelice HLA din grupul DRB1 și DQB1 la pacienți infectați cu virusul hepatitei C genotipul 1b	
3.1. Introducere	82
3.2. Ipoteza de lucru	82
3.3. Material și metodă	83
3.3.1. Extractia de ADN genomic pur din probele prelevate	84
3.3.2. Amplificarea locilor HLA de interes prin metode specifice SSO/SSP	89
3.4. Rezultate	102
3.4.1 Rezultate obținute în urma genotipării HLA la subiecții din lotul de studiu	108

3.4.1.1.Distribuția alelele HLA- DRB1 în lotul de pacienți și lotul martor	108
3.4.1.2.Distribuția alelele HLA- DQB1 în lotul de pacienți și lotul martor	115
3.4.1.3.Frecvența haplotipurilor DRB1/DQB1 în lotul de pacienți și lotul martor	121
3.6. Concluzii	125
Cap 4. Studiul 2- Corelații între evaluarea posibilibor factori genetici de risc diferit prezenți la pacienți înaintea începerii tratamentului și prezența alelelor HLA-DR-DQ	
4.1.Introducere	127
4.2.Material și metodă	129
4.3.Rezultate	132
4.4.1.Distribuția alelelor HLA-DRB1 în raport cu viremia în HCV	133
4.4.2 Distribuția alelelor HLA-DRQ1 în raport cu viremia în HCV	135
4.4.3.Distribuția haplotipurilor HLA DRB1/DQB1 în raport cu viremia în HCV	138
4.4.4.Distribuția alelelor HLA DRB1 în raport cu gradul de fibroză în HCV	141
4.4.5.Distribuția alelelor HLA DQB1 cu gradul de fibroză în HCV	144
4.4.6.Distribuția haplotipurilor HLA DRB1/DQB1 cu gradul de fibroză în HCV	147
4.4.Concluzii	149
Cap 5.Corelații între variația răspunsului la taratamentul cu PegIFN/RBV și prezența genotipurilor HLA-DRB1-DQB1 și IL28B la pacienții cu hepatita C	
5.1.Introducere	151
5.2.Material și metodă	152
5.3.Rezultate	155
5.4.1.Asocierea alelelor HLA -DRB1 cu răspunsul la tratamentul cu PegIFN/RBV	158
5.4.2.Riscul conferit de alelele HLA-DRB1 în răspunsul la tratamentul cu PegIFN/RBV	161
5.4.3.Asocierea alelelor HLA -DQB1 cu răspunsul la tratamentul cu PegIFN/RBV	162
5.4.4.Riscul conferit de alelele HLA-DQB1 în răspunsul la tratamentul cu PegIFN/RBV	165

5.4.5. Asocierea polimorfismului interleukinei IL28B cu răspunsul la tratamentul	167
5.4. Concluzii	169
Cap 6. Concluzii generale si perspective ale cercetării	171
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	175
ANEXE	
ANEXA 1 Asocieri de alele HLA în hepatita virală C în populația globală	191
ANEXA 2 Interpretarea rezultatelor Fibrotest și Actitest în stadii după cele mai utilizate trei clasificări histologice (METAVIR, Knodell și Ishak)	195
ANEXA 3 Frecvențele și haplotipurile DRB1/DQB1 în Europa conform bazei de date MHC a NCBI	196
ANEXA 4 Chestionar de recrutare pentru baza de date în vederea înrolării pacienților	199
ANEXA 5 Frecvențele și haplotipurile DRB1/DQB1 la pacienți și lotul martor	200

Introducere:

Deși intens studiat mecanismul patogenezei virusului hepatitei C (HCV) rămâne evaziv. Factorii genetici ai gazdei sunt incriminați a fi cei ce guvernează patologia, agravarea sau regresia bolii împreună cu factorii virali și factorii de mediu. Restricția limfocitelor T condiționată de către antigenele leucocitare umane HLA (human leukocyte antigen), anticorpilor secretați de limfocitele B, celulele natural kiler (NK) și citochinele (IL28B) condiționează răspunsul imun în cadrul infecției cu virusul hepatitei C. Prezentarea antigenelor virale limfocitelor TCD4⁺ și TCD8⁺ de către moleculele HLA de clasa a II și clasa I este cheia unui răspuns imun optim și tot de aceasta depinde clearanceul sau persistența virală. De asemenea a fost observată o neconcordanță în răspunsul la vaccinul împotriva virusului hepatitei B (HBV) și în tratamentul cu interferon urmat de pacienți în urma infecției cu virusul hepatitei B sau C. Răspunsul variat la vaccin este datorat combinațiilor specifice ale polimorfismului foarte variat al alelelor HLA de clasa a II-a ce influențează capacitatea moleculelor HLA clasa II să lege și să prezinte o mare diversitate antigenică limfocitelor CD4⁺ care determină la rândul lor producția de anticorpi și activarea limfocitelor T citotoxice în scopul clearanceului viral.

Numeroasele investigații clinice și de laborator au identificat o serie de factori imunogenetici implicați

în condiționarea evoluției hepatitei virale C. Polimorfismul genetic și heterozigozitatea locilor HLA dau posibilitatea moleculelor HLA să prezinte o mare diversitate de epitopi virali și să diversifice proprietățile moleculelor HLA în acord cu legarea și prezentarea antigenului. Asocierea moleculelor HLA cu susceptibilitatea la infecția cu hepatita C, protecție, severitatea bolii, răspunsul la tratamentul cu interferon și la vaccinare au fost studiate intens în populația globală. (anexa 3)

Teza este alcătuită din partea generală, care realizează o sinteză a datelor publicate din literatura de specialitate și dintr-o parte specială, destinată cercetărilor și rezultatelor personale. Informațiile coroborate la final vin să concluzioneze către o privire de ansamblu asupra frecvenței alelelor "marker" HLA de clasa a II-a DRB1/DQB1 de protecție și susceptibilitate la pacienții infectați cu virusul hepatitei C în populația din România, cât și către o direcție de cercetare privind asocierea alelelor HLA cu factori importanți în prognosticul bolii (viremie, gradul de fibroză hepatică, genotipul IL28B) și răspunsul la tratamentul clasic cu interferon și ribavirină pe care-l urmează pacienții urmărind a realiza un profil genetic al pacientului care poate orienta clinicianul pe mai departe în evoluția bolii.

Pe viitor există posibilitatea ca rezultatele obținute se vor alătura celorlalte studii din populația globală în perspectiva ca în viitor să poată fi concepute noi strategii pentru elaborarea unui vaccin combinat împotriva hepatitei C și un management mai bun al terapiei cu interferon și ribavirină la acești pacienți. Elucidarea proceselor imunologice și virale ce duc la persistența virală sau clearance viral în cazul pacienților infectați pot determina noi strategii terapeutice antivirale ce duc la stoparea infecției cronice, reducerea riscului dezvoltării complicațiilor amenințătoare de viață și tratarea pacienților mult mai eficient, personalizat.

Motivația și importanța cercetării

Prin determinarea alelelor HLA-DRB1 și HLA-DQB1 la subiecții înscriși în acest studiu mi-am propus să stabilesc care dintre aceste alele, genotipuri sau haplotipuri generate de acestea, acționează ca factori de risc sau de protecție pentru susceptibilitatea, persistența virală și răspunsul la tratament.

Se observă în rezultatele studiilor publicate anterior o mare diversitate în asocierea HLA cu susceptibilitatea, protecția, răspunsul la tratament și evoluția hepatitei virale C în diferitele regiuni și etnii din populația globală (anexa 3). Este observat faptul că infecțiile HBV și HCV tind să se reprezente una pe cealaltă. Infecția cu HBV și infecția cu virusul hepatitei D (HDV) pot supresa infecția cu virusul HCV iar

pe de altă parte virusurile HCV și HDV pot avea efect negativ asupra virusului hepatitei B.

Tratamentul cu interferon poate activa prezentarea de antigen prin antrenarea mai multor limfocite T citotoxice și astfel având un răspuns protector împotriva agresiunii virale. Răspunsurile limfocitelor T cu restricție de clasa I și a II a împotriva virusului sunt eficiente, policlonale și multispecifice la pacienții cu infecție acută care se vindecă și elimină cu succes virusul sau pot fi relativ slabe și ineficiente la pacienții infectați ce merg spre cronicizare. Cauza principală a persistenței virale în timpul infecției cu virusul hepatitei C este dezvoltarea unui răspuns imun slab împotriva antigenelor virale. Agresiunea celulară hepatică cronică împreună cu procesele de răspuns inflamatorii și regenerative reprezintă stimulii mutagenici și mitogenici pentru dezvoltarea leziunilor la nivelul ADN-ului ce poate cauza carcinom hepatocelular.

Sistemul HLA este foarte polimorf și fenotipul HLA al unui individ determină în mare măsură răspunsul la diverse antigene virale și evoluția bolii. Recent s-a demonstrat că efectul protector al unor alele HLA în cursul infecției virale VHC ar putea fi explicat printr-un răspuns specific al limfocitelor T CD4+ direcționat împotriva epitopilor virali. Acest efect se poate datora prezentării de antigeni mai competenți prin intermediul moleculelor HLA sau a unui polimorfism linkat dintr-o genă imunomodulatoare vecină.

Există numeroase motive pentru a studia asocierea dintre polimorfismele MHC și urmările infecției cu HCV. Din punct de vedere al patologiei este căutată explicația pentru fenomenul prin care unii pacienți se recuperează după infecție fără sechele în timp ce alți pacienți dezvoltă boală hepatică în fază terminală și carcinom hepato-celular. De asemenea este important mecanismul imunologic care conferă reacție imunologică de protecție împotriva infecției. Importanța clinică a cercetării o reprezintă evidențierea de noi markeri de prognostic pentru a ghida conduita terapeutică individual în cazul fiecărui pacient.

PARTEA PERSONALĂ

Obiectivele lucrării

Prin lucrarea de față mi-am propus să realizez efectuarea unui studiu analitic caz-martor privind existența unor markeri genetici ai organismului gazdă, reprezentați de alelele genelor complexului major de histocompatibilitate (HLA) de clasa a II-a, HLA-DRB1 și HLA-DQB1, la un lot de pacienți infectați cu virusul hepatitei C și un lot de control randomizat reprezentat de subiecți neinfecțați persoane neînrudite, neinfectate viral din aceeași populație.

În acest scop am efectuat:

- ✓ elaborarea modelului experimental pe baza documentației publicate anterior din literatura de specialitate;
- ✓ selectarea testelor de biologie moleculară și optimizarea protocoalelor de lucru folosite în scopul genotipării subiecților analizați;
- ✓ stabilirea criteriilor de constituire a loturilor de pacienți incluși în studiu;
- ✓ constituirea lotului martor;
- ✓ determinarea alelelor HLA-DRB1 și HLA-DQB1 la toți subiecții luați în studiu, prin proceduri specifice de biologie moleculară, în cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară al Facultății de Medicină Constanța;
- ✓ alcătuirea bazei de date și informații referitoare la subiecții incluși în studiu;
- ✓ determinarea existenței asocierii locilor HLA-DRB1 și HLA-DQB1 cu evoluția hepatitei C și stabilirea genelor de susceptibilitate și de protecție prezente în cazul pacienților cu hepatită C prin studiul statistic comparativ al frecvenței alelelor HLA-DRB1 și HLA-DQB1 la pacienți și la lotul martor;
- ✓ determinarea existenței asocierii locilor HLA-DRB1 și HLA-DQB1 cu anumiți factori de risc ce țin de gazdă (valorile viremiei, gradul de fibroză) ce pot fi prezenți la pacienți înainte de începerea tratamentului;
- ✓ asocierea alelelor HLA-DRB/DQB1 și genotipurilor IL28B cu clearanceul și persistența virală după efectuarea dublei terapii cu PegIFN și RBV în vederea definirii profilului pacienților care au probabilitate mai mare în a obține răspuns virusologic susținut (SVR).

Metodologie generală

Alcătuirea studiului

În lucrarea de față am urmărit efectuarea unui studiu în vederea asocierii alelelor HLA-DRB1 și HLA-DQB1 ca markeri genetici pentru clearanceul/ persistența virală la pacienții infectați cu virusul hepatitei C în vederea orientării către un prognostic favorabil sau mai puțin favorabil în ceea ce privește evoluția bolii și răspunsul la tratamentul cu PegIFN/RBV.

Studiul se axează în principal pe compararea frecvențelor diferitelor alele HLA în prezența anumitor factori de risc la pacienții infectați cu virusul hepatitei C cu răspuns variat la tratament și la subiecții din lotul martor care ar putea orienta din punct de vedere clinic către un anumit prognostic în evoluția bolii.

Pentru a evidenția markeri genetici la pacienții cu hepatita C, am emis ipoteza că anumite alele HLA-DRB1/DQB1 vor fi prezente în număr semnificativ crescut la grupul de pacienți cu valori viremice crescute și un grad de fibroză mare, non-responderi la tratament, reprezentând alele ce conferă risc pentru cronicizare și persistența virală, în vreme ce alte alele ale aceluiași gene vor fi mai bine reprezentate la subiecții din lotul martor /pacienți ce au obținut SVR la 6 luni după finalizarea tratamentului, reprezentând alele de protecție în cazul persoanelor infectate cu virusul hepatic C.

Subiecții luați în studiu

Lotul studiat a cuprins un grup de 153 de subiecți din care 51 de pacienți aflați în evidența Clinicii de Boli Infecțioase a Spitalului Județean Constanța și un lot martor alcătuit din subiecți sănătoși neînruțiți din aceeași populație înrolați în registrul donatorilor de maduvă în cadrul Institutului Clinic Fundeni, București.

Pentru înscrierea subiecților în studiu am participat la evaluările periodice ale pacienților diagnosticați cu hepatita C, în perioada iunie 2012 – septembrie 2014. Înscrierea subiecților în lotul de pacienți cât și în lotul martor nu a fost dificilă datorită cazuisticii bogate în cazul bolii studiate din Clinica de Boli Infecțioase a Județului Constanța am întâlnit un număr relativ crescut de pacienți și de doritori în participarea la studiu dar cu toate acestea din considerente de ordin material am selectat și înscris în studiu un nr. de 51 de cazuri de la care am obținut acordul pentru participare și probele de sânge pentru efectuarea determinărilor moleculare. Subiecții sănătoși înscriși în lotul de control ce au participat la studiu urmau a fi testați pentru înrolarea în Registrul Național al donatorilor de maduvă în cadrul Centrului de

imunogenetică și virologie al Institutului Clinic Fundeni, București.

Criterii de includere:

- subiecți de sex femin și masculin diagnosticați cu hepatită cronică C genotip viral 1b;
- stare clinică stabilă, inclusiv hematocritul stabil
- pozitivarea anticorpilor HCV folosind un test de laborator de a treia generație;
- detectarea ARN-VHC pozitiv prin metoda Rt-PCR
- biopsie hepatică în ultimele 18 luni, cu scorul Metavir $\geq$ A1 și $\geq$ F1, sau $\geq$ A1 și $>$ F2
- ALT $>$ 1,5 timp în intervalul normal în termen de 24 de săptămâni înainte de includere;
- pacienții care nu au mai fost tratați cu ribavirină, IFNalpha sau PEG-IFNalpha;
- albumină și bilirubina în limite normale;
- alfa-feto-proteină mai mică sau egală cu de 3 ori intervalul normal pentru laborator;

Criterii de excludere:

- ✗ infecție clinică semnificativă, altele decât HCV, definit ca orice infecție virală, bacteriană, fungică sau acută, care necesită terapie specifică (terapiile anti-infecțioase trebuie să fi fost finalizate cu cel puțin 14 zile înainte de intrarea în terapia cu PegIFN/RBV)
- ✗ co-infecțiile cu virusul hepatitei B sau virusul imunodeficienței umane (HIV);
- ✗ hemocromatoza, boli de ficat legate de alcoolism, afecțiuni cardiace, carcinom hepatocelular ;
- ✗ pacienți cu ciroză hepatică agravată ;

Material și metodă

Analiza genetică propriu-zisă a fost efectuată în perioada Iunie 2013 – Decembrie 2014 în Laboratorul de Genetică moleculară al Facultății de Medicină, Universitatea "Ovidius" Constanța.

În vederea determinării alelelor HLA-DRB1 și DQB1 la subiecții pe care i-am luat în studiu am adaptat tehnica de tipizare HLA pentru a putea aplica această metodă în laboratorul nostru. Tehnicile prezentate în continuare fac parte din protocolul de tipizare HLA de la Centrul de Imunogenetică și Virusologie, Institutul Clinic Fundeni. Acest centru este acreditat EFI (Federația Europeană de Imunogenetică), reprezentând centrul de referință pentru imunologia transplantului în România, inclusiv pentru tipizarea HLA.

Metode de laborator

Identificarea tipului de antigene de histocompatibilitate prezente pe celulele unui individ poartă numele de *tipizare HLA*. Datele de identificare ale pacienților și martorilor, precum și haplotipurile HLA corespunzătoare desemnate ale pacienților și martorilor sunt prezentate în teză în anexa 5.

Pentru toți cei 153 de subiecți luați în studiu am efectuat tipizarea alelelor HLA-DRB1 și DQB1. De la fiecare subiect s-au recoltat pentru tipizarea HLA 2 ml de sânge integral recoltat pe EDTA. Din această cantitate, 200 – 600 μ l au fost utilizați pentru izolarea ADN-ului genomic, iar sângele rămas a fost conservat la -20°C .

Din sângele recoltat s-a extras ADN-ul genomic, care apoi a fost analizat prin una din metodele de tipizare SSO (cu sonde oligonucleotidice specifice pentru secvență) sau SSP (cu primeri specifici pentru secvență) pentru tipizarea HLA. Protocoalele prezentate sunt standard de operare pentru tipizarea HLA în Laboratorul de Genetică moleculară al Facultății de Medicină Constanța.

Alegerea metodei de tipizare HLA

Pentru tipizarea genelor HLA-DRB1 și DQB1 la subiecții luați în studiu am ales folosirea inițială pentru toate probele a metodei SSO, care are costuri mai scăzute. Această metodă cu rezoluție medie-înaltă oferă posibilitatea unei tipizări la nivel de alelă pentru locusul HLA-DQB1 în majoritatea situațiilor; în schimb pentru locusul HLA-DRB1, care este mai polimorfic, se obține rezoluție de grup alelic (cu două cifre – joasă) sau înaltă (cu 4 cifre) în funcție de combinația de gene prezentă. Un alt avantaj al metodei este faptul că se pot efectua simultan mai multe determinări, tipizarea făcându-se atât pentru mai mulți loci, cât și pentru mai mulți pacienți în același timp.

Pentru cazurile când am obținut rezultate ambigue la tipizarea prin metoda SSO, sau nu am putut desemna un rezultat cu rezoluție alelică, am folosit metoda SSP cu kit-uri pentru rezoluție înaltă. Această metodă, deși durează mai puțin decât metoda SSO, nu permite tipizarea decât a unei probe odată, și este mai puțin utilă pentru grupuri mari de pacienți. În plus, tipizarea cu rezoluție înaltă prin metoda SSP are un cost ridicat și de aceea, nu a putut fi folosită ca metodă de primă alegere.

Extragerea ADN-ului genomic din probele prelevate

Pentru izolarea ADN-ului am folosit kit-uri de reactivi de la firma Qiagen – QIAmp DNA Blood Mini Kit ce au la bază o metodă rapidă bazată pe centrifugări repetate a unei coloane filtrante, cu o

manipulare minimă a probei – contaminare redusă.

Concentrația ADN-ului extras din probe a fost determinată folosind un Nano fotometru, pentru a compara raportul concentrației de acid nucleic din probă (OD260) cu raportul contaminanților: proteine și substanțe organice (OD280); săruri și alcool (OD230). Mai mult decât atât ADN-ul izolat din probele de sânge (3μl) a fost încărcat pe un gel de agaroză 1% și vizualizat prin colorare cu bromură de etidiu.

Metodele de detectare a polimorfismelor HLA (tipizarea HLA)

Tipizarea HLA prin metoda SSO- Amplificarea genelor HLA-DRB1 și HLA-DQB1 prin PCR cu sonde oligonucleotidice specifice secvenței de ADN (SSO)

Principiul metodei

Regiunile polimorfice ale genelor HLA de clasa a II-a au fost amplificate din ADN-ul genomic obținut din probele pacienților printr-o reacție de PCR (polimerizare în lanț), folosind primeri complementari cu secvențe din regiunile 5' și 3' învecinate; secvențele folosite pentru proiectarea primerilor sunt conservate între indivizi, astfel asigurându-se amplificarea indiferent de tipul alelei, precum și amplificarea egală a celor două alele prezente la indivizii heterozigoți (majoritatea cazurilor).

După reacția de PCR, ADN-ul rezultat a fost folosit mai departe în reacția de hibridizare cu sonde oligonucleotidice specifice pentru secvență (SSO) alese astfel încât să depisteze regiunile cu polimorfisme. Stringența soluțiilor utilizate permite fixarea specifică și detectarea fie și a unui singur nucleotid diferit între alele. Alelele sunt desemnate prin analiza reacțiilor de hibridizare pozitive și negative cu sondele oligonucleotidice, fiecare specifică pentru o anumită secvență.

Metoda SSO aleasă în cazul studiului a permis mai multe determinări în același timp, iar analiza produșilor de amplificare prin hibridizarea specifică a acestora cu sondele SSO imobilizate pe o membrană de nitroceluloză și dezvoltarea unei reacții de culoare (Fig.13), a conferit rezoluție joasă-medie ceea ce a presupus posibilitatea apariției de rezultate ambigui în unele cazuri.

Kitul pentru detectare ce a fost folosit este RELI SSO HLA typing systems de la Invitrogen



Fig.12 Imagine a unei serii de stripuri, după finalizarea determinării RELI SSO HLA-DRB1

Dynal RELI™SSO HLA-DRB1 Overlay

815.50, 815.999, 815.600 & 815.500 - Rev 002

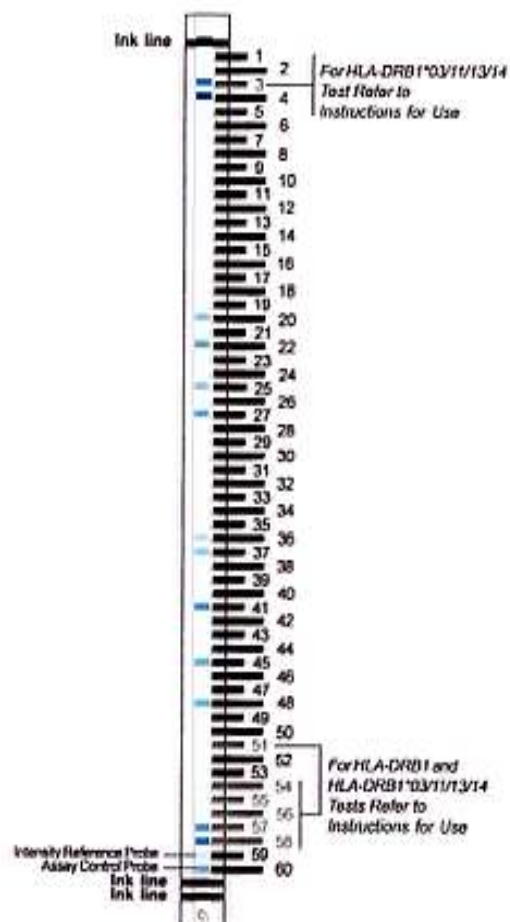


Fig . 13 Interpretarea rezultatului RELI SSO HLA-DRB1

Cardul de citire HLA-DQB1 utilizat pentru identificarea liniilor pozitive de pe strip. 38 de poziții corespund liniilor specifice, pozițiile 5 și 41 reprezintă controlul de intensitate al probei, iar poziția 40 reprezintă controlul pozitiv al reacției. Specificități pozitive: 3, 4, 20, 22, 25, 27, 36, 37, 41, 45, 48, 59, 60

Tipizarea HLA prin metoda SSP - Amplificarea genelor HLA-DRB1 și HLA-DQB1 cu primeri specifici pentru secvență (SSP)

Principiul metodei

Determinarea alelelor HLA prin metoda SSP s-a realizat prin amplificarea regiunii de interes a genelor prin PCR cu mai multe perechi de primeri specifici diferitelor polimorfisme cunoscute, analiza produșilor reacției de amplificare prin electroforeza pe gel de agaroză și interpretarea rezultatelor obținute. Metoda se bazează pe faptul că numai primerii ale căror secvențe sunt perfect complementare cu cea a ADN-ului din probă se vor lega de aceasta și vor produce un amplicon în reacția de PCR. Primerii necomplementari, pe de altă parte, nu se leagă de ADN, iar amplificarea nu se produce.

Kiturile folosite au conținut diferite seturi de primeri dispuși în plăci PCR cu 20-96 de godeuri. În godeurile plăcii se adaugă alicote dint-un amestec de reacție ce conține tamponul de reacție, ADN-ul genomic; și Taq ADN-polimerază. La încheierea amplificării produșii de PCR se încarcă pe un gel de agaroză, se migrează și se colorează cu bromură de etil. Gelul este apoi fotografiat și se interpretează rezultatele. Am analizat genele de clasa a II-a HLA-DRB1 și HLA-DQB1, folosind două tipuri de kit-uri comerciale pentru tipizarea cu rezoluție înaltă: AllSet⁺™ Gold SSP de la Invitrogen™ și Protrans HLA SSP Kits.

Metode statistice folosite în realizarea studiului

Metodele utilizate în prelucrarea datelor statistice în cazul de față au fost studiile de asociere considerate utile pentru stabilirea contribuției unor gene la susceptibilitatea pentru o afecțiune sau un anumit fenotip ce sunt de obicei folosite în familii sau populații.

Cu toate că genele HLA sunt cunoscute de mulți ani și întregul complex major de histocompatibilitate a fost secvențiat, studiile de asociere HLA sunt folosite în continuare pentru a identifica genele predispozante și protectoare specifice anumitor afecțiuni, pentru a preciza profilul imunogenetic al pacienților, pentru evaluarea riscului și uneori pentru stabilirea măsurilor terapeutice.

În cadrul studiului 1 și 2 am urmărit realizarea unui studiu de asociere caz-martor prin determinarea distribuției alelice HLA din grupul DRB1/DQB1 la pacienți infectați cu virusul hepatitei C genotip 1b, între un lot de pacienții diagnosticați cu HCV și un lot martor alcătuit din subiecți neinfecțați clinic sănătoși, recrutați dintre persoanele din registrul donatorilor de maduvă.

Am ales realizarea unui studiu caz martor pentru că ne dă posibilitatea să comparăm persoanele sănătoase cu cele bolnave, pentru a identifica o eventuală legătură între boală și factorul de risc presupus a fi implicat în producerea sau evoluția ei (în acest caz, prezența anumitor alele HLA-DRB1 și/sau DQB1). Frecvența alelelor sau frecvența haplotipurilor au fost calculate în funcție de numărul total de cromozomi, nu de numărul de subiecți luați în studiu (numărul de cromozomi este dublul numărului persoanelor), iar frecvența genotipurilor a fost calculată în funcție de numărul subiecților. Experimentul a început cu o ipoteză nulă care postulează că nu este nici o diferență între cele două loturi, extrase din aceeași populație, din punct de vedere al parametrului testat. Atunci când ipoteza nulă a fost respinsă printr-un test statistic, ipoteza alternativă (că există o diferență între cele două loturi) a fost acceptată. Pentru testarea semnificației statistice am folosit testul χ^2 (hi pătrat), ipoteza a fost respinsă când testul χ^2 a furnizat o valoare $p < 0.05$, iar pentru a compara cele două loturi am folosit un tabel de contingență 2×2 . Pentru studiul trei am realizat o analiză statistică folosind testele de asociere ale alelelor HLA în cele două loturi de pacienți responderi și non responderi la terapia cu interferon și am calculat riscul relativ între variabila "Răspuns la tratament" (non responderi-Non-R / responderi-SVR) și variabilele alelice HLA DRB1/DQB1 (Prezent / Absent)

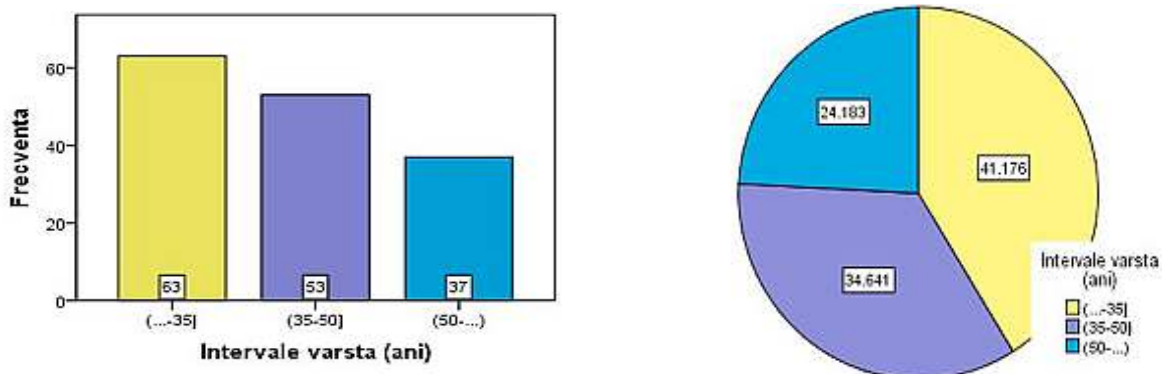
Existența unei relații de dependență (de asociație, de legătură) s-a făcut prin determinarea χ^2 , și calcularea raportului dintre probabilitatea (odd) de expunere la pacienți și probabilitatea (odd) de expunere la martori, OR, valoare semnificativă statistic, când intervalul de încredere 95% IC for OR nu conține valoarea 1 (risc egal). A fost considerat următoarele semnificații ale valorii obținute a RR:

RR = 1 alela testată nu modifică riscul pentru răspunsul la tratamentul cu interferon;

RR < 1 risc scăzut în prezența alelei, alela testată modifică riscul pentru apariția răspunsului la tratament și acționează ca alelă protectoare conferind clearance viral – conferă protecție pentru boală;

RR > 1 risc crescut în prezența alelei, alela testată modifică riscul pentru apariția non răspunsului la tratament și acționează ca alelă de susceptibilitate pentru boală ducând la persistență virală și cronicizare împreună cu apariția complicațiilor asociate bolii.

Programul folosit în prelucrarea datelor experimentale a fost programul de statistică IBM SPSS Statistics versiunea 20, iar procedurile utilizate au fost: statistici descriptive (variabile de caracterizare definite în baza de date), grafice, teste statistice neparametrice.



Graficul 3. Repartiția pe intervale de vârstă a lotului studiat

Studiul 1- Determinarea distribuției alelice HLA din grupul DRB1 și DQB1 la pacienți infectați cu virusul hepatitei C genotipul 1b

3.4. Rezultate

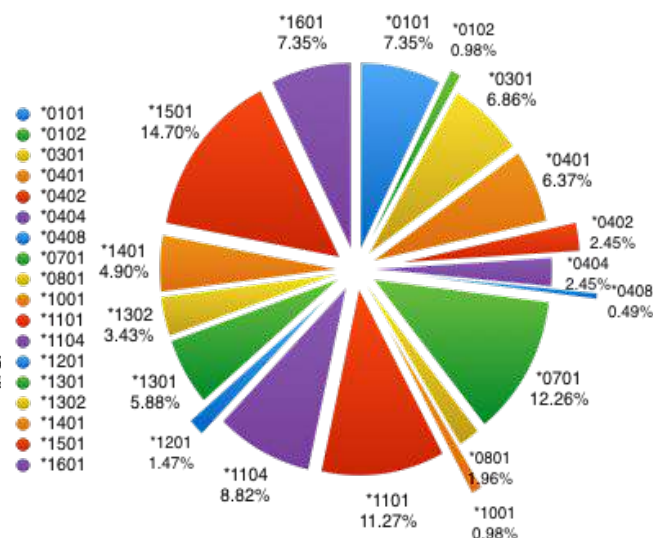
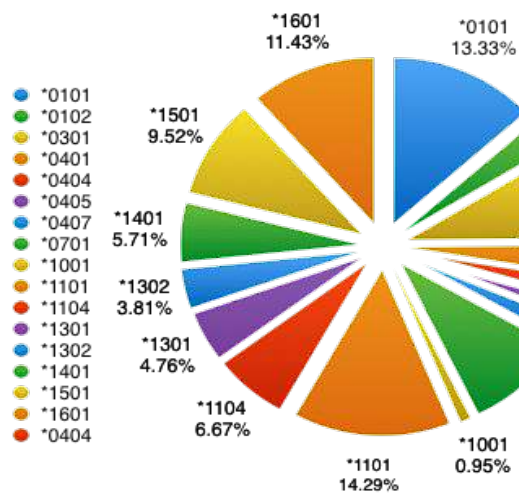
Analiza generală a lotului studiat

Cei 153 de pacienți din lotul studiat au avut vârsta medie la înrolare de 40.01 ani (interval 13-75 ani). Lotul a inclus 76 de subiecți de sex feminin (49.7%) cu vârsta medie 40.3 ani (interval 18-68 ani) și 77 de subiecți de sex masculin (50.3%) cu vârsta medie 39.6 ani (interval 13-75 de ani).

Numarul de pacienți care au răspuns la terapie este mai mare (32) cu o diferență mică între cele doua sexe, acesta fiind ușor crescut în cazul pacienților de sex feminin în nr 17 cu o medie de vârstă de 47.8 (între 26 - 68 ani) comparativ cu persoanele de sex masculin care au atins SVR (15) la care media de vârstă este mai scăzută 41.1 ani (între 14 și 65 ani).

Vârsta și sexul în raport cu răspunsul la tratament							
Răspuns la tratament	Sex		nr.	Minimum	Maximum	Media	Deviația Std.
Non-R	Masculin	Varsta (ani)	13	25.00	75.00	43.0000	16.17096
	Feminin	Varsta (ani)	6	40.00	63.00	53.8333	9.36839
SVR	Masculin	Varsta (ani)	15	14.00	65.00	41.1333	16.30016
	Feminin	Varsta (ani)	17	26.00	68.00	47.8235	11.02971
Mortor	Masculin	Varsta (ani)	49	13.00	63.00	38.3673	12.17527
	Feminin	Varsta (ani)	53	18.00	65.00	36.4151	11.63455

Tabelul 5. Repartiția pe sexe și vârstă a lotului studiat în raport cu răspunsul la tratament



Graficul 4. Frecvența alelelor HLA-DRB1 la lotul de pacienți **Graficul nr 5.** Frecvența alelelor HLA-DRB1 la lotul martor

Rezultate obținute în urma genotipării HLA la subiecții din lotul de studiu.

Alelele individuale HLA-DRB1 și HLA-DQB1, genotipurile și haplotipurile DRB1/DQB1 ale celor 51 de pacienți și 102 de subiecți martor sunt prezentate desfășurate în teză în anexa 5.

Distribuția alelelor HLA-DRB1* la lotul de pacienți și lotul martor

Prin analiza alelelor HLA-DRB1 la cei 51 de pacienți cu hepatita C am identificat 102 alele HLA-DRB1, cu următoarea distribuție redată în Graficul nr. 4

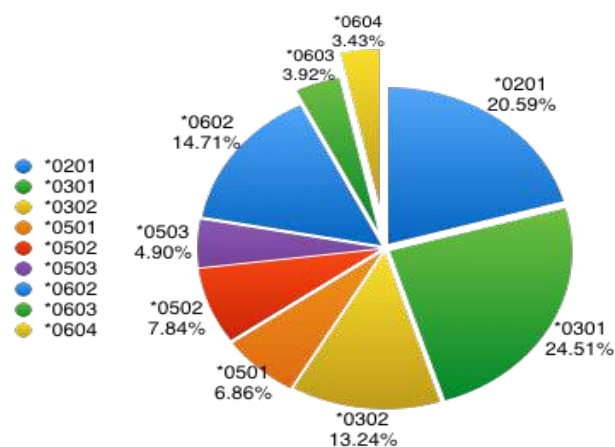
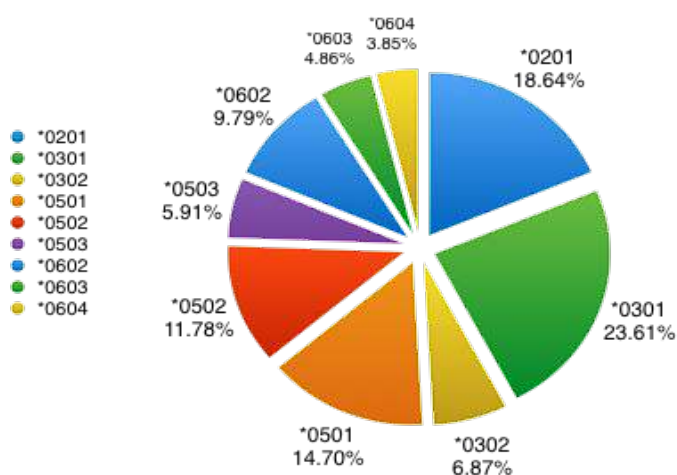
- grupurile alelice DRB1*01 cu două alelele *0101 (13.72%), *0102 (2.94%), DRB1*07 (9,80%), și DRB1*11 *1104 (6.86%) ,*1101 (14.71%) au avut cea mai mare frecvență în rândul pacienților.
- grupul alelic DRB1*04 a prezentat cea mai mare variabilitate alelică (alele *0401, *0404, *0405, *0407) și nu au fost găsite nici o alelă din grupurile alelice DRB1*12 și *08.

În cazul lotului martor la cei 102 subiecți am identificat 204 alele HLA-DRB1, cu următoarea distribuție prezentată în Graficul nr. 5.

- grupul alelic DRB1*03(6.86%), DRB1*04, DRB1*07 (12,25%) și DRB1*13 cu alele *1301(5.88%) și *1302 (3.43%) au fost cele mai frecvente alele în lotul de control.

Alelele HLA-DQB1

Alelele HLA-DQB1 au fost determinate la cei 153 de subiecți prin metoda SSO. Datorită faptului că locusul DQB1 este mai puțin polimorf și existenței informațiilor referitoare la dezechilibrul de linkage prin care aceste gene se transmit, am putut desemna cele 306 de alele, fără ambiguități după tipizarea prin metoda SSO.



Graficul nr.7. Frecvența alelelor DQB1 la lotul de pacienți

Graficul nr.8. Frecvența alelelor DQB1 în lotul de control

Distribuția alelelor DQB1 la lotul de pacienți și lotul martor

Prin analiza alelelor HLA-DQB1 la pacienții luați în studiu cu hepatita C au fost identificate 102 de alele HLA-DQB1, cu următoarea distribuție redată în Graficul nr.7.

alele din grupul DQB1*02 (18.63%), DQ7 cu alela *0301(23.59%), DQB1*05 cu trei alele *0501(14.69%), alela *0502 (11.76%), *0503 (5.90%) au fost cele mai frecvent în grupul de pacienți.

Prin analiza alelelor HLA-DQB1 la lotul martor am identificat 204 alele HLA-DQB1, cu următoarea distribuție prezentată în Graficul nr.8.

– Alele din grupul DQB1*02 *0201(20.59%), DQ7 *0301(24.51%), sunt net mai bine reprezentate comparativ cu celelalte alele DQB1 din grupul pacienților.

Distribuția haplotipurilor DRB1/DQB1

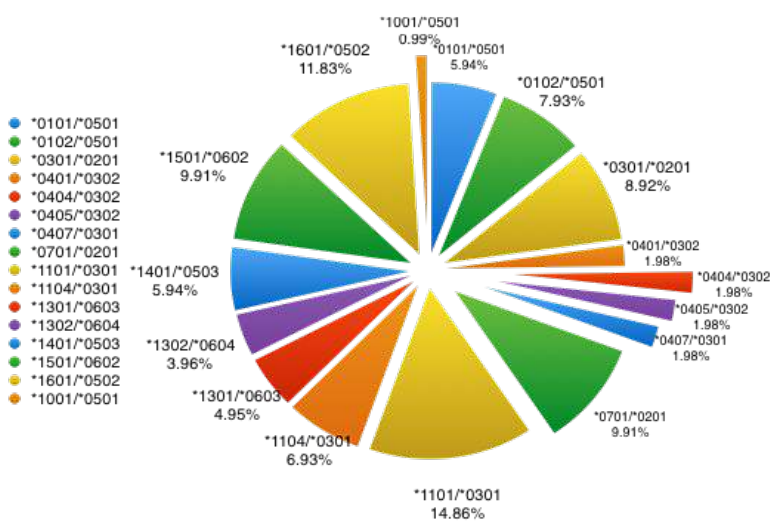
Haplotipurile DRB1/DQB1 reprezintă regiunea genelor HLA-DRB1 și DQB1 care se transmit în grup la descendenți, datorită unui puternic dezechilibru de linkage care există între cei doi loci. După

desemnarea alelelor HLA-DRB1 și DQB1, haplotipurile au fost desemnate la rândul lor cu ajutorul bazei de date pentru complexul major de histocompatibilitate (dbMHC) a NCBI, resursă electronică creată cu ajutorul Universității Medicale din Gratz, Austria.(234) Cele mai frecvente haplotipuri DRB1/DQB1 care pot fi întâlnite în populațiile din Europa sunt prezentate în teză în anexa 3.

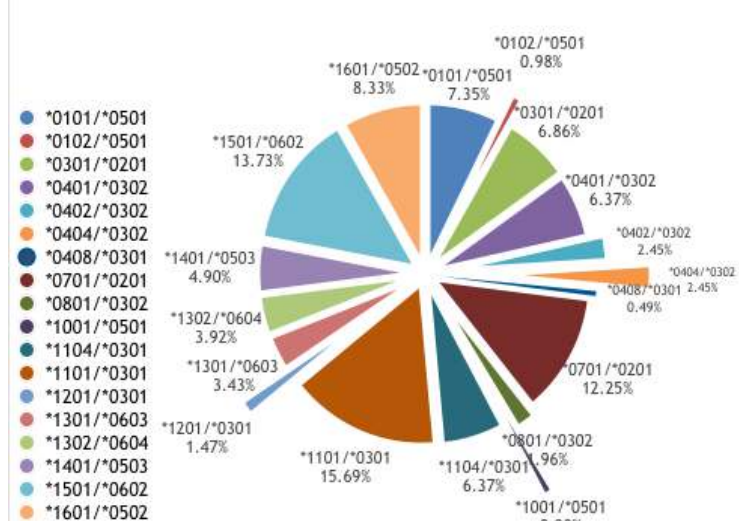
Distribuția haplotipurilor DRB1/DQB1 la lotul de pacienți și lotul martor

Am desemnat cele 102 haplotipuri DRB1/DQB1 la toți pacienți, reprezentate printr-un nr de 17 combinații cu următoarea distribuție (Graficul nr 8) iar la lotul martor am desemnat cele 204 haplotipuri DRB1/DQB1 în 18 combinații ale alelelor. (Graficul nr.11)

- haplotipurile cu aceeași alelă din grupul DR11, *1101 și *1102 au reprezentat cele mai frecvente haplotipuri (21.56%) în combinația *1101/*0301 (14.70%) și *1102/*0301(6.86%) iar haplotipul *1601/*0502 a fost al doilea ca frecvență în grupul pacienților (11.70%)
- haplotipul *1501/*0602 a fost cel mai frecvent întâlnit haplotip (18.62%) iar haplotipul *0701/*0201, a fost al doi-lea ca frecvență în lotul de control (12.25%), în contrast slab reprezentate au fost haplotipurile *0801/*0302 cu 4 cazuri (1,96%), haplotipul *1201/*0301 întâlnit în 3 cazuri (1.47%) și haplotipul *1001/*0501 în doar un singur caz (0.49%);



Graficul nr.10. Frecvența haplotipurilor HLA-DRB1/ DQB1 în lotul de pacienți



Graficul nr.11. Frecvența haplotipurilor HLA-DRB1/ DQB1 în lotul martor

Concluzii :

Alelele grupului DRB1 care au fost prezente într-o proporție semnificativ crescută la lotul de pacienți au fost *0101(16.66%), *0301(8.82%), *1601 (11.76%), iar alele grupului care au predominat la lotul martor au fost reprezentate de alela DRB1*0701 (12.25%),*1104 (8.82%) și *1501(14.70%) .

Când au fost comparate toate frecvențele alelelor grupului DQ din lotul de pacienți și lotul de control, distribuția polimorfismelor alelice a predominat în grupul de control prin alelele grupului DQB1*02 care au fost mai frecvent întâlnite la lotul martor (20.59%) la fel grupul serologic DQ7 (24.51%) și alela DQB1*0302(13.24%) și alelele grupului DQB1*05 au fost mai semnificativ crescute la pacienți (15.69%).

Studiul 2 – Corelații între evaluarea posibilor factori genetici de risc diferit prezenți la pacienți înaintea începerii tratamentului și prezența alelelor HLA-DR-DQ

Material și metodă

În studiul de față, am investigat asocierea viremiei la debut și gradul de fibroză hepatică în raport cu genotipurile HLA la pacienții infectați cu virusul hepatitei C. .

În funcție de gradul de fibroză și activitatea necroinflamatorie corespunzător scorului METAVIR pacienții au fost împărțiți: -pacienți cu fibroză minimală (F0-F1,F1: -fibroză portală stelată fără septuri; A0-A1, A1: activitate minimă), pacienți cu grad de fibroză moderată (F1-F2, F2- fibroză portală cu rare septuri A1-A2,A2- activitate moderată) și pacienți care au prezentat un grad de fibroză relativ sever (F3; F3-F4- fibroză cu numeroase septe, fara ciroza, A2-A3- activitate necroinflamatorie moderat- marcată), iar în funcție de valorile încărcăturii viremice înainte de începerea tratamentului pacienții au fost împărțiți în două grupuri după cum urmează:-pacienți cu viremie mică-medie 1.000.000 copii/ml – 5.000.000 copii/ml și pacienți cu viremie mare -foarte mare 5.000.000 – 25.000.000 copii/ml și peste.

Rezultate :

Din totalul pacienților luați în studiu 29 de pacienți au prezentat niveluri bazale crescute ale viremiei (ARN VHC) corelate cu niveluri mai ridicate ale transaminazelor hepatice înaintea de începerea tratamentului standard cu PegIFN/RBV. Din cele 102 alele prezente la pacienții cu HCV un număr crescut de alele 58 au fost prezente în cazul pacienților ce au prezentat încărcături viremice ridicate vs

22 cazuri de pacienți ce au prezentat viremie mică-medie (un număr total de 44 alele).

În ceea ce privește gradul de fibroză prezentat de pacienți la înrolarea în studiu lotul are o distribuție relativ omogenă, existând o ușoară diferență ce se observă între grupul de pacienți care au prezentat fibroză minimală, 17 cazuri (34 de alele studiate, aprox 33.3% din lotul studiat), 20 de cazuri (40 alele studiate, 39.2% din lotul total) reprezentând pacienți cu un grad de fibroză moderată și pacienții cu fibroză severă 14 cazuri (28 de alele studiate, 27.4% din lotul de studiu).

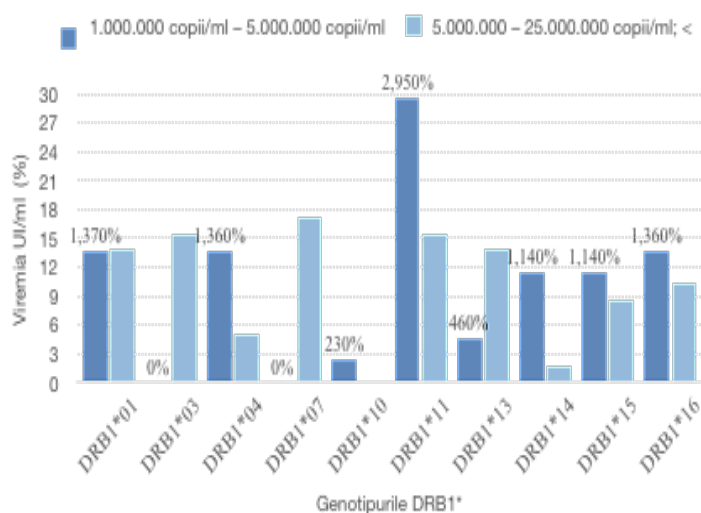
Distribuția alelelor HLA-DRB1 -DQB1 în raport cu viremia la debut la pacienții cu HCV

Alele din grupurile DR *03 și *07 au fost prezente doar la pacienții cu viremie mare și foarte mare prezentată în teză în Tabelul nr 10:

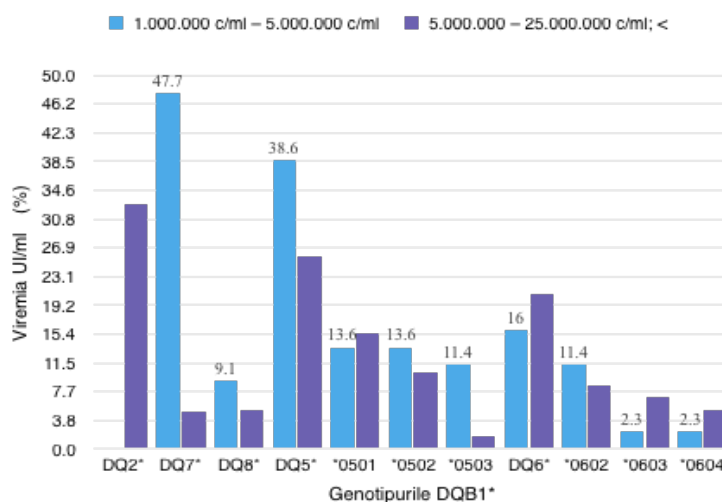
- în grupul de pacienți cu viremie severă alele *0301(15.5%) și alela *0701 (17,2%) au fost foarte bine reprezentate iar grupurile alelice DR*11 (43.1%) și *04 cu alele *0401, *0404, *0405, *0407 au fost mai bine reprezentate în cazul pacienților cu viremie mică-medie. (Graficul nr.13)

Prin analiza alelelor HLA-DQB1 la pacienții luați în studiu cu hepatita C au fost identificate alele HLA-DQB1, cu următoarea distribuție prezentată în teză în Tabelul nr.11

Alelele din grupul DQ*02 au fost prezente în toate cele 19 cazuri la pacienții cu viremie mare reprezentate de alela *0201 având cea mai mare pondere în această categorie viremică comparativ cu alelele celorlate grupuri 32.8%.



Graficul nr.13. Asocierea genotipurilor HLA -DRB1* cu viremia la debut



Graficul nr.14. Asocierea genotipurilor HLA -DQB1* cu viremia la debut

- grupul alelic heterogen DQB1*03 a reprezentat cea mai mare parte a alelelor din grupul de pacienți

cu viremie mică-medie (44, 43,2 %), iar alelele din grupul DQ2 au fost mai bine reprezentate prin în cadrul grupului de pacienți cu viremie mare și foarte mare 38.2% sunt absente în grupul de pacienți care au viremie mică sau medie.(Graficul 14)

Asocierea alelelor HLA DRB1, DQB1 cu gradul de fibroză în cazul pacienților cu HCV

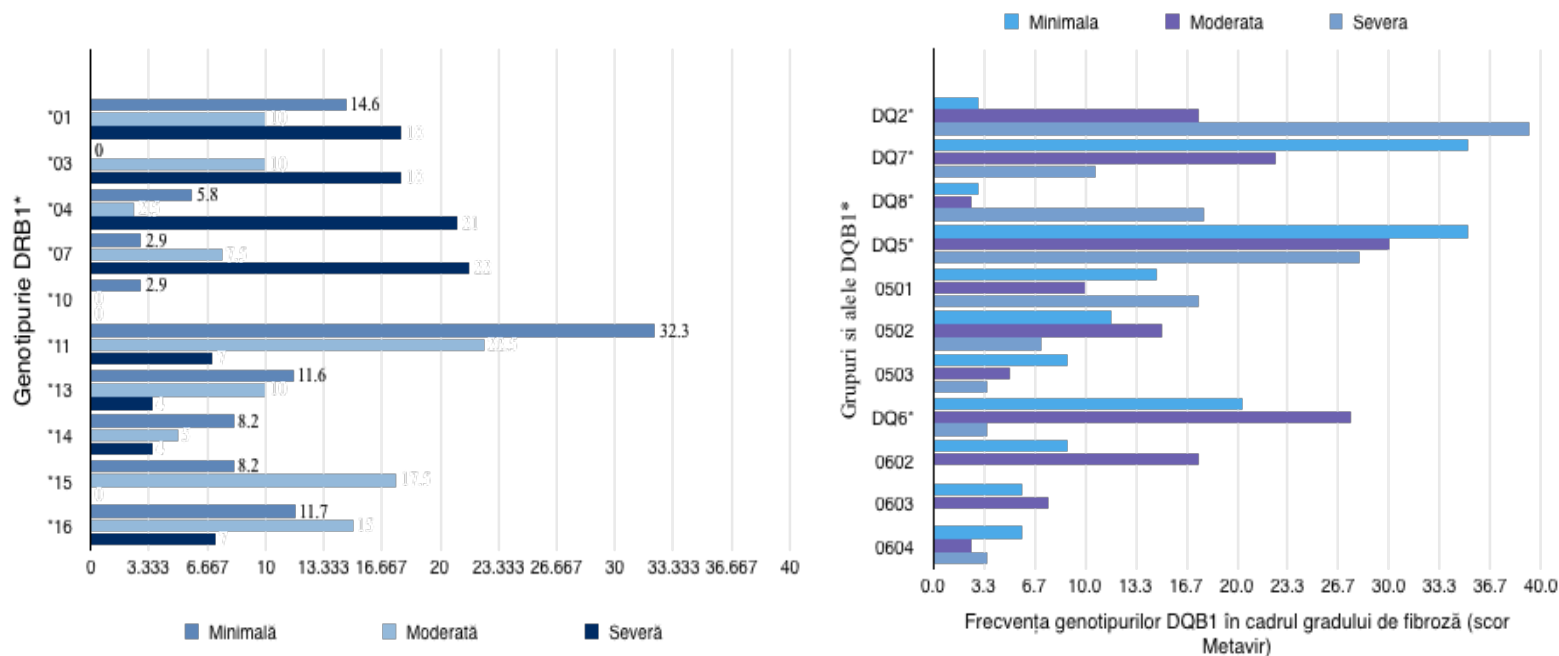
Distribuțiile alelice HLA- DRB1 și asocierea acestora cu gradul de afectare hepatică sunt prezentate în teză în cadrul Tabelului nr. 13 și Graficului nr. 16.

- Grupul alelic DR *03 reprezentat prin alela 0301 nu a fost prezent în cazul pacienților cu fibroză minimală, fiind repartizat aproximativ uniform în celelalte două grupuri de pacienți cu fibroză moderată (10%) și severă (17.8%), de asemenea grupul DR *07 cu alela *0701 are cea mai mare pondere în rândul pacienților cu fibroză severă (15%).
- Grupul alelic DR*11 a fost de departe cel mai bine reprezentat în grupul de pacienți cu fibroză minimală și moderată, reprezentat prin cele două alele: - alela *1101 (37.6%) și alela *1104 (17.2%

Analiza alelelor HLA-DQB1 la pacienții luați în studiu cu hepatita C a identificat alele cu următoarea distribuție Graficul nr.17:

Alelele din grupul DQ*02 au fost foarte rescute la pacienții cu fibroză severă 11 cazuri, 39.2% comparativ cu grupul de pacienți cu fibroză minimală unde am gasit un singur caz cu această alelă.

- grupul alelic heterogen DQ*03 a reprezentat cea mai mare parte a alelelor din grupul de pacienți cu fibroză minimală 38.1% și moderată 25.4%(Graficul nr. 17)



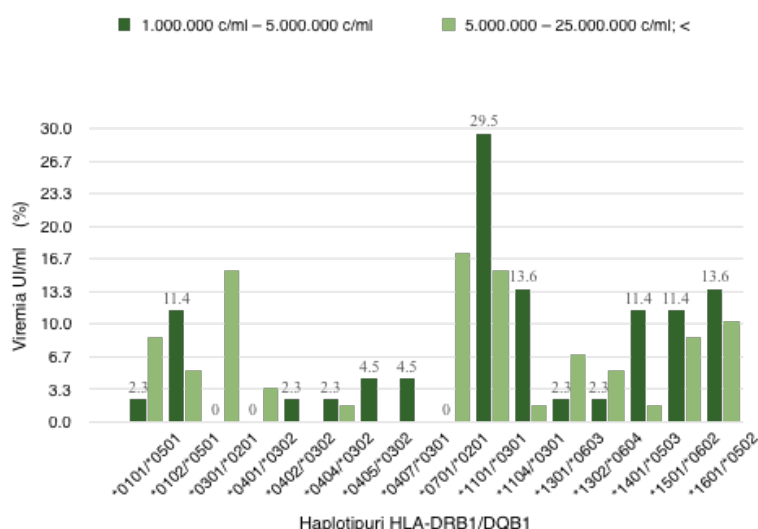
Graficul nr.16. Frecvența genotipurilor DRB1 în funcție de gradul fibrozei hepatice (scorul Metavir)

Graficul nr.17. Distribuția alelelor și genotipurilor HLA- DQB1 în funcție de gradul fibroză

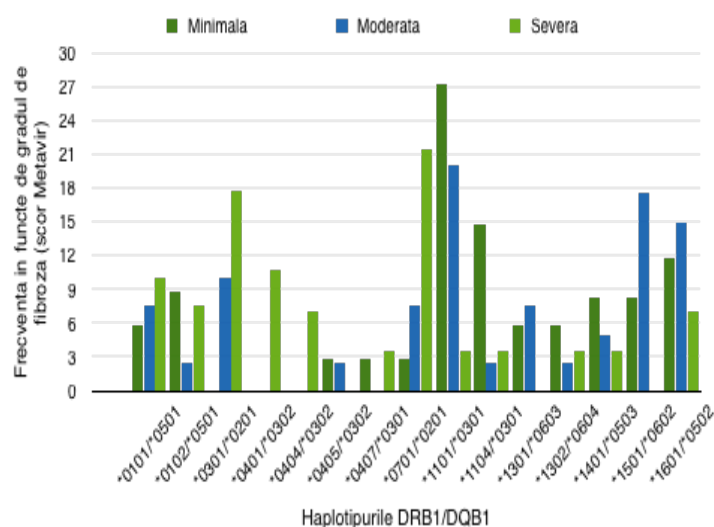
Asocierea haplotipurilor HLA DRB1-DQB1 cu viremia și gradul de fibroză la debut în cazul pacienților cu HCV

- Cea mai mare pondere este reprezentată de haplotipul *0701/*0201 în cazul pacienților cu valori viremice ridicate înainte de începerea tratamentului (Graficul.15), iar acienții care au avut valori medii si mici ale viremiei au prezenat cel mai frecvent haplotipul *1101/*0301.

Cea mai mare pondere este reprezentată de haplotipul *1101/*0301 în cazul pacienților care au prezentat fibroză minimală înainte de începerea tratamentului (Graficul. nr.18),iar pacienții cu fibroză moderată au prezenat cel mai frecvent haplotipul *1101/*0301, *1501/0602 sau *1601/*0502. În contrast haplotipul *0701/*0201 este cel mai frecvent haplotip prezent în cazul pacienților cu fibroză marcată.



Graficul nr.15. Distribuția haplotipurilor HLA DRB1/DQB1 în funcție de viremia la debut a pacienților cu HCV



Graficul nr.18. Distribuția haplotipurilor HLA- DRB1/DQB1 în funcție de gradul fibroză

Concluzii:

Pentru locusul DRB1, alelele observate ce ar putea conferii predispoziție pentru persistență virală și cronicizare au fost din grupul DR *03 și *07 care au fost prezente doar la pacienții cu viremie severă, *0301 (15.5%), *0701 (17,2%), aceleaș grupuri alelice au fost la fel de bine reprezentate și în cazurile cu fibroză severă *0701 (15%), *0301 fibroză moderată (10%) și severă (17.8%). Am constatat o frecvență

mai mare a alelelor din grupul DR*11 bine reprezentat în cazul pacienților cu valori viremice mici și moderate (43,1%), de asemenea a fost de departe cel mai bine reprezentat și în grupul de pacienți cu fibroză ușoară, *1101 (37.6%). Alelele din grupul DQ2 fiind cel mai bine reprezentate prin alela *0201 în cadrul grupului de pacienți cu valori ale ARN-HCV ridicate (38.2%) și activitate necroinflamatorie moderat- marcată.

Studiul 3 – Corelații între variația răspunsului la tratamentul cu PegIFN/RBV și prezența genotipurilor HLA-DRB1-DQB1 și IL28B la pacienții cu hepatita C

Ținta tratamentului antiviral cu IFN/RBV a fost răspunsul virusologic susținut („sustained virological response”, SVR) definit ca ARN-HCV nedetectabil la 6 luni după încheierea tratamentului ce a caracterizat grupul de pacienți SVR, iar lipsa de răspuns virusologic (“non-response”) definit printr-o scădere a viremiei cu $<2 \log_{10}$ față de nivelul de bază la 12 săptămâni de la începutul tratamentului a definit grupul de pacienți non responders (non-R) la care s-a întrerupt ulterior tratamentul antiviral în săptămâna 12. Pacienții care au rămas negativi pentru ARN-VHC pe parcursul acestei perioade au fost grupați ca RVS în timp ce ceilalți au fost grupați ca Non-R.

O medie de vârstă generală mai scăzută s-a observat la toți pacienții ce au obținut SVR indiferent de sex și la pacienții din lotul de control (media la sexul masculin 38.367 min 13 ani - max 63ani și 36.415 la sexul feminin (min18ani -max 65ani). (Tabelul.16)

Răspunsul la tratamentul cu RBV/IFN	nr.	Frecv (%)	Sex (%)		Media de vârstă		Deviația standard	
			Masculi n	Femini n	Masculin	Feminin	Masculin	Feminin
	(n=153)		n=77 (50,3%)	n=76 (49,7%)	min/max	min/max		
SVR	32	20,9	15	17	41.133(25-75)	47.823(26-68)	16.300	11.029
Non-R	19	12,4	13	6	45.000 (24-65)	53.833(40-63)	16.170	9.368
Lot control	102	66,7	49	53	38.367(13-63)	36.415(18-65)	12.175	11.634

Tabelul.16. Frecvența cazurilor studiate în grupurile de pacienți SVR, Non-R și în lotul de control în funcție de sex și media de vârstă, n=nr. de subiecți.

Asocierea alelelor HLA DRB1-DQB1 cu răspunsul la tratamentul cu PegIFN/RBV

Când frecvența alelelor pentru cei 32 pacienți (P) SVR (2n=64) și cei 19 pacienți non-R (2n=38) la

fiecare locus a fost comparată cu cea obținută pentru cei 102 controlii (C) ($2n=204$), o diferență semnificativă statistic a fost găsită pentru alela HLA-DRB1*0101 în ambele comparații făcute între grupurile SVR vs. C ($p=0.003$) și non-R vs. C ($p=0.06$), arătând o asociere cu lotul de pacienți fiind găsită la o frecvență mult mai mare (7,8%) decât în lotul de control (1%). O altă asociație semnificativă statistic a fost găsită pentru DRB1*0701 ($P=0.012$), când au fost comparate grupurile de SVR vs. C, având o frecvență mai mare în lotul de control 12.3%. De asemenea alela *07 a avut semnificație statistică și în cazul comparației între grupurile non-R vs. C ($p=0.043$), fiind una dintre alele comune în rândul pacienților non-R 23,7%. Alte alele care au avut semnificație statistică în urma comparațiilor dintre grupuri au fost DRB1*0301 cu grupul de pacienți non-R ($p=0.005$) și DRB1*1101 ($p=0.001$) cu grupul de pacienți SVR.

În urma comparațiilor făcute între frecvența alelelor DQB1 dintre grupurile de pacienți SVR vs. C și grupul de pacienți non-R vs. C o singură alelă DQB1*0201 a fost găsită având importanță statistică . $p=0.002$, OR 0.136 95% CI 0.03-0.58 aceasta având o frecvență mai mare în lotul de C, iar când s-au comparat grupurile non-R vs. C (23.1%), asocierea semnificativa cu grupul de C a fost constatată tot în cazul alelei DQB1*0201, $p=0.01$, OR 3.42, 95% CI 1.65-7.09.

Riscul privind răspunsul la tratament la pacienții cu hepatita C conferit de alelele HLA-DRB1-DQB1 în grupul de pacienți studiat

O asociere extrem de semnificativă a fost găsită pentru HLA-DRB1*0701 ($P<0.001$), riscul de a avea pacienți prezenți în grupul Non-R fiind de 19.55 ori mai mare, IC 95% pt. OR = (2,36-161,63), iar riscul de a nu obține SVR este de 15.15 ori mai mare decât la ceilalți pacienți. IC 95% pt. Rr = (1,99-115,02). (Tabelul nr.19) O altă asociere semnificativă în cadrul acestei comparații de grupuri a fost a alelei DRB1*0301 cu pacienții non responderi ($P<0.001$), riscul de a avea pacienți cu DRB1 *0301 prezenți în grupul Non-R este de 16.80 ori mai mare IC 95% pt. OR = (2,00-140,50), iar riscul de non răspuns la tratament este de 13.47 ori mai mare decât la ceilalți pacienți IC 95% pt. Rr = (1,75-103,59). (Tabelul nr.19) De asemenea analiza statistică a evidențiat alela *1101 ca fiind asociată cu răspunsul la tratament în acest caz $p<0,001$, riscul de a avea pacienți cu DRB1 *1101 prezenți în grupul Non-R este foarte mic de 0.30 IC 95% pt. OR = (0,09-0,96), iar riscul de a nu răspunde la tratament este de asemenea scăzut în cazul acestor pacienți 0.37 IC 95% pt. Rr = (0,13-1,02). (Tabelul nr.19)

Pentru a determina riscul relativ în cadrul răspunsului la tratament la pacienții cu hepatita C frecvența alelelor *HLA DQB1* în grupul de pacienți non-RVS a fost comparată cu grupul de pacienți care au obținut SVR și o asociere extrem de semnificativă a fost găsită pentru *HLA-DQB1*0201* ($P<0.001$), riscul de a avea pacienți cu *DQB1 *0201* prezenți în grupul Non-R este de 25.09 ori mai mare IC 95% pt. OR = (5.34, 117.81), iar riscul de a nu răspunde la tratament este de 14.31 ori mai mare comparativ cu pacienții SVR IC 95% pt. Rr = (3.49, 58.58). (Tabelul nr.21). O altă asociere semnificativă în cadrul acestei comparații de grupuri a fost cea a alelei *DQB1*0301* cu pacienții responderi la terapie SVR ($P<0.01$), OR 0.25, 95% CI 0,08-0,82), aceștia prezintă un risc foarte scăzut de 0.33 de ori de a nu răspunde la tratament. (Tabelul nr.2

Alela/ locus	non-R		vs.		SVR		RR	95% C.I
	nr.	frecv.	χ^2	p val.	OR	95% C.I		
DRB1	nonR/ SVR	non-R/SVR (%)	non-R +SVR (2n=102)					
0101	1/5	2,6/7,8	0,156	0,282	0,31	0,03-2,83	0,33	0,04-2,77
0102	3/5	7,9/7,8	0,001	0,988	1,01	0,22-4,49	1,01	0,25-3,99
0301	8/1	21,1/1,6	11,258	<0,001	16,80	2,00-140,50	13,47	1,75-103,59
0401	1/2	2,6/3,1	0,020	0,887	0,83	0,07-9,56	0,84	0,07-8,97
0404	1/1	2,6/1,6	0,142	0,707	1,70	0,10-28,03	1,68	0,10-26,15
0701	9/1	23,7/1,6	13,195	<0,001	19,55	2,36-161,63	15,15	1,99-115,02
1101	4/18	10,5/28,1	4,365	<0,01	0,30	0,09-0,96	0,37	0,13-1,02
1301	2/3	5,3/4,7	0,017	0,896	1,13	1,18-7,08	1,12	0,19-6,42
1302	1/3	2,6/4,7	0,267	0,605	0,55	0,05-5,48	0,56	0,06-5,20
1501	2/8	5,3/12,5	1,412	0,235	0,38	0,07-1,93	0,42	0,09-1,88
1601	6/6	15,8/9,4	0,945	0,331	1,813	0,54-6,08	1,684	0,585-4,852

Tabelul. 19. Asocierea alelelor *HLA -DRB1* cu răspunsul la răspunsului

tratamentul cu FN/RBV studiu comparativ între grupul pacienților non-responderi (non-R) și pacienții responderi (SVR). Alele cu semnificație statistică sunt marcate cu caractere în bold, unde “-” reprezintă alela lipsă, n= nr. de cromozomi.

Alela/ locus	non-R		vs.		SVR		RR	95% C.I
	nr.	frecv.	χ^2	p val.	OR	95% C.I		
DQB1	nonR/ SVR	non-R/SVR (%)	non-R +SVR (2n=102)					
DQ2*								
0201	17/2	44,7/3,1	27,237	<0,001	25,09	5,34-117,8	14,31	3,49-58,58
DQ7*								
0301	4/20	10,5/31,2	5,691	<0,01	0,25	0,081-0,82	0,33	0,12-0,91
DQ8*								
0302	2/5	5,3/7,8	0,242	0,622	0,65	0,12-3,58	0,67	0,13-3,30
DQ5*								
0501	4/11	10,5/17,2	0,843	0,358	0,56	0,16-1,92	0,61	0,21-1,78
0502	1/5	2,6/7,8	0,156	0,282	0,31	0,03-2,83	0,33	0,04-2,77
DQ6*								
0602	2/8	5,3/12,5	1,412	0,235	0,389	0,07-1,93	0,421	0,09-1,88
0603	2/3	5,3/4,7	0,017	0,896	1,130	1,18-7,08	1,123	0,19-6,42
0604	1/3	2,6/4,7	0,267	0,605	0,550	0,05-5,48	0,561	0,06-5,20

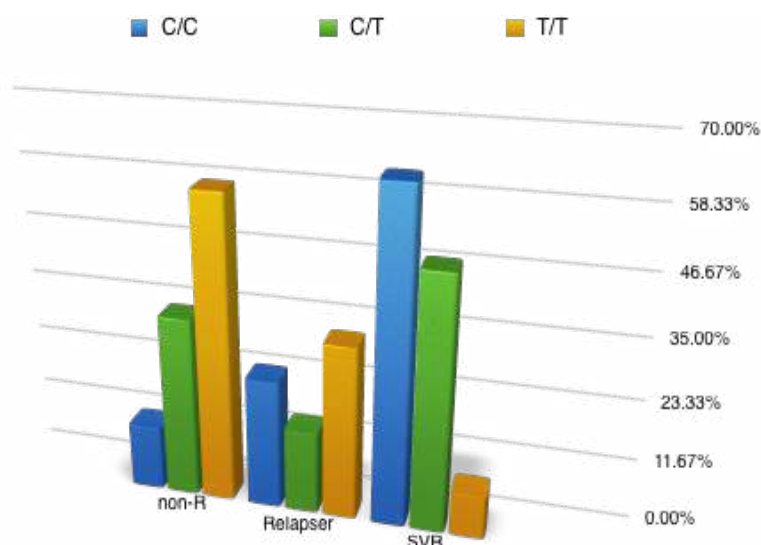
Tabelul.21. Riscul alelelor *HLA -DQB1* în cadrul

la terapia cu PegIFN/RBV prezentată în comparație între grupul de pacienți SVR și grupul de pacienți non-R: SVR vs. grupul non-R. Asociatia cu boala (fie pozitivă sau negativă) în cadrul grupului alelic *DQB1* este evidențiată cu caractere bold. Alelele individuale sunt prezentate cu caractere italic. Frecvența alelică a fost calculată ținând cont de numărul diploid de cromozomi în fiecare grup (2n). Unde n=numărul de cromozomi.

Asocierea polimorfismului genei interleukinei IL28B cu răspunsul la tratamentul cu PegIFN/RBV în lotul de pacienți cu HCV

În lotul analizat există un procent scăzut de pacienți homozigoți C/C în gena IL28B (15.1%), profil confirmat ca predictor al evoluției favorabile, fiind asociat cu obținerea răspunsului virusologic rapid (RVR) și a răspunsului virusologic susținut (SVR).

Frecvența alelei C rs12979860 este observată într-un procent de 62.5% la pacienții cu genotipul C/C care au obținut un SVR în comparație cu 48.3% la pacienți SVR care au fost heterozigoți C/T. În studiul de față am constatat că deși alelele C sunt mai frecvente în rândul pacienților cu SVR, în mod paradoxal au fost asociate și cu niveluri mai crescute de ARN-HCV (încărcături viremice ridicate 5.000.000 – 25.000.000 copii/ml; < 25.000.000 copii/ml) în comparație cu pacienți purtători de alele T.



Graficul nr.21. Asocierea polimorfismului genei interleukinei IL28B cu răspunsul la tratamentul cu PegIFN/RBV în lotul de pacienți cu HCV

Niveluri mai mari de ARN HCV au fost observate și la o parte din pacienți înainte de începerea tratamentului și care erau purtători ai alelei C. Pacienții homozigoți purtători ai alelei T/T au fost evidențiați într-un procent ridicat în grupul de pacienți non-R 58.3% și în grupul de pacienți care au recăzut (33.3%), un mic procent fiind prezent în cazul pacienților care au obținut SVR pe durata terapiei (8.4%).

Concluzii:

În studiul efectuat privind Corelații între variația răspunsului la taratamentul cu PegIFN/RBV și prezența

genotipurilor HLA-DRB1-DQB1 și IL28B la pacienții cu hepatita C am observat atât asocieri pozitive (alela/haplotipul conferă risc pentru boală) cât și negative (alela/haplotipul conferă protecție pentru boală). Analiza riscului relativ (RR) conferit de alelele locusului HLA-DRB1 a evidențiat valori ale riscului relativ între 25.09 (cea mai predispozantă alelă) și 0.03 (alela care conferă cea mai mare protecție). În cazul studiului prezentat a fost evidențiat un număr relativ mare de pacienți cu genotip homozigot C/C care au avut recădere la diferite intervale de timp după încetarea tratamentului și se poate să existe posibilitatea ca pacienții cu genotipul favorabil C/C să prezinte o rată adecvată de SVR la administrarea tratamentului standard pe o perioadă mai scurtă (24 săptămâni vs. 48 săptămâni sau mai mult timp). O altă explicație este dată de un studiu recent care a demonstrat că riscul de recădere după tratamentul antiviral standard ar putea fi de asemenea dependent de viremia reziduală minimă și nu de genotipul IL28B.

Concluzii generale și perspective ale cercetării

- În analiza univariată prezentă pacienții cu răspuns virusologic susținut au vârste semnificativ mai mici (cu o medie de 42.8 ani), provin mai ales din mediul urban, au polimorfism CC al IL28B și valori relativ mai crescute ale încărcăturii virale baseline (ARN HCV) la momentul inițierii terapiei cu IFN. De asemenea, acești pacienți au avut valori reduse semnificativ ale scorului Metavir pt evaluarea gradului de fibroză și activității necroinflamatorii hepatice și răspuns virusologic favorabil la 4 și 12 săptămâni de tratament (RVR, respectiv răspuns virusologic rapid EVR).
- Când s-au comparat cele două grupuri de pacienți în cazul răspunsului la tratament, asocieri semnificative s-au observat la diferiți loci, mai ales atunci când grupul de non-R a fost comparat cu grupul SVR, o asociere extrem de semnificativă a fost găsită pentru alele HLA-DQB1*0201 HLA-și DRB1 *0701 în cazul pacienților Non-R, alela DRB1 *0701 având o frecvență semnificativ mai mare în acest grup comparativ cu grupul SVR. Fiind una dintre alele comune în rândul pacienților non-R dar și în lotul de control se poate argumenta ca populația studiată este una de risc în privind persistența virală în hepatita C.
- O alta asociere cu clearance-ul viral semnificativa a fost constatată de asemenea în cazul alelei HLA-DQB1*0301 în cazul în care grupul de Non-R a fost comparat cu grupul de SVR, sugerând că

ar putea exista o tendință în asocierea a acestei alele cu o boală de ficat "mai puțin severă".

- Aceste observații sunt interesante deoarece indică un posibil mecanism prin care HLA-DQB1*0301 este cumva implicată în clearanceul viral spontan la pacienți cu imunitate naturală sau printr-un sistem imunitar suplimentat de tratamentul cu IFN și putem presupune că pacienții studiați ce au prezentat HLA-DQB1*0301 nu au putut realiza în mod spontan eliminarea virusului, dar au avut SVR în urma terapiei cu IFN.
- În mod similar, comparațiile grupurilor s-au efectuat pentru haplotipuri, unde doar două haplotipuri, HLA-DRB1*0701/DQB1*0201 și HLA-DRB1*1101/DQB1*0301, au demonstrat asocieri semnificative când grupul de non-R a fost comparat cu grupul SVR.
- Am demonstrat o asociere negativă, atât pentru locusul DRB1 – alela *1101, cât și pentru DQB1 – alela *0301 (DQ7); aceste două alelele formează haplotipul DRB1/DQB1 *1104/*0301 care, la rândul lui a fost semnificativ crescut la pacienții SVR. Se poate afirma că, pe eșantionul studiat, haplotipul *1104/*0301 conferă protecție pentru hepatita C, preconizând un răspuns virologic susținut, rezultat din acțiunea eficientă a interferonului într-un scenariu care duce favorabil imunologic la distrugerea hepatocitelor infectate.
- Deoarece alela DRB1 *1101 a fost găsită la o frecvență mai scăzută comparativ la pacienții non-R, am presupus că aceasta este probabil, responsabilă pentru clearance-ul viral, în acord cu alte studii anterioare din populația Europeană caucaziană .
- Nivelurile mai mari ale viremiei (ARN HCV) observate la pacienții purtători ai alelei C care este considerată a fi asociată cu o rată mai crescută a RVS în studiul de față, ar putea fi explicat prin faptul că deși diferențele valorilor viremice nu sunt foarte mari, nivelurile mai mari de ARN HCV la pacienții cu genotip C/C ar putea facilita activarea sistemului imun înăscut și controlul infecției în cursul tratamentului. S-ar putea presupune că în plus față de nivelul bazal de ARN HCV, genotipul IL28B ar putea influența și cinetica răspunsului la tratamentul cu PegIFN/RBV.
- Datele disponibile în studiu ar putea orienta cu privire la pacienții care prezintă un genotip nefavorabil (C/T sau T/T) ce ar putea să fie incluși în categoria „difícil de tratat” în același mod în care sunt considerați și alți factori de prognostic negativ (ca de exemplu, fibroza avansată) dar cu toate acestea sunt necesare studii suplimentare pe un lot mai mare de pacienții pentru confirmarea

acestui efect, deoarece este cunoscut faptul că genotipul IL28B nu are o valoare predictivă pozitivă de 100% pentru SVR, de aceea nu ar trebui utilizat ca factor predictiv unic în stabilirea deciziilor terapeutice.

- În lotul de subiecți analizat puternica asociere dintre DQB1*0201 cu răspunsul nefavorabil la tratament sugerează faptul că nu un haplotip ci mai degrabă o alela este implicată în non răspunsul la tratament aceasta fiind în dezechilibru de linkage este prezentă atât în alcătuirea haplotipului DRB1*0701/DQB1*0201 cât și DRB1*0301/DQB1*0201 ambele alele DR *0701 și *0301 fiind prezente la pacienții nonresponderi.
- Până în prezent nu am întâlnit nici un alt studiu care a demonstrat asocierea unui haplotip sau alela HLA-DRB1/DQB1 cu evoluția VHC la pacienții din România, aceasta fiind dovedită de alte studii asemănătoare efectuate la pacienții din alte populații, indicând din nou necesitatea de a repeta astfel de studii.
- Informațiile prezentate în studiu ar putea avea implicații importante pentru managementul pacienților cu HCV genotip 1 în România, spre deosebire de alte studii raportate în diferite populații europene și non europene, care au găsit o rată de răspuns mai mare la tratament în cazul pacienților cu HLA-DRB1*0701, am constatat că în populația noastră acești pacienți nu au putut realiza clearance viral (SVR) considerând aceasta o alela de risc în studiul de față pt populația dată.
- Acest lucru este important dacă va fi confirmat și de alte studii în populația noastră, deoarece în practica clinică normală în România pacienții sunt tratați cu terapia standard IFN/RBV (din cauza problemelor costului ridicat) iar dacă tipizarea HLA la acești pacienți ar putea fi realizată înainte de începerea tratamentului și o alela sau haplotip asociat cu persistența virală a fost găsit, acești pacienți ar putea primi un tratament mai agresiv, în loc să fie tratați cu terapia standard.
- Importanța implicațiilor studiului actual sunt relevante numai pentru pacienții care au primit terapia standard IFN /RBV și ar putea să nu fie valabil pentru pacienții care au primit alte tipuri de terapii
- Studiul este valabil pentru țările mai puțin dezvoltate în care pacienții nu își pot permite alte terapii și în care tratamentul standard este în mare parte prima opțiune.
- Estimarea evoluției infecției HCV la ora actuală bazată doar și numai pe genotipurile HLA este foarte puțin probabil să se utilizeze în practica clinică datorită faptului că s-a stabilit riscul relativ

conferit de posedarea unei anumitei alele specifice a nu fi foarte mare (în general între 2 și 4), mai ales atunci când este calculat în populația generală și se ia în considerare frecvența de regulă scăzută a alelelor în populația generală, aceasta este ca rezultat al gradului mare de polimorfisme la nivelul locilor MHC.

Bibliografie selectivă

1. Dustin, L.B.; Rice, C.M. *Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C*. *Annu. Rev. Immunol.* 2007, 25, 71-99.
2. Thimme, R.; Bukh, J.; Spangenberg, H.C.; Wieland, S.; Pemberton, J.; Steiger, C.; Govindarajan, S.; Purcell, R.H.; Chisari, F.V. *Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2002, 99, 15661-15668.
3. Asselah T.; Bieche I.; Paradis V.; Bedossa P.; Vidaud M.; Marcellin P. *Genetics, genomics, and proteomics: implications for the diagnosis and the treatment of chronic hepatitis C*. *Semin. Liver Dis.* 2007, 27, 13-27.
4. Yee L.J. *Host genetic determinants in hepatitis C virus infection*. *Genes Immun* 2004; 5: 237-245
- Neumann-Haefelin, C.; Spangenberg, H.C.; Blum, H.E.; Thimme, R. *Host and viral factors contributing to CD8+ T cell failure in hepatitis C virus infection*. *World J. Gastroenterol.* 2007, 13, 4839-4847.
5. Rajagopalan, S.; Long, E.O. *Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease*. *J. Exp. Med.* 2005, 201, 1025-1029.
6. Harris, R.A.; Sugimoto, K.; Kaplan, D.E.; Ikeda, F.; Kamoun, M.; Chang, K.M. *Human leukocyte antigen class II associations with hepatitis C virus clearance and virus-specific CD4 T cell response among Caucasians and African Americans*. *Hepatology* 2008, 48, 70-79.
7. Qian Y, Zhang L, Liang XM, Hou JL, Luo KX. *Association of immune response to hepatitis B vaccine with HLA-DRB1*02, 07, 09 genes in the population of Han nationality in Guangdong Province*. *Diyi Junyidaxue Xuebao* 2002; 22: 67-69
8. McDermott AB, Zuckerman JN, Sabin CA, Marsh SG, Madrigal JA. *Contribution of human leukocyte antigens to the antibody response to hepatitis B vaccination*. *Tissue Antigens* 1997; 50: 8-14
9. Wang, J.H.; Zheng, X.; Ke, X.; Dorak, M.T.; Shen, J.; Boodram, B.; O'Gorman, M.; Beaman, K.; Cotler, S.J.; Hershow, R.; Rong, L. *Ethnic and geographical differences in HLA associations with the outcome of hepatitis C virus infection*. *Viol. J.* 2009, 6, 46.
10. Martin MP, Carrington M. *Immunogenetics of viral infections*. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 510-516
11. Hong X, Yu RB, Sun NX, Wang B, Xu YC, Wu GL. *Human leukocyte antigen class II DQB1*0301, DRB1*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis*. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7302-7307
12. Haeckel, Elmar, et al. *"Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b."* *New England Journal of Medicine* 345.20 (2001): 1452-1457.
13. Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Perez R, Rodriguez M, Fdez-Morera JL, Fuentes D, Rodriguez-Rodero S, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. *Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection*. *J Infect Dis* 2005; 192: 162-165
14. Neumann-Haefelin C, McKiernan S, Ward S, Viazov S, Spangenberg HC, Killinger T, Baumert TF, Nazarova N, Sheridan I, Pybus O, von Weizsacker F, Roggendorf M, Kelleher D, Klennerman P, Blum HE, Thimme R. *Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution*. *Hepatology* 2006; 43: 563-572
15. Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, Ahlenstiel G, Zimmermann H, Leifeld L, Weiss EH, Sauerbruch T, Spengler U. *The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytotoxicity mediated by natural killer cells*. *Am J Pathol* 2005; 166: 443-453
16. Muto H, Tanaka E, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kiyosawa K. *Types of human leukocyte antigen and decrease in HCV core antigen in serum for predicting efficacy of interferon-Alpha in patients with chronic hepatitis C: analysis by a prospective study*. *J Gastroenterol* 2004; 39: 674-680

