

УДК: 616.98:578.828+616.36-002.14]-06-033(477.53)

Марченко О.Г., Коваль Т.І.

АНАЛІЗ ПОШИРЕНOSTІ ПОЛІМОРФІЗМІВ ASP299GLY ГЕНА TLR4 ТА GLN11LEU ГЕНА TLR7 СЕРЕД ВІЛ/ВГС-КОІНФІКОВАНИХ ПОЛТАВСЬКОЇ ОБЛАСТІ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Для досягнення поставленої мети проведено обстеження 175 ВІЛ-інфікованих осіб, які знаходяться під спостереженням у Полтавському обласному центрі профілактики ВІЛ-інфекції та боротьби зі СНІДом та 175 практично здорових жителів Полтавської області. Результати проведених досліджень показали, що у хворих на ВІЛ/ВГС-коінфекцію поліморфнозмінений генотип Asp299Gly гена TLR4 виявлявся у 19,3%, алель 299Gly - у 9,6%, тобто на рівні з ВІЛ-моноінфікованими (11,5% та 5,7% відповідно), що в 5,6-5,8 та в 3,4-3,5 рази перевищує їх частоти в групі популяційного контролю (3,3% і 1,7% відповідно, $p < 0,01$). Ризик розвитку ВІЛ/ВГС-коінфекції при наявності в геномі поліморфізму Asp299Gly гена TLR4 підвищується у 6,9 ($OR = 6,94$, $p = 0,01$), алелі 299Gly - у 6,3 ($OR = 6,31$, $p = 0,01$) рази. Поліморфнозмінені генотипи Gln11Leu і Leu11Leu гена TLR7 реєструвалися у ВІЛ/ВГС-коінфікованих на рівні ВІЛ-моноінфікованих пацієнтів (26,1 % - 27,6%) без статистичної різниці з популяційним контролем (25,9%, $p > 0,05$).

Ключові слова: ВІЛ/ВГС-коінфекція, поліморфізм, ген, генотип, алель.

Протягом останніх 30 років епідемія ВІЛ-інфекції набула величезного значення для світової спільноти. Від початку епідемії до сьогодні близько 78 мільйонів осіб у світі інфікувалися ВІЛ та понад 35 мільйонів померли від захворювань, обумовлених СНІДом. Хвороба характеризується високою динамічністю з прогресуючим негативним соціально-економічним ефектом та високою резистентністю до заходів протидії [1,2].

За даними досліджень останніх років, принаймні 14% ВІЛ-інфікованих осіб у всьому світі коінфіковані вірусом гепатиту С (ВГС) [3], а поширеність ВІЛ/ВГС-коінфекції в країнах Східної Європи, де внутрішньовенне вживання наркотиків (ВВН) залишається провідним шляхом передачі цих інфекцій, досягла показника 83-90% [4]. Коінфекція характеризується певними особливостями перебігу. У ВІЛ/ВГС-коінфікованих пацієнтів рідше спостерігається спонтанний кліренс ВГС та швидше прогресує хронічний гепатит С (ХГС) [5], а цироз печінки, асоційований з ВГС, стає однією з основних причин смерті ВІЛ-інфікованих пацієнтів [6].

Відомо, що вроджена імунна система має велике значення в розвитку первинної імунної відповіді організму на патогени, ключова роль у реалізації якої належить Toll-like рецепторам. TLRs (Toll-подібні рецептори) – структури, що опосередковують розпізнавання мікроорганізмів, регулюють активацію вродженої імунної відповіді і впливають на формування адаптивного імунітету [7]. Численні дослідження довели, що наявність поліморфізму в генах, що кодують певні TLRs, пов'язана з розвитком інфекційних захворювань та впливає на їхній перебіг і наслідки [8].

З точки зору вивчення ВІЛ-інфекції та ВГС особливий інтерес представляють гени TLR4 і TLR7, оскільки TLR4 розпізнає вірусні структурні білки, взаємодіючи з протеїновою оболонкою вірусів, а лігандом гена TLR7 є одноланцюгова РНК. У науковій літературі обговорюється роль поліморфізму Asp299Gly гена TLR4 і Gln11Leu

гена TLR7 в патогенезі ВІЛ-інфекції, розвитку опортуністичних захворювань [9,10], однак, відсутність даних щодо поширеності зазначених поліморфізмів при ВІЛ/ВГС-коінфекції обумовлює необхідність вивчення цього питання.

Мета дослідження

З'ясувати поширеність поліморфізму Asp299Gly гена TLR4 та Gln11Leu гена TLR7 серед ВІЛ/ВГС-коінфікованих Полтавської області.

Матеріали і методи

Для досягнення поставленої мети загалом обстежено 350 осіб - 175 ВІЛ-інфікованих та 175 здорових. Комплексне клініко-лабораторне обстеження хворих проводилося на базі Полтавського обласного центра профілактики ВІЛ-інфекції та боротьби зі СНІДом.

Діагноз ВІЛ-інфекція встановлювався згідно Міжнародної класифікації хвороб 10-го перегляду (МКХ-10) та верифікувався виявленням відповідних серологічних та молекулярно-біологічних маркерів ВІЛ. Антитіла до ВІЛ виявляли в крові методом ІФА (тест-системи Labsistem, Нідерланди). Діагноз ХГС встановлювали згідно міжнародної класифікації хвороб 10 перегляду і міжнародної класифікації хвороб печінки (Лос-Анджелес, 1994) з обов'язковим виявленням РНК ВГС у сироватці крові методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу.

Поліморфну ділянку гена TLR-4 Asp299Gly генотипували методом ПЛР з використанням олігонуклеотидних праймерів. Ампліфікація проведена на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технологія», Росія). поліморфну ділянку Gln11Leu гена TLR7 - методом ПЛР в режимі реального часу з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів, ампліфікатор «ДТ Лайт» (ООО «НПО ДНК-Технологія», Росія).

Для аналізу поширеності поліморфізмів Asp299Gly гена TLR4 та Gln11Leu гена TLR7 об-

стежені були розподілені на 4 групи:

I - ВІЛ/ВГС –коінфіковані (n=88): чоловіків-66 (75,0%), жінок-22 (25,0%) віком від 21 до 51 (середній -34,3±6,5) ;

II – ВІЛ-моноінфіковані (n=87): чоловіків-57 (65,5%), жінок-30 (34,5%) віком від 21 до 55 (середній - 34,9±7,7);

III - популяційний контроль (здорові) для вивчення поширеності поліморфізму Asp299Gly гена TLR4 (n=90): жінок - 40 (44,4%), чоловіків - 50 (55,6%) віком від 23 до 62 років (середній - 41,5±9,9);

IV - популяційний контроль (здорові) для вивчення поширеності поліморфізму для Gln11Leu гена TLR7 (n=85): жінок - 38 (44,7%), чоловіків - 47 (55,3%) віком від 20 до 61 (середній 33,2±7,9).

Розподіл частот алелей і генотипів досліджуваних генів оцінювали на предмет відповідності рівноваги Харді-Вайнберга (HWE) з використанням критерію χ^2 , розрахунок проводили на онлайн-калькуляторах, доступних за посиланнями http://gen-exp.ru/calculator_or.php, http://www.oege.org/software/hwe_mr-calc.shtml, при $p > 0,05$ рівновага вважалась статистично достовірною.

Статистична обробка результатів дослідження проведена за допомогою програми «SPSS 23.0» методами варіаційної статистики, прийнятими в медицині. Порівняння частот генотипів і

алелей проводили за допомогою точного тесту Фішера (F). Ризик розвитку захворювання розраховували як відношення шансів (OR) із зазначенням 95% довірчого інтервалу [95% CI], $OR > 1$ – розглядали як позитивну (підвищений ризик розвитку патології), $OR < 1$ - як негативну (низький ризик розвитку патології) асоціацію алеля або генотипу із захворюванням. Нульовими гіпотезами були відповідність HWE і відсутність асоціації ($OR = 1$). Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$, при p в інтервалі від 0,05 до $\leq 0,1$ відзначали тенденцію до достовірності.

Результати досліджень та їх обговорення

В результаті молекулярно-генетичного обстеження ВІЛ-інфікованих пацієнтів і здорових були виявлені як «дикий» - Asp299Asp, Gln11Gln, так і мутантні Asp299Gly, Gln11Leu і Leu11Leu генотипи досліджуваних генів. Гомозиготний генотип Gly299Gly гена TLR4 не визначався, що відповідає даним наукової літератури про його низьку частоту в популяції. Розподіл генотипів досліджуваних поліморфізмів відповідав рівновазі Харді-Вайнберга як серед хворих, так і серед здорових, що свідчить про репрезентативність вибірки та коректність визначення варіантних маркерів (таблиця 1).

Таблиця 1.
Розподіл генотипів і алелей генів TLR4 і TLR7 у ВІЛ-інфікованих і здорових осіб

	Вибірка	Генотип	N.O	N.E	HWE, χ^2 d. f.=1	Частота алелі	H_{obs}, H_{exp}
TLR4 (Asp299Gly)	I група, n=88	Asp/Asp (AA)	71	71,82	1,01 (p=0,32)	A=0,903 G=0,097	0,193 0,175
		Asp/Gly (AG)	17	15,36			
		Gly/Gly (GG)	0	0,82			
	II група, n= 87	Asp/Asp (AA)	77	77,29	0,32 (p=0,57)	A=0,983 G=0,017	0,115 0,108
		Asp/Gly (AG)	10	9,43			
		Gly/Gly (GG)	0	0,29			
	III група, n=90	Asp/Asp (AA)	87	87,03	0,03 (n=0,87)	A=0,980 G=0,017	0,033 0,033
		Asp/Gly (AG)	3	2,95			
		Gly/Gly (GG)	0	0,03			
TLR7 (Gln11Leu)	I група, n=88	Gln/Gln (AA)	65	66,5	1,99 (p=0,16)	A=0,869 T=0,131	0,261 0,227
		Gln/Leu (AT)	23	19,99			
		Leu/Leu (TT)	0	1,5			
	II група, n=87	Gln/Gln (AA)	63	61,84	3,98 (p=0,05)	A=0,833 T=0,167	0,218 0,278
		Gln/Leu (AT)	19	21,32			
		Leu/Leu (TT)	5				
	IV група n=85	Gln/Gln (AA)	63	61,84	1,01 (p=0,32)	A=0,853 T=0,147	0,224 0,251
		Gln/Leu (AT)	19	21,32			
		Leu/Leu (TT)	3	1,84			

Примітка. N.O. і N.E. - спостережувана і очікувана чисельність генотипів; критерій χ^2 використаний для оцінки відповідності спостережуваного розподілу генотипів очікуваному при HWE; d. f. - кількість ступенів свободи; H_{obs} і H_{exp} - спостережувана і очікувана гетерозиготність, відповідно.

Порівняльний аналіз генотипів і алелей поліморфного локусу Asp299Gly серед ВІЛ/ВГС-коінфікованих та ВІЛ-моноінфікованих пацієнтів і здорових осіб дозволив встановити статистично значимі відмінності (табл.2). Так, серед пацієнтів I групи «дикий» генотип гена TLR4 мав місце у 80,7%, «мутантний» - у 19,3%, що в 5,8 разу перевищувало дані популяційного контролю ($p=0,00$). Аналогічною була частота виявлення

поліморфізму гена TLR4 у групі ВІЛ-моноінфікованих: «дикий» генотип гена TLR4 визначався у 88,5%, а гетерозиготний Asp299Gly - у 11,5%, що виявилось у 3,5 рази частіше порівняно з III групою - 96,7% і 3,3% відповідно ($p<0,05$). Результати порівняльного аналізу частот алелей у ВІЛ/ВГС-коінфікованих узгоджувалися з даними вивчення частот генотипів: поліморфнозмінена алель 299Gly у даній категорії

пацієнтів визначалася в 5,6 разу частіше, ніж у здорових (9,6%, проти 1, 7 %, $p < 0,001$), а за даними розрахунку показника OR наявність алелі 299Gly гена TLR4 в 6,3 рази підвищує ризик розвитку ВІЛ/ВГС-коінфекції, $OR = 6,31$ [95% CI 1,81-21,93]. Аналіз частот алелей у групі ВІЛ-моноінфікованих встановив, що поліморфнозмінена алель у цій групі зустрічалась у 3,4 разу частіше, але без статистично значущих відмінностей між хворими і здоровими.

Однак, за даними розрахунку показника відношення шансів (OR) встановлено, що за умови інфікування ВІЛ і ВГС у людей з генотипом Asp299Gly гена TLR4 ризик розвитку ВІЛ/ВГС-коінфекції зростає в 6,9 ($p < 0,05$), а ВІЛ-моноінфекції – в 3,8 разу ($p < 0,05$).

Поширеність генотипів і алелей поліморфно-

го локусу Gln11Leu гена TLR7 серед хворих як з ВІЛ/ВГС-коінфекцією, так і ВІЛ-моноінфікованих практично не відрізнялись від здорових. Як видно з табл. 3, за даними розрахунку точного тесту Фішера і OR не виявлено статистично значимої різниці між наявністю «дикого» і «мутантних» генотипів і алелей 11Leu гена TLR7 у осіб I, II і IV груп. В цілому поліморфнозмінені генотипи Gln11Leu + Leu11Leu гена TLR7 реєструвалися у 25,8% ВІЛ/ВГС-коінфікованих, 27,5% ВІЛ-моноінфікованих та 25,9% здорових, а поліморфнозмінена алель 11Leu – у 13,1%, 16,7% та 14,7% відповідно.

Порівняльний аналіз поширеності поліморфізмів генів TLR4 та TLR7 у групах ВІЛ/ВГС-коінфікованих і ВІЛ-моноінфікованих не виявив достовірно значимої різниці між ними.

Таблиця 2.

Частота поліморфних генотипу Asp299Gly та алелі 299Gly TLR4 у ВІЛ/ВГС-коінфікованих пацієнтів

Генотипи та алелі	I група n=88 абс (%)	II група n=87 абс (%)	III група, n=90 абс (%)	p (F) I-III	p (F) II-III	p (F) I-II	OR [95% CI] I-III	OR [95% CI] II-III	OR [95% CI] I-II
Asp299Asp	71 (80,7)	77 (88,5)	87 (96,7)	0,001	0,0456	0,209	0,14 [0,04-0,51]	0,27[0,07-1]	0,54[0,23-1,26]
Asp299Gly	17 (19,3)	10 (11,5)	3 (3,3)				6,94 [1,96-24,65]	3,77[1-14,19]	1,84[0,79-4,29]
299Asp	159 (90,4)	164 (94,3)	177 (98,3)	0,001	0,496	0,229	0,16 [0,05-0,55]	0,28[0,08-1,03]	0,57[0,25-1,28]
299Gly	17 (9,6)	10 (5,7)	3 (1,7)				6,31 [1,81-21,93]	3,6 [0,97-13,3]	1,75[0,78-3,95]

Примітка: p (F) - точний тест Фішера

Таблиця 3.

Частота поліморфних генотипів Gln11Leu, Leu11Leu та алелі 11Leu TLR7 у ВІЛ/ВГС коінфікованих пацієнтів

Генотипи та алелі	I група n=88 абс (%)	II група n=87 абс (%)	IV група, n=90 абс (%)	p (F) I-IV	p (F) II-IV	p (F) I-II	OR [95% CI] I-IV	OR [95% CI] II-IV	OR [95% CI] I-II
Gln11Gln	65 (73,9)	63 (72,4)	63 (74,1)	1,000	0,864	0,866	0,99 [0,5-1,95]	0,92[0,47-1,8]	0,93[0,48-1,81]
Gln11Leu+ Leu11Leu	23 (26,1)	24 (27,6)	22 (25,9)				1,01[0,51-2,0]	1,09[0,56-2,14]	1,08[0,55-2,1]
Gln11Leu	23 (26,1)	19 (21,8)	19 (22,4)	0,723	0,721	0,723	0,85[0,42-1,72]	1,16[0,57-2,35]	0,85[0,42-1,72]
Leu11Leu	0 (0)	5 (5,7)	3 (3,5)	0	0,718	0,058	0[0]	0,6[0,14-2,62]	0 [0]
11Gln	153 (86,9)	145 (83,3)	145 (85,3)	0,756	0,658	0,369	0,87[0,47-1,6]	0,86[0,48-1,54]	0,75[0,42-1,36]
11Leu	23 (13,1)	29 (16,7)	25 (14,7)				1,15[0,65-2,11]	1,16[0,65-2,08]	1,33[0,74-2,41]

Примітка: p (F) - точний тест Фішера

Висновки

1. У хворих на ВІЛ/ВГС-коінфекцію поліморфнозмінений генотип Asp299Gly гена TLR4 виявлявся у 19,3%, алель 299Gly - у 9,6%, тобто на рівні з ВІЛ-моноінфікованими (11,5% та 5,7% відповідно), що в 5,6-5,8 та в 3,4-3,5 разу перевищує їх частоти в групі популяційного контролю (3,3% і 1,7% відповідно, $p < 0,01$).

2. Ризик розвитку ВІЛ/ВГС-коінфекції при наявності в геномі поліморфізму Asp299Gly гена TLR4 підвищується у 6,9 ($OR = 6,94$, $p = 0,01$), алелі 299Gly – у 6,3 ($OR = 6,31$, $p = 0,01$) разу.

3. Поліморфнозмінені генотипи Gln11Leu і Leu11Leu гена TLR7 реєструвалися у ВІЛ/ВГС-коінфікованих на рівні ВІЛ-моноінфікованих пацієнтів (26,1 % - 27,6%) без статистичної різниці з популяційним контролем (25,9%, $p > 0,05$).

Література

- Global AIDS update: UNAIDS [Electronic resource] // Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, 2016. - Access mode: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/global-AIDS-update-2016_en.pdf
- Отчетность о достигнутом прогрессе в осуществлении глобальных мер в ответ на СПИД в 2016 году. Мониторинг выполнения Политической декларации Организации Объединенных Наций по ВИЧ и СПИДу 2011 года // ЮНЭЙДС, 2016. – 243 с.
- Alter M.J. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection / M.J. Alter // J Hepatology. – 2006. - № 44 (suppl. 1). - P. 6–9.
- Гураль А.Л. Характеристика и тенденции развития эпидемического процесса гепатита С в Украине / А.Л. Гураль, В.Ф. Мариевский, Т.А. Сергеева, В.Р. Шагинян, О.Н. Рубан // Профілактична медицина. - 2011. - №1(13). - С.9-18.
- Thomas D.L. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors / D.L. Thomas, J. Astemborski, R.M. Rai [et al.] // JAMA. - 2000. - P. 450–456.
- Shepard C.W. Global epidemiology of hepatitis C virus infection / C.W. Shepard, L. Finelli, M.J. Alter // Lancet Infect Dis. - 2005. - V.5. - P.558–567.
- Дранник Г. Н. Современные представления о механизмах врожденного и приобретенного иммунитета и их взаимодействие (часть 2) [Электронный ресурс] / Г. Н. Дранник // Ліки України. -

2013. - № 6. - С. 42-47. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/likukr_2013_6_9]
8. Skevaki C. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases / C. Skevaki, M. Pararas, K. Kostelidou, A. Tsakris, J. G. Routsias // *Clinical & Experimental Immunology*. - 2015. - V.180(2). - P.165-177.
9. Кириченко Т.С. Клініко-епідеміологічна характеристика ВІЛ-інфекції та оцінка ефективності лікування на основі визначення поліморфізму ASP299GLY гену TLR4 : дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.13 «Інфекційні хвороби» / Т.С. Кириченко. - Вінниця, 2014. - 119 с.
10. Said E. A. Association of single-nucleotide polymorphisms in TLR7 (Gln11Leu) and TLR9 (1635A/G) with a higher CD4T cell count during HIV infection. / E. A. Said, F. Al-Yafei, F. Zadjali [et al.] // *Immunology letters*. - 2014. - V.1. - P.58-64.

Реферат

АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ASP299GLY ГЕНА TLR4 И GLN11LEU ГЕНА TLR7 СРЕДИ ВИЧ/ВГС-КОИНФИЦИРОВАННЫХ ПОЛТАВСКОЙ ОБЛАСТИ

Марченко Е.Г., Коваль Т.И.

Ключевые слова: ВИЧ / ВГС-коинфекция, полиморфизм, ген, генотип, аллель.

Целью исследования было выяснение распространенности полиморфизма Asp299Gly гена TLR4 и Gln11Leu гена TLR7 среди ВИЧ/ВГС-коинфицированных Полтавской области.

Для достижения поставленной цели проведено обследование 175 ВИЧ-инфицированных, находящихся под наблюдением в Полтавском областном центре профилактики ВИЧ-инфекции и борьбы со СПИДом и 175 практически здоровых жителей Полтавской области. Результаты проведенных исследований показали, что у больных с ВИЧ/ВГС-коинфекцией полиморфноизмененный генотип Asp299Gly гена TLR4 определялся в 19,3%, аллель 299Gly - в 9,6%, то есть на уровне с ВИЧ-моноинфицированными (11,5% и 5,7% соответственно), что в 5,6-5,8 и 3,4-3,5 раза превышает их частоты в группе популяционного контроля (3,3% и 1,7% соответственно, $p < 0,01$). Риск развития ВИЧ/ВГС-коинфекции при наличии в геноме полиморфизма Asp299Gly гена TLR4 повышается в 6,9 (OR = 6,94, $p = 0,01$), аллели 299Gly - в 6,3 (OR = 6,31, $p = 0,01$) раза. Полиморфноизмененные генотипы Gln11Leu и Leu11Leu гена TLR7 регистрировались у ВИЧ/ВГС-коинфицированных на уровне ВИЧ-моноинфицированных пациентов (26,1% - 27,6%) без статистической разницы с популяционным контролем (25,9%, $p > 0,05$).

Summary

PREVALENCE OF TLR4 Asp299Gly GENE AND TLR7 GLN11LEU GENE POLYMORPHISMS AMONG PATIENTS WITH HIV/HCV - CO-INFECTION IN POLTAVA REGION

Marchenko O.G., Koval T.I.

Key words: HIV/HCV-coinfection, polymorphism, gene, genotype, allele.

The aim of the study was to determine the prevalence of Asp299Gly polymorphism of the TLR4 gene and Gln11Leu polymorphism of TLR7 gene among HIV/HCV-coinfected persons in Poltava region. To achieve this goal, a survey of 175 HIV-infected people supervised in the Poltava HIV Prevention and Control Centre and 175 healthy residents of the Poltava Region was conducted. The results of the research showed that polymorphic genotype Asp299Gly of the TLR4 gene was detected in 19.3% of the patients with HIV/HCV-coinfection, the allele 299Gly was detected in 9.6% of the patients with HIV/HCV-coinfection that corresponds to the level detected in HIV-monoinfected persons (11, 5% and 5, 7%, respectively). This is 5.6-5.8 and 3.4-3.5 times higher than their frequencies in the control group (3.3% and 1.7%, respectively, $p < 0.01$). The risk of HIV/HCV-coinfection development in the case of present Asp299Gly polymorphism of the TLR4 gene in the genome increases in 6.9 times (OR = 6.94, $p = 0.01$), of the allele 299Gly in 6.3 (OR = 6.31, $p = 0.01$) times. Polymorphic genotypes Gln11Leu and Leu11Leu of TLR7 gene were registered in HIV/HCV-coinfected patients at the same level as among HIV-monoinfected patients (26.1% -27.6%) without any statistical difference compared the control (25.9%, $p > 0.05$).