

УДК: 698:616-084

Дубинська Г. М., Прийменко Н. О., Ізюмська О.М., Руденко С.С., Артемьєва О.В.

ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОЛОГІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ СПЕЦИФІЧНОЇ ПРОФІЛАКТИКИ ГРИПУ В ОСІБ ІЗ ПОЛІМОРФІЗМОМ ГЕНІВ TLR-2, TLR-3, TLR-4

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава
Полтавський базовий медичний коледж

Метою дослідження було вивчення ефективності вакцинації проти грипу в осіб із поліморфізмом Arg753Gln гену TLR-2, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4. Провакциновано 66 осіб із мутантними генотипами та нормальним розподілом алелей TLR-2, TLR-3, TLR-4, віком від 18 до 63 років. Встановлено зростання відсотку осіб із протективним титром до всіх штамів грипу як серед вакцинованих із мутантними генотипами, так і з нормальним розподілом алелей TLR-2, TLR-3, TLR-4 незалежно від початкового рівня протигрипозних антитіл. Рівень сероконверсії в осіб із поліморфнозмними генотипами TLR-2, TLR-3, TLR-4 відповідав показникам вакцинованих із нормальним розподілом алелей TLR, а до штаму A/H1N1 був вірогідно вищим. Проведений аналіз антитілоутворення показав, що особи з мутантними генотипами TLR-2, TLR-3, TLR-4 мають вакцинальну відповідь на рівні обстежених із нормальним розподілом алелей TLR, що дозволяє розглядати вакцинацію проти грипу як ефективний метод профілактики ГРВІ у носіїв мутацій в генах досліджуваних TLR.

Ключові слова: вакцинація, грип, поліморфізм, генотип, титр, антитіла.

В останні роки багато уваги приділяється специфічній профілактиці грипу, особливо в групах ризику, схильних до тяжкого перебігу захворювання. Інтенсивність та характер імунної відповіді при вакцинації залежить від функціонального стану імунної системи [1]. Відомо, що генетична варіабельність TLR може відігравати важливу роль в розпізнаванні патоген-асоційованих молекулярних структур і змінювати імунну відповідь як на інфекційні агенти, так і вакцинацію [2, 3]. На сьогодні встановлено, що в розпізнаванні структурних білків вірусу грипу залучені TLR-2 і TLR-4, вірусної РНК □ TLR-3 [4, 5, 6, 7], а також виявлено асоціацію поліморфізмів Arg753Gln гену TLR-2, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4 із розвитком грипу та грип-асоційованої пневмонії [8]. Тому вивчення імунної відповіді на вакцинацію проти грипу в осіб із генетичним поліморфізмом Arg753Gln гену TLR-2, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4 є актуальним завданням.

Мета дослідження

Вивчити ефективність вакцинації проти грипу в осіб із поліморфізмом Arg753Gln гену TLR-2, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4.

Матеріали та методи

Для досягнення поставленої мети було провакциновано 66 осіб віком від 18 до 63 років (середній □ 31,2±1,48), жінок □ 48 (72,7%), чоловіків □ 18 (27,3%). За генотипом вакциновані були розподілені наступним чином: із Leu/Phe TLR-3 □ 23, Phe/Phe TLR-3, Asp/Gly TLR-4 та комбінацією мутантних генотипів досліджуваних TLR □ по 6, Arg/Gln TLR-2 □ 5 осіб. Отримані результати порівнювали з даними 20 здорових із нормальним розподілом алелей генів TLR-2, TLR-3, TLR-4 рівноцінними за статтю і віком. Всі обстежені вакцинувалися проти грипу вперше.

Вакцинацію проводили за стандартною методикою вакциною Інфлювак (Solvay Pharmaceuticals, Нідерланди) після підписання інформованої згоди та огляду лікаря.

Імунну відповідь на вакцинацію оцінювали в реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) на основі дослідження парних сироваток крові, зібраних до імунізації та через 28 днів після введення вакцини. Постановку РГГА проводили за стандартною методикою з використанням діагностикумів «Диагностикумы гриппозные для реакции торможения гемагглютинации сухие» ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов» (Россия).

Імунологічну ефективність вакцинації оцінювали по сероконверсії (число приростів специфічних титрів антитіл в 4 рази і більше), серопротекції (відсоток осіб із титрами 1:40 і вище після вакцинації) та динаміці рівня середніх геометричних титрів антитіл. При аналізі враховували початковий рівень протигрипозних антитіл.

Поліморфну ділянку Arg753Gln гену TLR-2, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4 генотипували методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням олігонуклеотидних праймерів. Ампліфікація проведена на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технологія», Росія).

Математичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми «STATISTICA for Windows7.0» (StatSoft Inc, США) та електронних таблиць MS Excel. Вірогідність відмінностей результатів досліджень для груп обстежених визначали за допомогою t-критерію Стьюдента. При порівнянні частот бінарних ознак в двох пов'язаних групах використовували критерій Мак-Немара, в інших випадках – точний критерій Фішера. Для всіх видів аналізу статистично значимими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Проведені дослідження показали, що стан імунітету до вакцинації в усіх групах обстежених характеризувався високим рівнем серопротекції з найвищим показником захищеності в осіб із мутантним гомозиготним генотипом Phe/Phe TLR-3, гетерозиготним Asp/Gly TLR-4 та комбі-

нацією мутацій в генах TLR-2, TLR-3, TLR-4 – 83,3%-100,0% до всіх вакцинних штамів. До вакцинації серонегативними виявилися особи з нормальним розподілом алелей досліджуваних TLR (A/H1N1 та A/H3N2 – по 10,0%, B – 5,0%) та гетерозиготним генотипом Leu/Phe TLR-3 (A/H1N1 – 17,4%, B – 4,3%).

При дослідженні імунологічної ефективності вакцинації встановлено, що через 28 днів після імунізації відмічалось наростання відсотка осіб із захисним титром антитіл в усіх групах вакцинованих, незалежно від початкового рівня протигрипозних антитіл. Так після вакцинації відсоток осіб із захисними титрами антитіл серед тих, що мали довакцинальний рівень $\leq 1:20$ склав: із нормальним розподілом алелей TLR до серотипу A/H1N1 $\square 80,0\%$, A/H3N2 $\square 50,0\%$, із генотипом Leu/Phe TLR-3 до A/H1N1 $\square 100,0\%$, A/H3N2 – 75,0%, B – 33,3%. Слід відмітити, що серед обстежених із мутантними генотипами Phe/Phe TLR-3, Asp/Gly TLR-4, Arg/Gln TLR-2 та комбінаціями мутацій в генах TLR-2, TLR-3, TLR-4 особи із початковим титром $\leq 1:20$ визначалися лише до окремих штамів вірусу грипу, при цьому вони стовідсотково мали протективний рівень специфічних антитіл після вакцинації. За рівнем серопротекції особи із мутантними генотипами та нормальним розподілом алелей TLR-2, TLR-3, TLR-4 з низьким початковим титром антитіл ($\leq 1:20$) достовірно не різнилися.

При дослідженні рівня серопротекції в групах обстежених загалом (незалежно від початкового рівня протигрипозних антитіл) до та через 28 днів після вакцинації встановлено зростання відсотку осіб із протективним титром до всіх штамів грипу як серед вакцинованих із мутантними генотипами, так і з нормальним розподілом алелей TLR-2, TLR-3, TLR-4. При цьому достовірно вищий рівень серопротекції виявився до серотипу A/H1N1 в осіб із нормальним розподілом алелей TLR ($95,0 \pm 4,9$, до вакцинації – $75,0 \pm 9,7$, $p < 0,05$) та генотипом Leu/Phe TLR-3 ($100,0 \pm 2,1$, до вакцинації – $69,6 \pm 9,6$, $p < 0,005$), з тенденцією до вірогідності до серотипу A/H3N2 в осіб з Leu/Phe TLR-3 ($95,6 \pm 4,3$, до вакцинації – $82,6 \pm 7,9$, $p < 0,1$) і A/H1N1 – з генотипом Arg/Gln TLR-2 ($100,0 \pm 4,5$, до вакцинації – $60,0 \pm 21,9$, $p < 0,1$).

Аналіз рівня сероконверсії показав, що вакцинальна відповідь в осіб із поліморфнозмінними генотипами TLR-2, TLR-3, TLR-4 не залежала від початкового рівня специфічних антитіл та визначалася на рівні вакцинованих із нормальним розподілом алелей TLR, а до штаму A/H1N1 виявилася навіть вірогідно вищою. Так за рівнем сероконверсії вакциновані із мутантними генотипами TLR-2, TLR-3, TLR-4 та нормальним розподілом алелей TLR із початковим титром специфічних антитіл $\leq 1:20$ між собою достовірно не різнилися.

Таблиця 1.
Рівень сероконверсії в осіб із мутантними генотипами та нормальним розподілом алелей TLR-2, TLR-3, TLR-4 з титром антитіл до вакцинації $\leq 1:20$ та $\geq 1:40$, абс. число (%)

Генотипи TLR	Серотипи вірусу грипу	Кількість осіб із титром $\leq 1:20$ до вакцинації		Кількість осіб із сероконверсією		Кількість осіб із титром $\geq 1:40$ до вакцинації		Кількість осіб із сероконверсією	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Нормальний розподіл алелей TLR (n=20)	A/H1N1	5	25,0	2	40,0	15	75,0	3	20,0
	A/H3N2	4	20,0	2	50,0	16	80,0	3	18,7
	B	2	10,0	0	0,0	18	90,0	7	38,9
Leu/Phe TLR-3 (n=23)	A/H1N1	7	30,4	7	100,0*	16	69,6	8	50,0
	A/H3N2	4	17,4	1	25,0	19	82,6	7	36,8
	B	6	26,1	0	0,0	17	73,9	3	17,6
Phe/Phe TLR-3 (n=6)	A/H1N1	0	0,0	0	0,0	6	100,0	4	66,7
	A/H3N2	0	0,0	0	0,0	6	100,0	2	33,3
	B	1	16,7	1	100,0	5	83,3	0	0,0
Asp/Gly TLR-4 (n=6)	A/H1N1	1	16,7	1	100,0	5	83,3	1	20,0
	A/H3N2	1	16,7	1	100,0	5	83,3	1	20,0
	B	1	16,7	1	100,0	5	83,3	0	0,0
Arg/Gln TLR-2 (n=5)	A/H1N1	2	40,0	2	100,0	3	60,0	2	66,7
	A/H3N2	0	0,0	0	0,0	5	100,0	2	40,0
	B	1	20,0	1	100,0	4	80,0	2	50,0
Комбінації мутантних генотипів TLR (n=6)	A/H1N1	1	16,7	1	100,0	5	83,3	2	40,0
	A/H3N2	0	0,0	0	0,0	6	100,0	0	0,0
	B	0	0,0	0	0,0	6	100,0	1	16,7

Примітка: * – $p < 0,05$, у порівнянні з показниками осіб із нормальним розподілом алелей TLR-2, TLR-3, TLR-4

Виключення склали особи із генотипом Leu/Phe TLR-3, в яких показник 4-х кратного приросту антитіл до серотипу A/H1N1 склав 100,0% проти 40,0% ($p=0,04$) у вакцинованих із нормальним розподілом алелей TLR. Встановлено відсутність імунної відповіді до штаму гри-

пу B в осіб із генотипом Leu/Phe TLR-3, проте аналогічний результат отриманий і в обстежених із нормальним розподілом алелей TLR. У вакцинованих із мутантними генотипами Phe/Phe TLR-3, Asp/Gly TLR-4, Arg/Gln TLR-2 та їхньою комбінацією, які мали початковий титр $\leq 1:20$ до

окремих штамів грипу стовідсотково отримана сероконверсія (табл.1.).

Дослідженням рівнів сероконверсії в осіб із початковим титром протигрипозних антитіл $\geq 1:40$ достовірної різниці у вакцинальній відповіді між обстеженими із мутантними генотипами досліджуваних TLR та нормальним розподілом алелей не виявлено (табл.1.). Слід відмітити відсутність 4-х кратного зростання титрів специфічних антитіл до серотипу В в осіб із генотипами Phe/Phe TLR-3, Asp/Gly TLR-4 та до A/H3N2 у вакцинованих із комбінаціями мутантних генотипів TLR-2, TLR-3, TLR-4, при цьому всі вони мали високі початкові титри протигрипозних антитіл. Медіана титрів специфічних антитіл до вакцинації склала в осіб із генотипом Phe/Phe TLR-3 – 240 [80; 320], Asp/Gly TLR-4 – 80 [40; 160] та комбінаціями мутантних генотипів TLR-2, TLR-3, TLR-4 – 160 [80; 160], а зростання рівня специфічних антитіл відмічалось в 2 рази, порівняно з початковим.

Аналіз рівня сероконверсії в загальній групі вакцинованих виявив відмінності у вакцинальній відповіді до серотипу A/H1N1 в осіб із поліморфнозміненими генотипами TLR-2 та TLR-3, порівняно з вакцинованими із нормальним розподілом алелей TLR-2, TLR-3, TLR-4. Так число 4-х кратних сероконверсій було достовірно вищим в осіб із генотипом Leu/Phe TLR-3 ($65,2\% \pm 9,7$, $p < 0,05$), Arg/Gln TLR-2 ($80,0\% \pm 17,9$, $p < 0,05$) та з тенденцією до вірогідності з Phe/Phe TLR-3 ($66,7\% \pm 19,2$, $p < 0,1$) порівняно з вакцинованими із нормальним розподілом алелей TLR ($25,0\% \pm 9,7$). Рівень сероконверсії до серотипів A/H3N2 та В в осіб із поліморфнозміненими генотипами та нормальним розподілом алелей TLR-2, TLR-3, TLR-4 достовірно не різнився.

Дослідження динаміки середньгеометричних титрів антитіл показало, що на 28 день вакцинального процесу відбулося зростання титрів в усіх групах вакцинованих. При порівняльному аналізі середньгеометричних титрів після вакцинації в осіб із мутантними генотипами TLR-2, TLR-3, TLR-4 та нормальним розподілом алелей TLR встановлено, що вакциновані із поліморфнозміненими генотипами TLR мали достовірно вищі показники до окремих вакцинних штамів. Так середньгеометричні титри до штаму A/H1N1 ви-

явилися вищими в осіб із генотипом Leu/Phe TLR-3 в 2,4 ($126,9$, $p < 0,005$), Phe/Phe TLR-3 – в 4,2 ($226,3$, $p < 0,001$), Arg/Gln TLR-2 – в 3 ($160,0$, $p < 0,02$), комбінаціями мутацій в генах TLR-2, TLR-3, TLR-4 – в 3,3 рази ($179,6$, $p < 0,01$), порівняно з вакцинованими із нормальним розподілом алелей TLR ($54,0$). До штаму A/H3N2 відповідний показник був достовірно вищим у вакцинованих із генотипом Arg/Gln TLR-2 ($320,0$ при нормальному розподілі алелей TLR – $100,8$, $p < 0,0005$).

Таким чином, проведений аналіз антитілоутворення показав, що особи з мутантними генотипами TLR-2, TLR-3, TLR-4 мають вакцинальну відповідь на введення протигрипозної вакцини на рівні обстежених із нормальним розподілом алелей TLR, про що свідчить досягнутий рівень серопротекції, сероконверсії та динаміка середньгеометричних титрів антитіл на 28 день імунізації.

Проведені дослідження дозволяють розглядати вакцинацію проти грипу як ефективний метод профілактики ГРВІ в осіб із поліморфнозміненими генотипами TLR-2, TLR-3, TLR-4 та рекомендувати його застосування в широкій клінічній практиці.

Література

1. Лютов Н.Г. Оценка эффективности вакцинации против гриппа / Н.Г. Лютов // Русский медицинский журнал. – 2000. – Т. 8, № 13-14. – С. 557-558.
2. Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления / А.С. Симбирцев, А.Ю. Громова // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 3-10.
3. Netea, M.G. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility / M.G. Netea, C. Wijmenga, L.A.J. O'Neill // Nature immunology. – 2012. – Vol. 13, № 6. – P. 535-542.
4. Друцкая М.С. Врожденное распознавание вирусов / М.С. Друцкая, П.В. Белоусов, С.А. Недоспасов // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45, № 1. – С. 7-19.
5. Barton G.M. Viral recognition by Toll-like receptors / G.M. Barton // Semin Immunol. – 2007. – Vol. 19 (1). – P. 33-40.
6. Xagorari A. Toll-Like Receptors and Viruses: Induction of Innate Antiviral Immune Responses / A. Xagorari, K. Chlichia // Microbiol J. – 2008. Vol. 2. – P. 49-59.
7. Kawai T. Innate immune recognition of viral infection / T. Kawai, S. Akira // Nat. Immunol. – 2009. – Vol. 7. – P. 131-137.
8. Дубинская Г.М. Роль полиморфизма генов TLR-2, TLR-3, TLR-4 при гриппе / Г.М. Дубинская, Н.О. Прийменко, И.П. Кайдашев [и др.] // Georgian Medical News. – 2014. – № 7-8 (232-233). – С. 51-55.

Реферат

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ГРИППА У ЛИЦ С ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНОВ TLR-2, TLR-3, TLR-4

Дубинская Г. М., Прийменко Н. О., Изюмская Е.М., Руденко С.С., Артемьева Е. В.

Ключевые слова: вакцинация, грипп, полиморфизм, генотип, титр, антитела.

Целью исследования было изучение эффективности вакцинации против гриппа у лиц с полиморфизмом Arg753Gln гена TLR-2, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4. Провакцинировано 66 человек с мутантными генотипами и нормальным распределением аллелей TLR-2, TLR-3, TLR-4, в возрасте от 18 до 63 лет. Установлен рост процента лиц с протективным титром ко всем штаммам гриппа как среди вакцинированных с мутантными генотипами, так и с нормальным распределением аллелей TLR-2, TLR-3, TLR-4 независимо от начального уровня протигрипозных антител. Уровень сероконверсии у лиц с полиморфноизмененными генотипами TLR-2, TLR-3, TLR-4 соответствовал показателям вакцинированных с нормальным распределением аллелей TLR, а к штамму A/H1N1 был достоверно выше.

Проведений аналіз антителообразования показав, що лица с мутантними генотипами TLR-2, TLR-3, TLR-4 мають вакцинальний відповідь на рівні обстежених с нормальним розподілом алелів TLR, що дозволяє розглядати вакцинацію проти грипу як ефективний метод профілактики ОРВИ у носіїв мутацій в генах досліджуваних TLR.

Summary

ASSESSMENT OF IMMUNOLOGICAL EFFICACY OF SPECIFIC PREVENTION INFLUENZA IN PERSONS WITH POLYMORPHISM OF TLR-2, TLR-3, TLR-4 GENES

Dubinskaya G. M., Priyenko N. O., Izyumskaya Ye. M., Rudenko S.S., Artemyeva Ye.V.

Key words: vaccination, influenza, polymorphism, genotype, titer antibodies.

The aim of this study was to examine the effectiveness of influenza vaccination in individuals with polymorphisms Arg753Gln TLR-2 gene, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4. 66 persons were vaccinated with mutant genotypes and normal distribution of alleles TLR-2, TLR-3, TLR-4, aged 18 to 63 years. A percentage growth of persons with protective titers to all influenza strains was registered among vaccinated persons with mutant genotypes as well as in the individuals with normal distribution of alleles TLR-2, TLR-3, TLR-4, regardless of the initial level of anti-influenza antibodies. The level of seroconversion in the patients with polymorphically altered genotypes of TLR-2, TLR-3, TLR-4 correspond to the indices in the vaccinated persons with normal distribution of alleles TLR, while to a strain of / A H1N1 was significantly higher. The analysis of antibody has shown that individuals with mutant genotypes of TLR-2, TLR-3, TLR-4 have the vaccination response in individuals with normal distribution of alleles TLR, that suggests to consider influenza vaccination as an effective method of SARS prevention in carriers of mutations in the genes studied TLR.

УДК:616.36-002-036.2(477.53)

Дубинська Г. М., Сизова Л.М., Коваль Т.І., Байбарза А.А., Марченко О.Г.

ДЕЯКІ АСПЕКТИ ЕПІДЕМІОЛОГІЧНОЇ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ С У ПОЛТАВСЬКІЙ ОБЛАСТІ НА СУЧАСНОМУ ЕТАПІ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Метою дослідження було з'ясування деяких аспектів епідемічного процесу ХГС в Полтавській області на сучасному етапі. Проведено ретроспективний епідеміологічний аналіз даних офіційної статистичної звітної документації, затвердженої МОЗ України, звітних матеріалів Полтавської обласної санітарно-епідеміологічної станції за 2009-2013 рр. та дані первинної облікової документації 172 хворих на ХГС, які знаходились на лікуванні в Полтавській обласній клінічній інфекційній лікарні (ПОКІЛ) протягом 2013-2014 рр. Під час проведеного аналізу встановлено, що протягом 2009-2013 рр. в Полтавській області відмічалось постійне зростання показника захворюваності на ХГС з переважанням серед інфікованих дорослого населення, яке проживає у містах. Серед хворих на ХГС переважали особи старшого віку (30-50 років і старше - 87,7%), за статтю – чоловіки (62,3%), за генотипом ВГС - особи з 1 генотипом (62,2%).

Ключові слова: хронічний гепатит С, динаміка показників захворюваності, гендерна та вікова структура.

Хронічний гепатит С (ХГС) є одним з найбільш поширених інфекційних захворювань людини [3]. За останні 10 років захворюваність в Україні зросла щонайменше в 8 разів [1, 2]. Показник поширеності даної інфекції серед дорослого населення в Україні є одним з найбільш високих у Європейському регіоні і становить 3-5% [2]. Між тим, фактичний матеріал щодо захворюваності на ХГС у різних регіонах України знаходиться у стадії накопичення, оскільки його офіційна реєстрація, як самостійної нозологічної одиниці, розпочалася лише у 2010 році. В зв'язку з цим представляє інтерес вивчення та аналіз епідемічного процесу ХГС в Полтавській області.

Мета дослідження

Охарактеризувати деякі аспекти епідемічного процесу ХГС у Полтавській області на сучасному етапі.

Матеріали і методи дослідження

Для досягнення поставленої мети проведений ретроспективний епідеміологічний аналіз даних офіційної статистичної звітної документації, затвердженої МОЗ України, звітних матеріалів Полтавської обласної санітарно-епідеміологічної станції за 2009-2013 рр. та дані первинної облікової документації 172 хворих на ХГС, які знаходились на лікуванні в Полтавській обласній клінічній інфекційній лікарні (ПОКІЛ) протягом 2013-2014 рр. Проаналізована наступна медична документація:

1. Форма № 1 – «Звіт про окремі інфекційні і паразитарні захворювання»;
2. Форма № 2 – «Звіт про окремі інфекційні і паразитарні захворювання» (щорічна);
3. Форма № 12 – «Звіт про захворювання, зареєстровані у хворих, які проживають у районі обслуговування ЛПЗ Полтавської області»;
4. Форма № 40-здоров – «Звіт про роботу са-