

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS STUDIJU PROGRAMMA

**HIV PACIENTU MOLEKULĀRI ĢENĒTISKIE
RISKA FAKTORI INFEKCIJAS ATTĪSTĪBAS LAIKĀ:
TNF ALFA GĒNU POLIMORFISMU KOMBINĀCIJA AR
GALVENO AUDU SADERĪBAS KOMPLEKSU**

MAGISTRA DARBS

Autors: **Jekaterīna Aksejeva**

Studenta apliecības Nr.: jb07030

Darba vadītājs: Dr. med. Jeļena Eglīte

RĪGA 2014

ANOTĀCIJA

Maģistra darba pētījuma mērķis ir identificēt HIV pacientu molekulāri ģenētiskos riska faktorus infekcijas attīstības laikā, pamatojoties uz citokīna TNF α gēnu polimorfismu kombinācijā ar galveno audu saderības kompleksu.

Darbā izmantoja reālā-laika PĶR metode un restrikcijas fragmentu garuma polimorfisms (RFLP, angl. *restriction fragment length polymorphism*) riska gēnu/alēļu noteikšanai.

Šajā pētījuma analizētas iespējamās korelācijas starp TNF α polimorfajām alēlēm un slimības progresiju. Par vienu no statistiski ticamajiem rezultātiem var uzskatīt TNF α alēlēs - 238A spēja aizkavēt HIV infekcijas progresēšanu.

Atslēgas vārdi: TNF α , HIV, HLA, PĶR, RFLP

ANNOTATION

The aim of the Master's paper is to identify molecular and genetic risk factors of HIV patients during the progression of infection, based on TNF α cytokine gene polymorphism combined with the major histocompatibility complex.

Real-time PCR technique and restriction fragment length polymorphism (RFLP) was used in this paper to determine risk genes / alleles.

Possible correlation between TNF α polymorphic alleles and progression of the disease has been analysed in this study. The ability of TNF α -238A allele to delay the progression of HIV infection can be considered as one of the statistically significant results.

Key words: TNF α , HIV, HLA, PCR, RFLP

SATURA RĀDĪTĀJS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS.....	5
IEVADS	6
DARBA MĒRĶIS	7
UZDEVUMI.....	7
IZMANTOTĀS PĒTNIECĪBAS METODES.....	8
DARBA STRUKTŪRA	8
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	9
1.1. HIV/AIDS	9
1.2. HLA SISTĒMA.....	10
1.3. AUDZĒJA NEKROZES FAKTORS ALFA (TNFA, TUMOR NECROSIS FACTOR).....	11
1.4. TNFA GĒNA FUNKCIONĀLAIS POLIMORFISMS	12
2. MATERIĀLI UN METODES	14
3. REZULTĀTI.....	18
4. DISKUSIJA.....	23
5. SECINĀJUMI.....	25
PATEICĪBAS	26
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	27
PIELIKUMS.....	32

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

AIDS	-	iegūts imūndeficīta sindroms (angl. <i>acquired immune deficiency syndrome</i>)
CD4+	-	T līdzētājšūnas
CD8+	-	T citotoksiskās šūnas
DNS	-	dezoksiribonukleīnskābe
HBV	-	vīrushepatīts B (angl. <i>hepatitis B virus</i>)
HCV	-	vīrushepatīts C (angl. <i>hepatitis C virus</i>)
HIV	-	cilvēka imūndeficīta vīruss (angl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HLA	-	cilvēka leikocītu antigēns (angl. <i>human leukocyte antigen</i>)
HSV	-	parastais herpes vīruss (angl. <i>herpes simplex virus</i>)
IL	-	interleikīns
LIC	-	Latvijas Infektoloģijas centrs
MHC	-	galvenais audu saderības komplekss (angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
mRNS	-	matricas Ribonukleīnskābe
NK	-	dabiskās galētājšūnas (angl. <i>natural killer</i>)
OR	-	izredžu attiecība (angl. <i>odds ratio</i>)
p	-	varbūtība, būtiskuma līmenis, p vērtība (angl. <i>value</i>)
PĶR	-	polimerāzes ķēdes reakcija
PVO	-	Pasaules veselības organizācija
RFLP	-	restrikcijas fragmentu garuma polimorfisms (angl. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RNS	-	ribonukleīnskābe
SNP	-	viena nukleotīda polimorfisms (angl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
TBC	-	tuberkuloze (angl. <i>tuberculosis</i>)
Th1/2	-	T līdzētājšūnas (T helperi)
TNF a	-	audzēja nekrozes faktors (angl. <i>tumor necrosis factor</i>)

IEVADS

Mūsdienu koncepcija un tehnoloģija medicīnas nozarē ir tendēta uz jauniem ģenētisko, tai skaitā imunoģenētisko, marķieru atklājumiem, kuri būtu saistīti ar dažādām saslimšanām, tai skaitā arī infekcijām [1,2,3].

Kā izrādījās gēnu polimorfisms, kas savā veidā kontrolē organisma aizsargreakciju, nosaka dažāda „rakstura” iekaisuma atbildes gaitu un, patogēnam iekļūstot organismā, tā specifiskās imunoloģiskās reakcijas. Pie tiem var pieskaitīt tradicionāli nosakāmu HLA gēnu polimorfismu, kā arī pēdējos gados īpaši populāru ne-HLA-gēna imūno nozīmi. Veidojoties normālai imūnai atbildei pret patogēnu, ir ļoti svarīgi starpgēnu un intragēna (angl. *intragenetic*) mijiedarbība. Savukārt to nestabilitāte var izraisīt nelabvēlīgas saslimšanas sekas. Pirmām kārtām tas attiecas uz regulējošām gēnu molēkulām, kuras nodrošina iekaisuma reakcijas sākotnējos posmus: patogēna atpazīšana, iekššūnas aktivizācijas signāla nodrošināšana un iekaisuma mediatoru sintēzi, kuru sastāvā ietilpst arī citokīni [4,5,6,7].

Viena no visaktuālākām medicīnas problēmām ir infekcijas saslimšanas, no kurām „līderpozīcijas”, skatoties pēc straujās izplatības un mirstības līmeņa palielināšanās, ieņem HIV, tuberkuloze (TBC, angl. *tuberculosis*), vīruss hepatīts B, C (HBV, HCV) [8,9]. HIV, TBC un HBV, HCV, kā arī jebkura cita infekcijas saslimšanām, ir raksturīgs izjaukts citokīnu un to funkciju normālais balanss. [10,11] Šo infekciju patoģenēzē ir citokīnu disbalanss, kurus producē Th1 un Th2 limfocīti un makrofāģi, kas ir galvenais, kas ietekmē to, cik spēcīga būs imūnās sistēmas atbildes reakcija uz specifisko patogēnu. Infekcijas sākuma stadijā notiek pirmsiekaisuma citokīna līmeņa palielināšanās, kas darbojas kā kofaktors patogēna aktivācijā. Citokīni ir iesaistīti praktiski visos mikroorganismu-šūna mijiedarbības etapos, infekcijas izplatīšanās mikroorganismos, iekaisuma atbildes attīstībā, imūndeficīta izveidē un tā attīstības rezultātā. Citokīnu disbalanss ir saistīts ar T-limfocītu destrūkciju, kas savukārt izraisa imūnsupresijas progresēšanos un tās turpmākās attīstības sekas. Citokīnu darbības efektivitāte ir atkarīga arī no kopējās un specifiskās transkripcijas gēnu aktivācijas, neskatoties uz to, ka tie atrodas uz dažādām hromosomām [12,13,14]. Prognozējot infekcijas saslimšanas attīstību, viens no imunoģenētiskiem parametriem ir HLA fenotipa izpēte saslimušajam pacientam. Publicētie dati liecina, ka HLA antigēna D lokuss piedalās visaktīvāk tuberkulozes potēģenēzes attīstībā. Šie antigēni nosaka adaptīvās imunitātes tendenci un intensitāti infekcijas gadījumā. Visvairāk izteiktākas asociācijas ir saistītas tieši ar DRB1 gēna alēli, kas ir saistīta ar HLA II klasi [11,10,12]. Pateicoties starptautiskās programmas „Cilvēka genoms” sasniegumiem, mūsdienās ir

zināms, ka individuālas aizsargreakcijas attīstības īpatnības, kā arī predispozīcija uz dažādām slimībām, tai skaitā infekcijas, ir saistītas ne tikai HLA gēnu polimorfismu, bet arī ar viena nukleotīda polimorfismu (SNP, angl. *single-nucleotide polymorphism*), kas spēlē ne mazāk svarīgu lomu imūnās atbildes realizācijā un regulēšanā. [5,7,15].

Vairāki nesenie pētījumi parāda ģenētiski determinēto citokīnu hiper- un hipoprodukciju saistību ar imūnās atbildes kvalitāti, kas arī tiek asociēts ar infekcijas saslimšanas smaguma pakāpi, turpmāko attīstību un tā sekām [4-15]. No tā izriet, ka perspektīvi ir noskaidrot HLA DRB1 un citu II klases alēļu regulējošo lomu uz citokīnu darbības atbildi pie dažādām patoloģijām.

Šādi pētījumi paplašinātu zināšanas par analizējamo citokīnu gēnu polimorfismu un to saistību ar audu saderības kompleksa gēniem (MHC, angl. *major histocompatibility complex*). Krietni palielinātu informāciju par ģenētiskajiem marķieriem patoloģijas gadījumos. Tas ir svarīgs priekšnoteikums, lai attīstītu mūsdienīgu personalizētu medicīnu, kas ļautu prognozēt individuālu cilvēka predispozīciju pret slimības attīstību, to attīstības gaitu un sekām, kā arī savlaicīgi un efektīvi veikt šo slimību profilaksi un nepieciešamības gadījumā uzsākt veiksmīgu ārstēšanu.

Darba mērķis

Identificēt HIV pacientu molekulāri ģenētiskos riska faktorus infekcijas attīstības laikā, pamatojoties uz citokīna TNF α gēnu polimorfismu kombinācijā ar galveno audu saderības kompleksu (HLA II klases DRB1/DQA1/DQB1 gēniem), kā arī izanalizēt to iespējamo asociāciju ar slimības norises gaitu.

Uzdevumi

1. MHC/HLA-III TNF α gēnu identifikācija pacientiem ar HIV/AIDS un veseliem cilvēkiem, izmantojot Reālā-laika PĶR SSP metodi.
2. TNF α genotipu noteikšana.
3. Veikt iegūto datu salīdzinošo analīzi pacientiem ar MHC/HLA II klases riska gēniem (DQA1, DQB, DRB1), izmantojot iepriekšējo pētījumu datu bāzi.
4. Noteikt sastopamības biežumu TNF α gēna promoteru G-238A un G-308A polimorfos variantus HIV inficētiem pacientiem.

5. Novērtēt TNF α (-308)A/G, 238A/G gēnu polimorfisma ietekmi uz infekcijas procesa attīstību.
6. Veikt TNF α gēna SNP polimorfisma salīdzināšanas analīzi ar audu saderības kompleksa gēniem (HLA II klases DRB1/DQA1/DQB1), nosakot infekcijas procesa attīstības risku HIV pacientiem.
7. Pacientiem ar paplašinātu rīkas haplotipu (TNF α , DQA1, DQB1, DRB1) veikt nukleotīdu sekvenēšanu.
8. Darba gaitā izpētīt ar HIV/AIDS asociēto TNF α gēnu/alēļu genotipu un haplotipu izredžu attiecību (OR).

Izmantotās pētniecības metodes

Reālā-laika PĶR metode un restrikcijas fragmentu garuma polimorfisms (RFLP, angl. *restriction fragment length polymorphism*) riska gēnu/alēļu noteikšanai.

Darba struktūra

Darbs uzrakstīts latviešu valodā. Tam ir 5 daļas: literatūras apraksts, pētījuma materiāli un metodes, pētījuma rezultāti, pētījuma rezultātu apspriešana, secinājumi. Darbā ir 3 tabulas un 1 attēlu.

Darbā tika izmantotas atsauces no 53 literatūras avotiem. Par literatūras avotiem tika izmantotas dažādas ārzemju publikācijas, grāmatas, interneta resursi.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. HIV/AIDS

HIV no angļu valodas nozīmē *Human immunodeficiency virus* jeb latviski cilvēka imūndeficīta vīruss ir lēna, hroniski progresējoša slimība. [17] Tas pieder pie retrovīrusiem un savu ģenētisko informāciju glabā RNS formā [18]. Tāpat kā jebkurš cits retrovīruss satur apgriezto transkriptāzi, kas spēj virzīt vīrusa RNS uz DNS un iekļaut to saimnieka šūnu genomā. [19] HIV mērķšūnas ir CD4+ T limfocīti, kas ir ļoti svarīga imūnsistēmas daļa. Taču HIV ietekme arī citas molekulas, kuras piedalās imūnsistēmas realizēšanā (CD8+, makrofāgi, monocīti, dendrītiskās šūnas u.c.) [20].

Slimība līdz pat šai dienai nav ārstējama un tās sekas ir letālās. Taču var paiet vairāki gadi līdz HIV infekcija pārtop par AIDS. Arī mūsdienu panākumi farmakoloģijas jomā paildzina dzīvildzi un uzlabo HIV pacientu dzīves kvalitāti. Iegūtais imūndeficīta sindroms jeb AIDS (angl. *acquired immunodeficiency syndrome*) ir HIV infekcijas pēdējā stadija, kad organisma imūnā aizsargspēja ir pilnībā nomākta un tas nespēj pretoties dažādām blakusslimībām, infekcijām un audzējiem (oportūniskās slimības) [21].

HIV/AIDS gadījumi Latvijā tiek reģistrēti kopš 1987. gada un līdz 2014. gada 1. aprīlim pēc Slimību profilakses un kontroles centra datiem uzskaitē ir reģistrēti 5947 inficēšanās gadījumi, AIDS - 1381 2014. Gadā ir reģistrēti 80 jauni inficēšanās gadījumi ar HIV, savukārt AIDS ir diagnosticēts 29 personām [22]. Ja skatās pasaules mērogā tad šobrīd pēc PVO datiem uz 2012. gadu kopumā bija reģistrēti 35,3 miljoni HIV inficēšanās gadījumi, no tiem 32,1 miljons bija pieaugušo un 3,3 miljons bērnu, kuri ir jaunāki par 15 gadiem. Jauni inficēšanās gadījumi 2012. gadā – 2,3 miljoni, no tiem 260 000 bija bērni. No AIDS 2012. gadā miruši 1,6 miljoni cilvēku [23].

Ņemot vērā šīs slimības globālos apmērus un destruktīvo ietekmi uz cilvēka organismu, ir svarīgi laicīgi apzināties tā preventīvas darbības un rast jaunus risinājumus tās ārstēšanā.

1.2. HLA sistēma

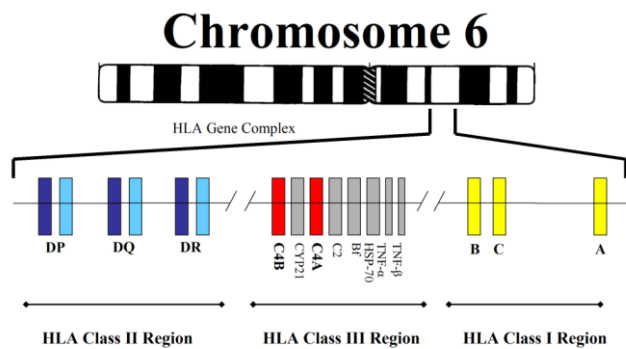
Cilvēka leikocītu antigēna (HLA) sistēma ir gēnu grupa, kas atrodas uz sestās hromosomas īsā pleca un ir atbildīga par imūnās sistēmas regulēšanu organismā, precīzāk – antigēna atpazīšana un prezentēšana tālāk imūnās sistēmas molekulām. Tas ir vispolimorfākais reģions cilvēka genomā. Šī sistēma ietver imūnās atbildes gēnus, ietekmē organisma aizsargspējas un nosaka lielāko daļu ģenētisko predispozīciju dažādu slimību gadījumos, kas ir saistītas ar imūnsistēmu [27]. Polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) [32] atklājums un uz tās pamata izstrādātās jaunās HLA genotipēšanas metodes veicinājušas cilvēka audu saderības kompleksa HLA sistēmas polimorfisma izpētes progresu) [28,29,30,31].

HLA molekulas tiek sadalītas 3 klasēs – HLA I (-A, -B, -C.), HLA II (-DR, -DQ) un HLA III klase.

HLA I klases molekulas ir ekspresētas uz visām kodolainajām šūnām un ir atbildīgas par to, lai veiktu antigēna prezentāciju citotoksiskām T šūnām, kura uzdevums ir iznīcināt mērķšūnu. [29]

HLA II klases molekulas parasti ir ekspresētas uz B limfocītu virsmas, kur tie prezentē antigēnu T-hepleru šūnām, tādējādi stimulējot B limfocītiem ražot antivielas pret šo antigēnu. [30]Tā arī tie ir sastopami uz dendrītiskajām šūnām un makrofāgiem [31].

HLA III klase satur vairāk nekā 75 gēnus [32], kas kodē proteīnus, kas nav saistīti ar šūnas imunitātes nodrošināšanu, bet tomēr tie regulē imūnsistēmas atbildi. HLA II klases reģions atrodas starp I un II klasi [33]. HLA III klases iever sevī audzēja nekrozes faktoru (TNF), karstuma šoka proteīnu (HSP, angl. *heat shock protein*) un komplimenta sistēmas proteīnus. [34,34].



1.1 att. HLA saturošie gēni, 6. hromosomas uzbūve [40]

1.3. Audzēja nekrozes faktors alfa (TNF α , tumor necrosis factor)

TNF α ir daudzfunkcionāls citokīns ar izteiktu pleiotropismu, kurš piedalās organisma aizsargreakcijas veidošanā, stimulē fagocitāro un citotoksisko šūnu aktivitāti, regulē imūnos iekaisuma procesus, regulē šūnas apoptozi [13,15,27]. Literatūrā ir daudz datu, kuros parādīta TNF α producēšanās izmaiņas dažādos vīrusa infekcijas gadījumos.

TNF α ir olbaltumviela ar 17 kD molekulāro masu, tas tiek sintezēts no aktīviem monocītiem/makrofāgiem, neitrofīliem, T-limfocītiem, NK šūnām, tuklām šūnām, un tam piemīt plašs bioloģiskās darbības spektrs. Šis citokīns piedalās iekaisuma atbildes reakcijas attīstībā: iniciē IL-1, IL-6 sintēzi, priekš neitrofīliem granulocītiem kalpo kā hemoatraktants, aktivizē makrofāgu, kā arī stimulē T un B limfocītu proliferāciju. TNF α ir iekļauts lielākajā daļā infekcijas un imunopatoloģisko saslimšanu patoģenēzē, kur tas pilda dažādas funkcijas, galvenokārt darbojas kā mediators iedzimtas imunitātes attīstībā.[41]

Tomēr pārmērīga TNF α produkcija var būt par cēloni akūtu iekaisuma procesu komplikācijai un septiskam šokam, kā arī tam ir liela nozīme infekcijas un autoimūno saslimšanu patoģenēzē. Pētījumos ar dzīvniekiem ir noskaidrots, ka transgēna pelēm, kurām tika mākslīgi ievadīts TNF α cilvēka gēns, attīstījās smagas pakāpes poliartrīts. Turpretī pelēm, kurām bija nomākts TNF α receptora gēns (angl. knockout), ievērojami samazinājās pretestība pret dažādiem patogēniem, tādējādi parādot, cik svarīga ir TNF α nozīme infekcijas rezistences gadījumā [42].

TNF α hiperprodukcija ir viens no galvenajiem mehānismiem infekcijas procesu aktivizēšanās laikā, kad tas no latentās fāzes pāriet uz klīnisko izpausmju fāzi, kā arī liecina par slimības progresēšanu. Paaugstināts TNF α līmenis asinīs plazmā konstatēts pie hronisko slimību saasināšanās fāzes, kas tiek inducēti ar HBV, HCV, HIV, parastais herpes vīruss (HSV, angl. herpe simplex viruss), Epšteina-Barra vīruss, citomegalovīruss, poliomiēlīts, ērcu encefalīts u.c. [4,5,13,14]. TNF α produkcijas inhibēšana infekcijas procesa hroniskajā stāvoklī, tiek uzskatīta par imūnas atbildes disregulēšanu. Viena no galvenajām bioloģiskajām TNF α funkcijām tiek uzskatīta tā piedalīšanās apoptozes regulācijā, tai skaita arī pie bojātām vīrusu šūnām [43]. Kopumā ir zināms, ka palielinoties TNF α – programmētās šūnu nāves induktora – produkcijai hroniska HBV un HCV agrīnās infekcijas stadijas laikā, tas var darboties kā starpnieks palielinātai hepatocītu apoptozei, veicinot aknu šūnu bojājumus un kā sekas visam – ļaundabīgu audzēju attīstībai [5,8,12].

1.4. TNF α gēna funkcionālais polimorfisms

Ar vārdiem funkcionālais polimorfisms ir domāts viena nukleotīda nomaiņa vai tandēmiski nukleotīdu apgabalu atkārtojumi nekodētajās gēna daļās (promoterī, intronos). Šāda veida izmaiņas neietekmē olbaltuma struktūru, taču dažos gadījumos izmaiņa mRNS transkripcijas ātrumu (paātrinot vai palēninot to). TNF α gēns atrodas uz sestās hromosomas (6p21.3) lokusā, kas kodē galvenā audu saderības kompleksa pirmo (HLA-A, B, C) un otro (HLA-DP, DQ, DR) klasi. Tā atrašanās vieta genoma vidusdaļā (skat.1.1. attēlu) nosaka šī lokusa liela variabilitāte, īpaši, jo gēna TNF α promotera daļa, kas iekļauj veselus astoņus polimorfos apgabalus ar viena nukleotīda nomaiņu: -1031T/C, -863C/A, -857C/T, -575G/A, -376G/A, -308G/A, -244G/A, -238G/A [4,5,10,44]. Tomēr par svarīgākajām nomaiņām tiek uzskatītas tikai divas. Tās ir viena nukleotīda nomaiņa guanīnam uz adenīnu pozīcijā -308 (G/A) un -238 (G/A), kas izraisa TNF α produkcijas līmeņa izmaiņas, un tās tiek uzskatīti par funkcionālām izmaiņām. Pozīcijas -308 un -238 atrodas uz promotera daļas, kas dod iespēju transkripcijas faktoros sasaistīt ar šī gēna daļu un tādējādi ietekmēt transkripcijas ātrumu. Šīs nukleotīdu substitūcijas ir diezgan izplatītas un biežas, kā piemēram, eiropeīdās rases genotipā aptuveni 27-33 % satur polimorfo (reto) alēli -308*A un aptuveni 7-10 % - retu alēli -238*A [45]. Fernandez et al. (2002) izmērīja TNF a produkciju ar perifēro asiņu mononukleāro vielu palīdzību, kuri tika stimulēti ar konkanavalīnu A (conA, angl. concanavalin A). Pētījums parādīja, ka donora šūnas, kuras pēc polimorfās alēles -308*A ir homozigots, sintizē citokīnus 3x aktīvāk, nekā to pacientu šūnas, kurām ir -308 GG genotips [46]. Pēc šī pētījuma četras neatkarīgas pētnieku grupas izmantoja himērisku struktūru, kas sastāvēja no TNF α promotera daļas gēna un transkripcijas aktivācijas proteīnu, kuru viegli ir izmērīt (enzīms hloramfenikol acetiltransferāzi vai luciferāzi) [4,5,10,41,42]. Rezultātā tika pierādīts, ka nukleotīda guanīna nomaiņa uz adenīnu pozīcijā 308, ievērojami palielina transkripcijas aktivitāti un paātrina mRNS rašanos. Tādējādi, -308 polimorfisms paaugstina gēna TNF α transkripcijas ātrumu un, attiecīgi, citokīnu producēšanos. Transkripcijas ātruma palielināšanās līmenis ir atkarīgs no vielām, kuras ietekmē šī šūnas, kā arī no pašas šūnas tipa. Vairuma gadījumos tas notiek pilnīgi tā, kā iepriekš aprakstīts, taču pastāv vairāki pētījumi, kuros netiek pierādīta -308 apgabala polimorfisma ietekme uz transkripcijas efektivitāte TNF α gēnam [47]. Iemesls atšķirībām acīm redzot „slēpjas” tajā, ka pētījumos tika izmantotas dažāda veida šūnas, kurās plazmīdas ir transfēcētas. Visaktīvākā polimorfā gēna TNF α (-308*A) transkripcija

notiek makrofāgos: tajos tā ir 5x augstāka, nekā normāla gēna -308*G transkripcija. Ņemot vērā faktu, ka makrofāgi ir galvenais TNF α avots, to ģenētiski noteiktā spēja palielināt pro-iekaisuma citokīnu produkciju var ietekmēt iekaisuma un imunoloģiskos procesus organismā.

Par vēl vienu gēna TNF α polimorfo apgabalu, kas var ietekmēt citokīnu producēšanos, tiek uzskatīts pozīcija -238. Taču šajā gadījumā guanīna nomaina uz adenīnu nevis palielina, bet gan samazina olbaltuma producēšanos. Nesadalīto asins šūnu stimulācija ar lipopolisaharīdu parādīja, ka šūnas ar genotipu -238GA sintizē 1,5x mazāk TNF α , nekā šūnas ar genotipu -238GG [8,10,42,46,47]. Vēl jāpiebilst, ka stimulējot perifēro asiņu monocītu frakciju ar streptokoka superantigēnu šī atšķirība pieauga par 2,8 reizēm [52]. Izrādījās, ka nukleotīdu -308 (G/A) un -238 (G/A) maiņa izraisa pretēju darbību uz TNF α producēšanos: -308 palielina to, savukārt -238 samazina. Teorētiski, vienlaicīga šo abu polimorfismu atrašanās cilvēka genotipā vajadzētu kompensēt viens otra darbību un neietekmēt citokīnu producēšanos, taču praksē šie abi polimorfismi reti kad ir sastopami kopā. Augsti producēšanās spējas alēle -308*A lielākoties tiek mantota kopā ar normālo -238*G alēli, savukārt normālā -308*G alēlē ar zemi producējošo -238*A alēli [42-47].

TNF α un to receptoru produkcijas līmenis tiek noteikts ar dažādām ģenētiskajām analīzēm. Jaunu dotā citokīna alēlēs gēnu marķieru, kas būtu jutīgi pret vīrusa infekcijām, meklēšana ir maz pētīts virziens medicīnā. Citokīna polimorfie gēni aktīvi piedalās specifiskās imūnās atbildes veidošanā. Gēna atsevišķie alēles varianti var tikt asociēti ar konkrētā olbaltuma producēšanās līmeni, kas savukārt ietekmē slimības gaitu un dažādu slimības sarežģītību rašanos [52]. Jaunu saistību meklēšana starp citokīna gēnu polimorfajiem variantiem ar dažādu hronisko vīrusa infekciju slimības gaitu, tiek uzskatīts par vienu no iespējamajiem profilakses pasākumiem, lai neveidotos slimības saasinājums. Kā arī jaunu marķieru meklējumi, lai veiktu imūnkorekcijas inficētajiem pacientiem. Tādējādi, ņemot vērā pašreiz zināmo TNF α lomu vīrusa imūnās atbildes mehānisma attīstībā, pētījumi imunocītu starpsūnu kooperācijā ar TNF α palīdzību, var būt par pamatu tam, lai identificētu slimības „hronizācijas marķierus” un izstrādātu efektīvu terapiju hronisko vīrusa infekcijas pacientiem.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

Pētījums tika veikts Rīgas Stardiņa universitātē Klīniskās imunoloģijas un imunoģenētikas starpkatedru laboratorijā un RAKUS stacionārs „Latvijas Infektoloģijas centrs”.

Darba gaitā tika analizēti 200 HIV inficēti pacienti. TNF α gēna G-238A un G-308A polimorfo variantu sastopamības biežumu noteica ar PĶR/RFLP analīzi. Pētāmajā grupā tika iekļauti pacienti, kuri bija inficējušies ne mazāk ka 10 gadus.

Kontrolgrupā tika iekļauti 117 veseli indivīdi.

Pacientu vidējais vecums bija 68,6 +18,4 gadi. Starp pacietniem 49 (54,8 %) bija sievietes un 41(45,2 %) vīriešu. Visi pacienti tika sadalīti 4 grupās (sk. tab.2.1.). Pirmā grupa sastāvēja no 31 (34,8 %) pacienta, kuriem bija nekomplicētas gaitas HIV infekcija. No šiem pacientiem 14 (45,5 %) bija sievietes un 17 (54,5 %) vīriešu. Otrajā grupā tika iekļauti 15 (16,8 %) pacienti ar HIV infekciju A 1-3 stadijā, ar oportūnistisku infekciju saasinājumiem (kandidoze, limfadenopātija, herpes u.c.). Sadalījums pēc dzimuma bija gandrīz vienāds – sievietes 48% un vīriešu 52%. Trešajā grupā bija 23 (25.8 %) HIV inficēto pacientu ar TBC, starp tiem 8 (50 %) sievietes un 8 (50 %) vīrieši. Ceturtajā grupā tika iekļauti 35 (39.3 %) pacientu ar HCV, starp tiem 15 (76,2 %) sievietes un 4 (23,8 %) vīrieši.

2.1. tabula

HIV pacientu sadalījums pa grupām

HIV infekcijas norises gaita	Grupa	Pacientu skaits	
		n	%
HIV infekcija	1	31	34.8
Stadija AI-III	2	58	65.2
HIV + TBC	3	23	25.8
HIV+ HCV	4	35	39.3
Kopā		147	100

Pētījumā netika iekļauti pacienti, kuri bija jaunāki par 18 gadiem, grūtnieces, pacienti, kas atrodas ieslodzījumā vai pirmstiesas izmeklēšanas izolatorā, pacienti, kas infekciju ieguvuši vertikālās transmisijas ceļā, HIV-2 infekcijas pacietni un pacienti, kas nav Latvijas pilsoņi vai nav pastāvīgie Latvijas iedzīvotāji.

Visi HIV inficētie pacienti, kuri tika iekļauti pētījumā, ir iekļauti LIC novērošanas uzskaitē un ir iepazinušies ar dokumentu „Informācija pacientiem” un parakstījuši „Pacienta piekrišanas apliecinājumu” (*sk.pielikumus 1 un 2*).

DNS tika izdalīts no perifērajām leikocītārām asinīm, izmantojot *QIAamp DNA* [48] metodi:

1,5 mL ependorfā ar tipu pārnest 20 µL Protease. Ependorfā ar proteāzi pievienot 200 µL asinis, ko pēc tam ar tipu samaisīt. Pievienot 200 µL buferi AL, apmaisīt vorteksā 15 sek. un pēc tam inkubēt 10 min. termostatā 56°C temperatūrā. Pēc izņemšanas no termostata uzvorteksēt, lai noņemtu pilienus no ependorfā vāciņa. Pievienot 200 µL Ethanol 96 – 100 %, aizver vāciņu, ar rokas kustību lēnām apmaisīt ependorfā saturu un pēc tam ievieto vorteksā, kur apmaisa 15 sek., lai noņemtu pilienus no ependorfā vāciņa. Uzmanīgi, nepieskaroties QIAamp micro spin riņķim, pārnest ependorfā saturu ar tipu. QIAamp micro spin ir jābūt ievietotai 2 ml mēģenē. Inkubē 1 min. istabas t°. Aiztaisītu mēģenes vāciņu centrifugē 1 min. pie 6 000 – 8 000 apgr./min. Pēc izņemšanas no centrifūgas nomaina mēģeni ar supernatantu (atrodas apakšā) pret jaunu. QIAamp micro spin atstāt, tajā atrodas nepieciešamās nogulsnes (DNS). Uzmanīgi, nepieskaroties QIAamp micro spin riņķim, pievienot 500 µL Buferi AW1, inkubē 1 min. istabas t°, ko pēc tam centrifugē 1 min/ pie 6 000 – 8 000 apgr./min. Nomaina mēģeni ar supernatantu (atrodas apakšā) pret jaunu. QIAamp micro spin mēģenē, uzmanīgi, nepieskaroties riņķim, pievienot 500 µL Buferi AW2, ikubē 1 min. istabas t°, centrifugē 3 min. pie 14 000 – 20 000 apgr./min. Nomaina jaunu 1,5 mL ependorfu (QIAamp micro spin mēģene visu laiku saglabājas tā pati, tajā atrodas nepieciešamās DNS nogulsnes). Uzmanīgi, nepieskaroties QIAamp micro spin riņķim, pievienot 200 µL Buferi AE vai destilētu ūdeni. Inkubē 5 min. 15 – 20°C, pēc tam centrifugē 1 min. 6 000 – 8 000 apgr./min.

DNS kvalitāte un kvantitāte tika pārbaudīta izmantojot *Qubit*® *fluorometer* (*Invitrogen ASV*).

Amplifikācijas maisījums ar tilpumu 25 mkl ietver sevī:

- 15 nM katru praimeru;
- 67 mM Trīs-HCl, pH 8,8;
- 16,6 mM amonija sulfāta;
- 6,7 mM MgCl₂;
- 6,7 mkM EDTA;

- 10 mM merkaptoetanolā;
- 170 mkg BSA;
- 1,0 mM dNTP
- 1,0 mM 1U TtH-DNS-polimerāzi (izgatavotājs „DNA techlonoly”, Maskava).

Gēna TNF α fragmenta amplifikācijai izmantoja praimerus, kas saturēja vienu bāzes maiņu, lai izveidotu restrikcijas saiti, kura nepieciešama, lai identificētu gēna polimorfo variantu:

- TNFA1: 5'<ATC TGG AGG AAG CGG TAG TG>3'
- TNFM1: 5'<AAT AGG TTT TGA GGG CCA TG>3' (satur G pozīcijā –313);
- TNFM2: 5'<AGA AGA CCC CCC TCG GAA CC>3' (satur T pozīcijā –240).

Praimeri A1 un M1 tika izmantoti, lai amplificētu fragmentu ar polimorfismu -308 pozīcijā, savukārt praimeri A1 un M2, lai amplificētu fragmentu ar polimorfismu -238 pozīcijā.

Gēna TNF α fragmentu amplifikāciju veica ar programmējamu termocikla kameru (QIAmp blood kit; Qiagen, Krefeld, Germany):

- Denaturācija (94 °C, 7 min.)
- 12 ciklu amplifikācija 96 °C – 15 sek.
- 12 ciklu amplifikācija 65 °C – 20 sek.
- 23 ciklu amplifikācija 96 °C – 10 sek.
- 23 ciklu amplifikācija 58 °C – 30 sek.
- 23 ciklu amplifikācija 72 °C – 30 sek.
- Noslēguma sintēze 72 °C – 3 min.

Amplifikācijas specifiskumu un PĶR produktu daudzumu pārbaudīja ar elektroforēzes metodi uz 3,5% gēla.

Lai identificētu TNF α alēles variantu PĶR produktus hidrolizēja 37°C temperatūrā 2h ar Bsp19I endonukleozes palīdzību, lai noteiktu G–308A polimorfismu, un ar MspI endonukleozī, lai noteiktu A–238G polimorfismu. Amplificēto DNS fragmentu restrikciju veica saskaņoti ar izgatavājfirmas rekomendāciju (QIAmp blood kit; Qiagen, Krefeld, Germany). Hidrolīzi noteica pēc elektroforēzes rezultātiem uz 3,5% gēla.

Genotipu sadalījumu pārbaudīja pēc Hārdija-Veinberga vienādojuma, kurā izmantoju definētus kritērijus un ko realizēja programma GENEPOP (HW.bat). Gadījumos, kad ir liels paraugkopu skaits (vairāk nekā tūkstots), izmantoja parasto programmu [48-51]. Lai pārbaudītu rezultātu viendabīgumu, tika izmantoti trīs veida kritēriji: Hī-kvadrāts (χ^2), ticamības koeficients (G2) un un Fišera kritērijs (Fi). Šie trīs mērījumi tika veikti ar StatXact-4 programmatūru (Cytel Software Corporation, Inc., CIIA).

3. REZULTĀTI

Alēļu un genotipa sastopamības biežumu TNF α gēna polimorfismiem G–238A un G–308A ir parādītas 3.1. tabulā. Genotipu sadalījums visas grupās pēc abiem polimorfismiem statistiski neatšķīrās (pēc Hārdija-Veinberga principa). Grupas viendabīguma sadalījumu pacientu grupā un kontroles grupā tika pārbaudīta pamatojoties uz p-vērtību, kas tika iegūta ar StatXact programmas palīdzību. Tabulā ir parādītas precīzi p-vērtības visiem trim kritērijiem: Hī-kvadrāts [χ^2], ticamības koeficients [G2] un Fišera kritērijs [Fi].

Apskatot abus TNF α gēna polimorfismus HIV pacientiem, tikai polimorfismam G–308A genotipa sastopamības biežums (G/G, G/A un A/A) alēlēm (G un A) atšķīrās no kontroles grupas (attiecīgi $p=0,037$ [G2] un $p=0,012$ [G2]).

3.1.tabula

Alēļu un genotipa sastopamības biežums TNF α gēna polimorfismiem G-308A un G-238A slimu un veselo pacientu grupās

Polimorfisms	Genotipi un alēles	Pacienti N = 89		Kontroles grupa N = 117		p-vērtība [χ^2 ; G2; Fi]
		n	gf	n	gf	
G–308A	G/G	71	0,80	108	0,92	0,019 [χ^2]
	G/A	16	0,18	8	0,07	0,037 [G2]
	A/A	2	0,02	1	0,01	0,017 [Fi]
Precīza p-vērtība		0,083		1,00		
	G	158	0,89	224	0,96	0,0077 [χ^2]
	A	20	0,11	10	0,04	0,012 [G2]
G–238A	G/G	84	0,94	101	0,88	0,062[χ^2] [Fi]
	G/A	4	0,05	14	0,12	0,048 [G2]
	A/A	1	0,01	0	0,00	
Precīza p- vērtība		0,29		0,18		
	G	172	0,97	216	0,94	0,25 [χ^2]
	A	6	0,03	14	0,06	0,25 [χ^2]

n=cilvēku skaits; gf= sastopamības biežums; χ^2 = Hī-kvadrāts; G2= ticamības koeficients; Fi= Fišera kritērijs

Detalizēta analīze parādīja, ka galvenokārt homozigots G/G ir izraisa nevienmīgu sadalījumu. To sastopamības biežums kontroles grupā ir mazliet lielāks nekā inficēto pacientu

grupā (92% pret 80%) ar p vērtību 0,03. Genotips G/A un A/A abās grupās izveido statistiski viendabīgu izlīdzinājumi, t.i., dotajā gadījumā tos var skatīt kā vienu veselu. Tiek uzskatīts, ka gēna TNF α alēle A pozīcijā -308 asociēta ar palielinātu TNF α producēšanos. Tāpēc arīdzan homogēnā viendabīgi izlīdzinātā grupā, kurā ir apvienoti genotipi -308A/-308A; -308G/-308A, sanāk, ka inficētiem pacientiem dominēja TNF α stimulējošais gēns, savukārt kontroles grupai – gēns, kas inhibēja TNF α ekspresiju un sintēzi.

Kas attiecas uz G-238A dimorfismu šajā pašā gēnā, tad starp HIV pacientu un veselo kontroles grupu genotipa un alēles sastopamības biežums nav statistiski atšķirīgas viena no otras (attiecīgi p = 0,062 [χ^2 ; Fi] un p = 0,25 [χ^2 ; G2; Fi]).

TNF α gēna divu polimorfismu sadalījums pēc genotipiem var aplūkot tabulā 3.2.

3.2.tabula

TNF α gēna polimorfismu G-238A un G-308A sadalījums pēc genotipa

Genotips		Pacienti		Kontrolgrupa	
G-238A	G-308A	N = 89	gf	N = 115	gf
G/G	G/G	66	0,74	92	0,80
G/G	G/A	16	0,18	8	0,07
G/A	G/G	4	0,03	14	0,12
G/G	A/A	2	0,02	1	0,01
A/A	G/G	1	0,01	0	0,00
Precīza p-vērtība visām kombinācijām					
[χ^2]					0,015
[G2]					0,023
[Fi]					0,014

n=cilvēku skaits; gf= sastopamības biežums; χ^2 = Hī-kvadrāts; G2= ticamības koeficients; Fi= Fišera kritērijs

Genotipa sadalījuma salīdzināšanas analīze inficēto pacientu grupā un kontroles grupā parādīja to, ka tos var uzskatīt par statistiski atšķirīgām (visprecīzākā no visām trim p-vērtībām bija 0,023 [G2]). Dubultais homozigots -238G/-238G; -308G/-308G (74% pacientiem un 80% populācijā), kā arī heterozigota genotips -238G/-238A un homozigota genotips -308G/-308G (3% gadījumos slimiem pacientiem un 12% gadījumos kontroles grupai) zīmīgi biežāk bija sastopams kontroles grupā salīdzinot ar pacientu grupu. Tajā pat laikā homozigota genotips -238G/-238G, heterozigota genotips -308G/-308A, un homozigota genotips -238G/-238G un -308A/-308A parādījās uzskatāmi biežāk inficēto pacientu grupā nekā kontroles grupā. Kā arī

pacientu grupā tika novērota divu homozigota genotipu kombinācija 238A/-238A un -308G/-308G, kas savukārt netika novērota kontroles grupā.

Lai noteiktu iespējamās asociācijas starp genotipiem pēc lokusiem TNF-238 un TNF-308 četrās pētāmajās grupās, tika izmantota oriģinālprogramma SANCT- Structural Analysis of Contingency skatīt 3.3. tabulu.

Nevienā no pacientu grupām būtiskas novirzes no randomizētas genotipu kombinēšanas netika atrastas. Analizējot datus, genotipu kombinācijām tika izveidots iekšējs viengabalains „bloks”, kurā tika apvienotas visas pacientu grupas. Šajā grupā (blokā) atšķirības starp šo grupu veidojošajām īpašībām (slimības saasinājuma veidošanās un neveidošanās) nebija statistiski atšķirīgas, t.i., šī jaunizveidotā grupa ir statistiski homogēna ($p=0,64$).

Izpētot genotipus, tika noteiktas divas iekšēji viendabīgas grupas (G/G , G/A и A/A , G/G) un (G/G , G/G , G/G , A/A , G/A , G/G). Šajās grupās atšķirības starp genotipu sadalījumiem nav statistiski atšķirīgas (attiecīgi $p = 0,74$ un $p = 0,23$). Esošie rezultāti ir attēlot 3.3. tabulā.

Mazā p -vērtība ($p = 0,002$) šajā tabulā tika iegūta, pateicoties apvienotai slimo pacientu grupai un kontroles grupai, kopā ar iešējo viendabīgo genotipu grupu (G/G , $G/A + A/A$, G/G) и (G/G , $G/A + A/A$, G/G) и (G/G , $G/G + G/G$, $A/A + G/A$, G/G). Tomēr šī p -vērtība ir veidota no 5 apvienotām grupām, tāpēc p izrādījās ir vienāda ar 0,060. Tādējādi, veicot izdarītos labojumus, izrādījās, ka starp salīdzināmām genotipu grupām (G/G , $G/A + A/A$, G/G) и (G/G , $G/G + G/G$, $A/A + G/A$, G/G) nav statistiski ticamas asociācijas ($p=0,060$). Veicot kvantitatīvos salīdzināšanas mērījumus, tika noskaidrota izredžu attiecība $OR = 3,8$ (programma StatXact), kas šajā gadījumā bija diezgan augsta. OR ticamības intervāls $CI 95\%$ bija 1,2–14,6.

TNF α gēna divu polimorfismu sadalījums pēc apvienotajiem genotipiem HIV inficētiem pacientiem un kontroles grupai

Genotips	Kontroles grupa	Visi pacienti	Kopā	P \leq 0,05	Koriģētā p-vērtība	OR	SD 95% ticamības intervāls
G/G,G/A+A/A,G/G	8(7%)	20(22%)	28	0,74	0.060 (0.002*)	3.8	[0,9–20,1] (1,2–14,6)*
G/G,G/G+G/G,A/A +G/A,G/G	107(93%)	70(78%)	177	0.23			
Kopā	115	90	205				
Paraugkopu p-vērtība	0,64						

* Nekoriģēta p-vertība un ticamības intervāls priekš (odds ratio)

OR=izredžu attiecība

SD=ticamības intervāls

Šajā darbā tika noskaidrotas TNF α gēnu (*G*-238*A*, *G*-308*A*) polimorfie varianti HIV inficēto pacientu grupa un kontroles grupā. Veicot TNF α gēna ģenētisko analīzi bija nepieciešams ņemt vērā to, ka nukleotīdu guanīns uz adenīnu nomaiņa TNF α gēna promotera daļā -308 pozīcijā, ievērojami veicināja transkripcijas ātruma peiaugumu un palielināja mRNS veidošanās ātrumu. Pacientiem ar -308*A*/*A*-308*A* genotipu proteīnu sintēze notika 3 reizes aktīvāk nekā personām ar -308*G*/*G*-308*G* genotipu. Tāpēc alēles -308*A* "klātbūtne" veicina palielinātu proteīna TNF α producēšanos, kas atbilst ar šo imunoloģisko analīzi. Savukārt guanīna nomaiņa uz adenīnu pozīcijā -238 izraisa pazeminātu gēna ekspresijas līmeni un samazina proteīna TNF α producēšanos. Tādējādi tika pierādīts, ka stimulējot veselās asins šūnas ar lipopolisaharīdu, kontrolgrupas pacietniem šūnas ar genotipu -238*G*/*G*-238*A* TNF α sintezējā 1,5 reizes mazāk nekā šūnās ar genotipu -238*G*/*G*-238*G*.

TNF α gēna alēles -308*A* sastopamības biežums HIV inficētiem pacientiem (11%) bija gandrīz trīs reizes augstāks ($p=0,012$) nekā tas bija kontroles grupā (4%), kas savukārt liecina par to, ka HIV pacientiem ir palielināta tendence uz TNF α proteīna paaugstinātu produkciju. Tai pat laikā TNF α gēna alēlēs -238*A* sastopamības biežums kaut arī divas reizes biežāk bija sastopams kontroles grupā (6 %) nekā HIV inficēto pacientu grupa (3 %), tomēr statistisko ticamību nepierādīja ($p = 0,253$).

Pacientiem, kas ir inficējušies ar HIV, heterozigotas genotipa -308*G*/*G*-308*A* sastopamības biežums bija 2,6 reizes augstāks (attiecīgi 18% un 7 %) nekā salīdzinājumā ar kontroles grupu

($p= 0,02-0,038$), kas arīdzan pierāda TNF α sintēzes palielināšanos. Līdz ar to homozigotas genotips $-308G/-308G$ bija biežāk sastopams tieši kontroles grupā ($p=0,02-0,038$).

Kaut arī heterozigotas genotips $-238G/-238A$ HIV inficētiem pacientiem ir sastopams 2,4 reizes retāk nekā kontroles grupā, tomēr šī atšķirība nebija statistiski ticama ($p=0,048-0,062$).

Visu nēsātāju genotipu – gan stimulējošo, gan inhibējošo TNF α ekspresiju un sintēzi – sastopamības biežuma analīze arīdzan pierādīja to, ka pacienti kuri ir inficējušie ar HIV ir lielāks pārsvars tieši stimulējot TNF α ekspresiju un sintēzi, nekā kontroles grupas pacientiem, kuri bija izteiktāka TNF α ekspresijas un sintēzes inhibīcija ($p = 0,0231$).

Jāpiebilst, ka abi TNF α gēna polimorfie saiti darbojas salikti: „stimulējošā” alēle $-308A$ lielākoties tiek mantota kopā ar normālo alēli $-238G$, savukārt normālā alēle $-308G$ kopā ar „inhibējošo” alēli $-238A$. Skatoties pēc TNF α divu gēna polimorfisma sadalījumu pēc kombinētiem genotipiem, HIV inficētiem pacientiem visbiežāk sastopamā kombinācija bija heterozigotas $-308G/-308A$ vai arī homozigotas $-308A/-308A$ genotips (kas stilmulē TNF α proteīna sintēzi) kopā ar homozigotas genotipu $-238G/-238G$. Savukārt kontroles grupā visbiežāk tika novērota divu polimorfismu homozigotas kombinācija $-238G/-238G$; $-308G/-308G$ vai arī homozigotas $-308G/-308G$ genotipa kombinācija ar homozigotas genotipu $-238G/-238A$ jeb TNF α proteīna inhibitoru.

Saskaņā ar mūsu datiem, netika noskaidrotas statistiski ticamas atšķirības starp alēļu un genotipu $-238G/A$ и $-308G/A$ sadalījumu TNF α gēna polimorfismos dažādās HIV inficēto grupās. Iespējams ir nepieciešama turpmāka izpēta ar lielāku pētāmo pacientu skaitu katrā grupā.

4. DISKUSIJA

Imūnās šūnas sekretē dažādus mediatorus (citokīnus), kas ir ar izteikti augstu specifiskumu [5,7,41]. Viens no šāda veida citokīniem ir TNF α , kas piedalās iekaisuma atbildes izveidē: iniciē IL-1, IL-6 sintēzi, kas savukārt aktivizē neitrofilos granulocītus, makrofāgus, kā arī stimulē T un B limfocītu proliferāciju. TNF α piedalās lielākajā daļā infekcijas un imūnpatogiskajās salsmšanu patoģenēzē [10,7,41,42]. Pēc pēdējo gadu pētījumiem noteikta loma infekcijas procesu attīstībai ir pārmantošanas faktoram. Ģenētiski ieprogrammēta paaugstināta vai pazemināta TNF α sintēze, ietekmē cilvēka imūnās sistēmas spēju reaģēt uz dažāda veida patogēniem un imūnpatoloģisko procesu attīstību [41,42].

TNF α gēna promotera daļā ir noteikti vairāki polimorfismi, kur viens no tiem atrodas pozīcija -308 un tajā guanīns nosaka parasto (bieži sastopamo) alēli (TNF1; -308G). Tai pat laikā guanīna aizvietošana ar adenīnu prezentē sevi kā neparastu alēli (TNF2; G-308A), kas tiek uzskatīta par diezgan spēcīgu transkripcijas aktivātoru ar 6-7 reizes paaugstinātu TNF α gēna transkripcijas indukciju. Savukārt cits TNF α gēna alēles A polimorfais variants (G-238A) ir asociēts ar pazeminātu TNF α producēšanos.

Zināms, ka poliartikulāras un oligoartikulāras gaitas JIA pacientiem TNF α līmenis asinīs korelē ar slimības aktivitāti. TNF α kodējošais gēns *TNF* lokalizējas 6.hromosomas īsajā plecā, pēc literatūras datiem viena nukleotīda polimorfismi (SNP) -308A/G, -238A/G un 244AA, kas lokalizēti gēna promotera rajonā, var ietekmēt TNF- α produkcijas daudzumu [41,44]. Joprojām ir sastopami pretrunīgi dati par SNP ietekmi uz JIA attīstību, prognozi un terapijas efektivitāti. Genotips -308A/G ticami retāk bija sastopams seronegatīva un seropozitīva poliartrīta, persistējoša oligoartrīta un artrīta ar entezītu pacientiem (attiecīgi $p = 0,000$; $p = 0,002$; $p = 0,000$ un $p = 0,000$). Genotipa -238A/G sadalījumā starp JIA tipiem un kontroli nebija ticamas atšķirības ($p = 0,05$). Tika konstatēta ticama atšķirība starp JIA un kontroles grupu genotipam -244AA ($p = 0,023$), bet atšķirības starp JIA tipiem netika konstatētas ($p = 0,05$). No iepriekš minētā pētījuma, var saprast, ka iegūtie dati apliecina TNF α gēna polimorfismu nozīmi JIA patoģenēzē. Polimorfismam -308A/G varētu būt protektīva nozīme seropozitīva un seronegatīva poliartrīta, persitējoša oligoartrīta un artrīta ar entezīta attīstībai. Polimorfismam 244AA genotipam varētu būt protektīva nozīme, bet nav asociācijas ar kādu no JIA 4 tipiem [52].

Pirmā cilvēka infekciozā saslimšana, kuru izdevās sasaistīt ar TNF α gēna variabilitāti, izrādījās, ka ir malārija. Pētījumi tika veikti Gambija un tajā piedalījās vairāk nekā 1000 pacientu. Genotipēšanas rezultāta tika noskaidrots, ka polimorfās alēles -308*A nēsātājiem ir 4 reizes lielāks risks saslimt ar celebrālo malārijas formu un 7 reizes lielāks risks attīstīties nopietniem nervu sistēmas traucējumiem. Līdzīgi pētījumi tika veikti ar Šrilankā un aptiprinājās saikne starp alēli -308*A un celebrālās malārijas attīstības risku [5,8,41,42]. Vērts ir pieminēt, ka producēties augstpējīgam TNF α genotipam ir negatīva loma ne tikai uz atsevišķu cilvēku, bet arī uz visu populāciju. Tā, piemēram, Dienafrikas reģionā, kas ir galvenais malārijas „perēklis”, polimorfās alēles -308*A nēsātāju skaits ir samazinājies līdz 5%, kad tai pat laikā baltai eiropas rasei, kurai saslimšanai ar malāriju ir reta sastopamība, šīs alēles sastopamība ir 30%.

Ģenētiskās uzņēmības un pretošanās spējai TBC infekcijas gadījumā, kā arī tā attīstības progresēšanā no latentās uz aktīvo TBC fāzi, tika demonstrēta dažādos pētījumos ar dzīvniekiem modeļiem [53]. Daži pētījumi ar cilvēkiem parādīja ģenētisko uzņēmības komponentu, organisma izturību pret infekcijas slimībām un TBC progresēšanu aktīvajā fazē. Attiecīgi alēļu sadalījumam starp homozigotu un heterozigotu TBC aktīvās fāzes attīstībā, homozigots ir no 65% līdz 85% salīdzinājumā ar heterozigotu – 20% līdz 35%.

Nasi et al HIV-1 infekcijas pētījums parādīja, ka IL-10 spēj inhibēt vīrusa replikāciju, tad, kad proiekaisuma citokīni, TNF α un IL-1, vīrusa replikāciju stimulē. [53]

Šajā pētījuma analizētas iespējamās korelācijas starp TNF α polimorfajām alēlēm un slimības progresiju. Par vienu no statistiski ticamajiem rezultātiem var uzskatīt TNF α alēlēs -238A spēja aizkavēt HIV infekcijas progresēšanu. Kaut arī funkcinālā loma TNF α -238 A alēles ietekme uz transkripcijas aktivitāti nav īsti skaidra, tomēr to var uzskatīt par labu faktoru vīrusa replikācijas samazināšanās gadījumos. Pētījumā tika konstatētas ģenētiskā kopsakarība starp TNF α -238 alēļu variantiem un HLA II klases gēniem, un garāka latentā perioda nosacījumi. Šo atšķirību nozīme nav pilnībā skaidra, taču esošie dati var nozīmēt, ka latentais stāvoklis HIV infekcijas gadījumā iespējams ir no vairākiem, apvienotiem ģenētiskiem variantiem, kas apvienojoties palēnina slimības attīstību. Iegūtie rezultāti vēl jo vairāk uzsver ģenētiskos faktorus HIV infekcijas attīstības laikā. Iegūtie dati arī apstiprina HLA lokusu spēju kontrolēt slimības progresiju.

Galvenais ierobežojums šī pētījuma laikā bija neliela atlasītā izlases kopa un jaunu pacientu pievienošana pētījumam. Tomēr iegūtie rezultāti ļauj izprast iespējamus mehānismus, kas raksturo infekcijas progresēšanas kontroli.

5. SECINĀJUMI

1. Infekcijas attīstības mehānisms, ko izraisa HIV vīruss un ir saistīts ar imūnsistēmas disregulāciju, viens no patoģenēzes izveidošanās iemesliem ir TNF α sistēmas bojājums.
2. TNF α gēna alēles -308A sastopamības biežums HIV inficētiem pacientiem (11%) bija gandrīz trīs reizes augstāks ($p=0,012$) nekā tas bija kontroles grupā (4%), kas savukārt liecina par to, ka HIV pacientiem ir palielināta tendence uz TNF α proteīna paaugstinātu produkciju
3. TNF α gēna alēlēs -238A sastopamības biežums kaut arī divas reizes biežāk bija sastopams kontroles grupā (6 %) nekā HIV inficēto pacientu grupa (3 %), tomēr statistisko ticamību nepierādīja ($p = 0,253$).
4. Skatoties pēc TNF α divu gēna polimorfisma sadalījumu pēc kombinētiem genotipiem, HIV inficētiem pacientiem visbiežāk sastopamā kombinācija bija heterozigotas -308G/-308A vai arī homozigotas -308A/-308A genotips (kas stilmulē TNF α proteīna sintēzi) kopā ar homozigotas genotipu -238G/-238G.
5. Savukārt kontroles grupā visbiežāk tika novērota divu polimorfismu homozigotas kombinācija -238G/-238G; -308G/-308G vai arī homozigotas -308G/-308G genotipa kombinācija ar homozigotas genotipu -238G/-238A jeb TNF α proteīna inhibitoru
6. Statistiski ticamu datu iegūšanai ir nepieciešams palielināt pētāmo pacientu skaitu katrā grupā.

PATEICĪBAS

Vēlējos izteikt pateicību RSU KIISL vadītājai Jeļenai Eglītai par sniegto iespēju izstrādāt maģistra darbu uz laboratorijas pieejamo materiālu bāzes. Tik pat lielu paldies gribu teikt savai ģimenei par atbalstu un ticību. Latvijas Infektoloģijas centra pārstāvjiem par sadarbību. Draugiem par to, ka vienmēr atbalstīs un iedrošinās. Paldies!

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Klevens R.M., Edwards J.R., Richards C.L. Jr, et al. Estimating health care-associated infections and deaths in US hospitals, 2002// Public Health Rep. 2007; 122(2):160-6.
2. Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ). AHRQ's efforts to prevent and reduce health care-associated infections [fact sheet]. AHRQ Publication No. 09-P013, Rockville,MD: AHRQ; 2009 Sept. Apskatīts 18.04.2014. Tiešsaite: <http://www.ahrq.gov/qual/haiflyer.htm>
3. Scott .RD. The direct medical costs of healthcare-associated infections in US hospitals and the benefits of prevention. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2009. Apskatīts: 18.042014. Tiešsaite: http://www.cdc.gov/hai/pdfs/hai/scott_costpaper.pdf
4. Kumar V., Khosla R., Kumar A. et al. Transforming growth factor-beta 1 gene polymorphism in tuberculosis patients // Int. J. Hum. Genet. 2007; 7(3):249-252.
5. Барбакадзе Г.Г., Сулаберидзе Г.Т., Квиташвили М.А., Пипия Г.В. Экспрессия и значение некоторых провоспалительных цитокинов у больных хроническим гепатитом С // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2005; 4:35-39
6. Hong X., Yu R.B., Sun N.X. et al. 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; 46 (11);7302-7307.
7. Гончарова И.А., Фрейдин М.Б., Рудко А.А. и др. Геномные основы подверженности к инфекционным заболеваниям // Вестник ВОГиС. 2006; 3: 540-552.
8. Novakovska B., Kasprzak-Bergman I. Assosiation between HLA antigens and hepatitis C virus (HCV) infection // Postepy Hig.Med.Dosw. 2004;58:458-462
9. Simanis R., Eglite J., Lejniece S., Chernevska G. Natural clearance of hepatitis C virus in Hemophilia patients.//Lithuania, Medicinos teorija ir praktika. 2008. 44(1):74:218-219.
10. Jasinsikis V., Kasjko D., Kovalchuka L. The effectiveness of antiretroviral therapy for HIV-infected patients with different HLA class II haplotypes// 2nd International Medical meeting 17th LDVA Congress abstract book, 2013:46.
11. Jasinskis V., Kasjko D., Eglīte J.HLA Genetic Polymorphisms' Inheritance Associated with Rapid Progression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection// RSU Zinātniskā konferences tēzes, 2013; 167.

12. Eglīte E, Kovalčuka L, Bekmane U. Et al. HIV un HCV inficēto pacientu TNF α ģenētisko alēļu polimorfisms// Zinātniskā konference, tēzes.2009: 141.
13. Никулина Е.Л. Полиморфизм генов и секреция in vitro про- и противовоспалительных цитокинов при туберкулезе легких. Дисс.кмн, 2011.Томск,155.
14. Pérez-Eliás M. J., San Migue L. G., García J.G.et all.Tuberculosis Complicating Hepatitis C Treatment in HIV-Infected Patients//Clin Infect Dis. 2009; 48(8):82-85.
15. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. Под ред. В. С. Баранова. С-Пб.: Н-Л, 2009; 528.
16. Westover J.B., Sweeten T. L., Benson Met et all. Immune Dysfunction in Autism Spectrum Disorder. Apskatīts: 02.05.2014. Tiešsaite - <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/18076.pdf>
17. Vīksna, L. un līdzautori. *Infekcijas slimības*. Rīga: Medicīnas apgāds, 2011. 589 lp.
18. Santos A.F.,Soares M.A. HIV Genetic Diversity and Drug Resistance// *Viruses*. 2010; 2(2):503-531;
19. Aucher A., Puigdomènech I, Joly E. Polymorphism of major histocompatibility complex class II *B* genes in different lines of the common carp (*Cyprinus carpio*)// *Aquatic Living Resources*. 2003; 16(5):432–437
20. Singh K.K, Gray P.K.,Wang Y. *HLA* Alleles are Associated with Altered Risk for Disease Progression and Central Nervous System Impairment of HIV-Infected Children// *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011; 57(1): 32–39
21. Rakus K.L. , Geert F.Wiegertjes Slimību un profilakses centrs. Infekcijas slimību statistika Latvijā. Apskatīts: 03.05.2014. Tiešsaite: <http://www.spkc.gov.lv/hiv-aids/>
22. World Health organisation. HIV/AIDS data and statistics. Apskatīts: 03.05.2014. Tiešsaite: <http://www.who.int/hiv/data/en/>
23. The Nobel Assembly of Karolinska Institutet has decided today to award the Nobel Prize in Physiology or Medicine for 1980 jointly to Baruj Benacerraf, Jean Dausset and George Snell for their discoveries concerning "genetically determined structures on the cell surface that regulate immunological reactions." Tiešsaite: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1980/press.html
24. Benacerraf B. Antigen processing and presentation. The biologic role of MHC molecules in determinant selection// *J Immunol*.1988;141:17S-20S

25. Zinkernagel R .M., Doherty P. C. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness//*Adv Immunol.* 1979;27:51-177
26. Zinkernagel R. M., Doherty P. C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. //*Nature.* 1974; 248(450):701-2
27. Mullis K. The unusual origin of the polymerase chain reaction// *Scientific American.* 1990;56-65
28. Silvestria A., Bellonia C., Amicib M. De., Non classical HLA genes and non-HLA genes in a population of infants at familial risk of atopy// *Disease Markers ;* 2006: 111–117
29. Narinder K. Mehra and Gurvinder Kaur MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives// *Expert Rev Mol Med.* 2003;5(7):1-17.
30. Morris D. L., Taylor K. E., Fernando M.M.A. Unraveling Multiple MHC Gene Associations with Systemic Lupus Erythematosus: Model Choice Indicates a Role for HLA Alleles and Non-HLA Genes in Europeans// *Am J Hum Genet.* 2012;91(5):778-93
31. Ovsyannikova I.G., Vierkant R.A., Pankratz V.S. Extended LTA, TNF, LST1 and HLA Gene Haplotypes and Their Association with Rubella Vaccine-Induced Immunity// *PLoS One;* 2010;5(7):e11806
32. Aucher A., Puigdomènech I, Joly E., Could CD4 Capture by T Cells Play a Role in HIV Spreading?// *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2010;2010:907371
33. Crandall K. A. Human Immunodeficiency Viruses (HIV). *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001 Nature Publishing Group Salt Lake City, 2001.*
34. Frodsham A.J, Hill A.V. Genetics of infectious disease // *Hum. Mol.Genet.* 2004;13(2):187-194.
35. Fletcher, G J; Samuel, P; Christdas, J; Gnanamony, M; Ismail, A M; Anantharam, R; Eapen, C E; Chacko, M P; Daniel, D; Kannangai, R; Abraham, P Association of HLA and TNF polymorphisms with the outcome of HBV infection in the South Indian population *Genes & Immunity;* Oct2011, Vol. 12 Issue 7, 552.
36. Рыдловская, А. В. Функциональный полиморфизм гена TNFA и патология / А. В. Рыдловская, А. С. Симбирцев // *Цитокины и воспаление . — 2005 . — Том4, N3 . — С. 4-10 . — ISSN 1684-7849.*

37. Наследникова И.О., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Ткаченко С.Б., Зима А.П. Дисбаланс иммунорегуляторных Th1- и Th2-цитокинов при персистентных вирусных инфекциях . Медицинская иммунология. - 2007. - № 1. - С. 53-60.
38. Gordon M.A., Oppenheim E., Camp N.J. et al. Primary biliary cirrhosis shows association with genetic polymorphism of tumour necrosis factor alpha promoter region // J. Hepatol. – 1999.-V.31.- P. 242-24
39. Delgado, Julio C.; Leung, Jessica Y.; Baena, Andres; Clavijo, Olga P.; Vittinghoff, Eric; Buchbinder, Susan; Wolinsky, Steven; Addo, Marilynn; Walker, Bruce D.; Yunis, Edmond J.; Goldfeld, Anne E. The -1030/-862-linked TNF promoter single-nucleotide polymorphisms are associated with the inability to control HIV-1 viremia. Immunogenetics; Oct 2003, Vol. 55 Issue 7, 497.
40. Fletcher, G J; Samuel, P; Christdas, J; Gnanamony, M; Ismail, A M; Anantharam, R; Eapen, C E; Chacko, M P; Daniel, D; Kannangai, R; Abraham, P Association of HLA and TNF polymorphisms with the outcome of HBV infection in the South Indian population Genes & Immunity; Oct 2011, Vol. 12 Issue 7, 552.
41. Fernandes H1, Koneru B, Fernandes N, Hameed M, Cohen MC, Raveche E, Cohen S. Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients. Transplantation. 2002 Jun 27;73(12):1886-91.
42. Maqsood M. E, Asotra K, Matata BM, Mastana S S. Tumor necrosis factor alpha – 308 gene locus promoter polymorphism: An analysis of association with health and disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease Volume 1792, Issue 3, March 2009, Pages 163–172
43. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook – EN. Skatīts: 02.03.2014. Tiešsaite: <http://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=ne>.
44. Raymond M., Rousset F. 1995 GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism J. Heredity. 1995. Vol. 86. P. 248–249 (<http://ftp.cefe.cnrs.fr/pc/msdos/genepop/>).
45. 10. Court M. H. A simple calculator to determine whether observed genotype frequencies are consistent with Hard–Weinberg equilibrium. 2005, (<http://www.tufts.edu/~mcourt01/documents/court%20lab%20-20hw%20calculator.xls>).

46. Lazzarotto G. B., Kist T. B. L. SANCT–Structural ANalysis of Contingency Tables. 2004. <ftp://ftp.bionet.nsc.ru/pub/biology/dbms>
47. Lazareva A, Eglīte J, Staņēviča V, TNF- α gēna polimorfisms juvenila idiopātiska artrīta pacientiem. Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konference. 2013. 229 lpp.
48. Lurie M, Abramson S, Heppleston A. On the response of genetically resistance and susceptible rabbits to the quantitative inhalation of human-type tubercle bacilli and the nature resistance to tuberculosis. *J Exp Med.* 1952;95:119-34.
49. Flynn JL, Goldstein M, Chan J, Triebold K, Pfeffer K, Lowestein C, et al. Tumor necrosis factor alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 1995;2:251-72.,27 – 70, 71.
50. Newport M, Huxley C, Huston S, Hawrylowicz C, Oostra B, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N. Engl J Med.* 1996;335:1941-5.
51. Milena Nasi, Agostino Riva, Vanni Borghi, Roberto D’Amico, Cinzia Del Giovane, et all. Novel genetic association of TNF- α -238 and PDCD1-7209 polymorphisms with long-term non-progressive HIV-1 infection. *International Journal of Infectious Diseases* Volume 17, Issue 10, October 2013, Pages 845–850.
52. Niro G.A., Fontana R., Gioffreda D. et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and clearance or progression of hepatitis B virus infection // *Liver Int.* 2005;25(6) 1175-1181
53. Nasi M., Riva A., Borghi V. et all. Novel genetic association of TNF- α -238 and PDCD1-7209 polymorphisms with long-term non-progressive HIV-1 infection// *International Journal of Infectious Diseases.* 2013; 17(10): 845–850.

PIELIKUMS

Informācija pacientam

Patreiz nav zāļu HIV infekcijas izārstēšanai, nav arī vakcīnu efektīvai šīs infekcijas profilaksei, bet savlaicīgi pielietojot speciālu ārstēšanas kursu iespējams ievērojami pagarināt laika periodu, kad cilvēks jūtas praktiski vesels, t.i., aizkavēt AIDS stadijas iestāšanos. Sakarā ar strauju HIV infekcijas izplatību, kā viena no visaktuālākām problēmām patreiz ir slimības gaitas prognoze. Dodot piekrišanu izmantot asinis "DNS nukleotīdu sekvenēšana imūnregulējošo HLA II klases un TNF α gēnu reģionā HIV/AIDS pacientiem" zinātniskajā pētījumā tiks izpētīti ģenētiskie marķieri - HLA gēni. Tas savukārt, nodrošinātu iespēju savlaicīgi nozīmēt atbilstošus medikamentus, veikt imūnkorekciju, profilakses pasākumus un tas lielā mērā atvieglos slimnieka stāvokli. Izmantojot DNS tipizēšanu praktiski nekļūdīgi var noteikt HLA alēles asociāciju ar HIV infekciju.

Pacienta iesaistīšanās pētījumā apstiprinājums

Ar šo apstiprinu, ka esmu saņēmusi/is pētījuma skaidrojumu un piekrītu ka manas asinis tiks izmantotas pētījumam "DNS nukleotīdu sekvenēšana imūnregulējošo HLA II klases un TNF α gēnu reģionā HIV/AIDS pacientiem". Es zinu, ka šis pētījums veltīts infekcijas HIV infekcijas asociācijām ar HLA antigēniem. Man ir izskaidrots, ka asins parauga ņemšana notiks vienlaicīgi ar citu analīžu kontroli. Asins paraugs tiks nosūtīts uz RSU Imunoloģijas institūtu. Asins paraugi tiks saglabāti genoma datu bāzē un var tikt izmantoti pētījumiem nākotnē. Man ir tiesības atteikties no dalības šajā pētījumā. Es neiebilstu arī pret anonīmu pacienta datu (t.i. neminot manu vārdu) publikāciju medicīnas žurnālos.

Pacients: _____

(identifikācijas numurs)

Paraksts: _____

Datums: _____

Ārsts: _____

Maģistra darbs „HIV pacientu molekulāri ģenētiskie riska faktori infekcijas attīstības laikā: TNF α gēnu polimorfismu kombinācija ar galveno audu saderības kompleksu” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autore: Jekaterina Aksejeva (paraksts, datums) 19.05.2014.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Dr. Med. Jeļena Eglīte (paraksts, datums) 19.05.2014.

Recenzents: Asoc.prof. Una Riekstiņa (paraksts, datums) __.05.2014.

Darbs iesniegts Medicīnas fakultātē 19.05.2014.

Dekāna pilnvarotā persona: (paraksts)

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

__.05.2014. prot. Nr.

Komisijas sekretāre: