

UNIwersytet Medyczny
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU

Piotr Wobszal

Polimorfizm genów interleukin 12 i 18 w odniesieniu do
powstawania przeciwciał przeciw antygenowi
powierzchniowemu wirusa zapalenia wątroby typu B
u chorych przewlekle dializowanych

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych
wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. n. med. Alicji E. Grzegorzewskiej

Poznań, 2014

Niniejszą pracę dedykuję

Mojej Nauczycielce

Szanownej Pani Profesor

Alicji E. Grzegorzewskiej

Dla Mojej Rodziny

SPIS TREŚCI

| | |
|--|---------|
| 1. Życiorys doktoranta..... | 5 |
| 2. Streszczenie..... | 6 - 11 |
| 3. Artykuł nr 1: „ <i>Interleukin-18</i> promoter polymorphism and development of antibodies to surface antigen of hepatitis B virus in hemodialysis patients” (<i>Kidney and Blood Pressure Research</i> 2012; 35:1-8)..... | 12 - 19 |
| 4. Artykuł nr 2: „Antibodies to hepatitis B virus surface antigen and interleukin 12 and interleukin 18 gene polymorphisms in hemodialysis patients” (<i>BMC Nephrology</i> 2012;13:75)..... | 20 - 29 |
| 5. Artykuł nr 3: „Association of the interleukin-12 polymorphic variants with the development of antibodies to surface antigen of hepatitis B virus in hemodialysis patients in response to vaccination or infection” (<i>Molecular Biology Reports</i> 2013, 40(12): 6899 – 911)..... | 30 - 42 |
| 6. Pisemne oświadczenia współautorów prac o wyrażeniu zgody w wykorzystaniu poszczególnych publikacji w postępowaniu o nadanie tytułu doktora nauk medycznych..... | 43 - 46 |
| 7. Uchwała Komisji Bioetycznej..... | 47 - 49 |

ŻYCIORYS

Piotr Wobszal urodził się 1 września 1987 r. w Poznaniu. W roku 2006 rozpoczął studia medyczne na Akademii Medycznej w Poznaniu, które ukończył w 2012 r. W latach 2008 - 2012 był członkiem Studenckiego Koła Naukowego przy Katedrze i Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W październiku 2012 roku rozpoczął staż podyplomowy w Centrum Medycznym HCP w Poznaniu. We wrześniu 2012 roku zdał z pozytywnym wynikiem Lekarski Egzamin Państwowy. W listopadzie 2013 otrzymał prawo wykonywania zawodu lekarza. W grudniu 2013 roku rozpoczął specjalizację z okulistyki w trybie rezydenckim w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym w Legnicy na stanowisku młodszego asystenta w Oddziale Okulistycznym. W lutym 2014 został słuchaczem Podyplomowego Niestacjonarnego Studium Metodologii Badań Naukowych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Obecnie szczególnym zainteresowaniem doktoranta jest analiza wpływu polimorfizmów genów kodujących wybrane interleukiny i ich receptory na odpowiedź na szczepienie przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B u hemodializowanych chorych.

Piotr Wobszal jest współautorem czterech prac oryginalnych oraz jednej pracy poglądowej, której jest pierwszym autorem, oraz jedenastu streszczeń zjazdowych (dziewięciu zagranicznych i dwóch polskich), w tym pierwszym autorem jednego polskiego streszczenia zjazdowego. IF wymienionych prac wynosi 5.746, a punktacja MN: 73,000.

Doktorant otrzymał list gratulacyjny JM Rektora Uniwersytetu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu za osiągnięcia w pracy badawczej w roku akademickim 2012/2013.

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ

„Polimorfizm genów interleukin 12 i 18 w odniesieniu do powstawania przeciwciał przeciw antygenowi powierzchniowemu wirusa zapalenia wątroby typu B u chorych przewlekle dializowanych”

Doktorant: lek. Piotr Wobszal

Promotor: prof. dr hab. n. med. Alicja E. Grzegorzewska

Praca na podstawie artykułów w ramach programu badawczego: „Rozpowszechnienie i zapadalność na zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV) oraz genetyczne uwarunkowania odpowiedzi na to zakażenie u chorych leczonych powtarzającą hemodializą (IHD)”:

1. „*Interleukin-18 promoter polymorphism and development of antibodies to surface antigen of hepatitis B virus in hemodialysis patients*” (Kidney Blood Press Res. 2012;35:1-8. Wskaźnik Impact Factor ISI: 1.596, Punktacja Min. Nauki: 20.000),

2. „*Antibodies to hepatitis B virus surface antigen and interleukin 12 and interleukin 18 gene polymorphisms in hemodialysis patients*” (BMC Nephrol. 2012;13:75. Wskaźnik Impact Factor ISI: 1.644, Punktacja Min. Nauki: 30.000),

3. „*Association of the interleukin-12 polymorphic variants with the development of antibodies to surface antigen of hepatitis B virus in hemodialysis patients in response to vaccination or infection*” (Mol Biol Rep. 2013, 40(12): 6899 – 911. Wskaźnik Impact Factor ISI: 2.506, Punktacja Min. Nauki: 15.000).

Wstęp

Pacjenci leczenia nerkozastępczo z powodu schyłkowej niewydolności nerek znajdują się w szczególnej grupie ryzyka zakażenia wirusami przenoszonymi drogą krwi, w tym również HBV. Zakażenie HBV skutkuje wytworzeniem przeciwciał przeciw rdzeniowemu antygenowi HBV (*antibodies against HBV core antigen* – anty-HBc), które w klasie IgM świadczą o niedawnym kontakcie z HBV, natomiast w klasie IgG utrzymują się przez całe życie. Korzystnym zejściem zakażenia HBV jest wytworzenie przeciwciał przeciw powierzchniowemu antygenowi HBV (*antibodies against HBV surface antigen* – anty-HBs), które pełnią funkcję przeciwciał ochronnych.

W celu szczepienia podstawowego pacjentów powyżej 20 roku życia leczonych IHD zaleca się podawanie wyższych dawek szczepionki przeciw HBV od stosowanych u osób zdrowych: 3 dawki szczepionki po 40 µg/ml lub 4 dawki podwójne po 20 µg/ml. Wytworzenia ochronnego stężenia anty-HBs (≥ 10 IU/l) nie udaje się uzyskać u około 20% pacjentów, dlatego poszukuje się przyczyn braku lub osłabienia odpowiedzi immunologicznej oraz czynników potencjalizujących odpowiedź na szczepienie.

Wiele cytokin jest zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną w przebiegu zakażenia lub szczepienia przeciw HBV. Wykazano między innymi istotny wpływ stężeń interleukiny (IL) 18 i IL-12, należących do czynników zwiększających wydzielanie interferonu (INF) – γ . Od początku bieżącego stulecia zainteresowanie budzą polimorfizmy genów kodujących IL, mogące mieć związek z wytwarzaniem przeciwciał odpornościowych.

Polimorfizm genetyczny polega na jednoczesnym występowaniu w obrębie populacji genomów zmienności allelicznej, warunkującej, w zależności od umiejscowienia polimorfizmu, różny poziom ekspresji danego genu, różny fenotyp lub różny obraz fragmentów restrykcyjnych DNA. Polimorfizm nie określa zmian rzadkich, kryterium odróżniającym go od mutacji jest częstość występowania rzadszego wariantu powyżej 1%. Do najczęstszych polimorfizmów zaliczamy polimorfizm pojedynczych nukleotydów (*single nucleotide polymorphism* – SNP), utratę lub wtrącenie fragmentów DNA (*deletion/insertion* – D/I) oraz zmienną liczbę tandemowych powtórzeń (*variable number of tandem repeats* – VNTR).

IL-18 jest prozapalną cytokiną o masie 18,3 kDa, kodowaną przez gen *IL-18* zlokalizowany na chromosomie 11q22.2 – q22.3. Wykazano, że IL-18 potencjalizuje odpowiedź zarówno Th-1, jak i Th-2 zależną, poprzez modulowanie wytwarzania INF- γ , IL-4, IL-5 i IL-10 przez limfocyty T CD4(+) u chorych na przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B (WZW-B). Wspólnie z IL-12 promuje wytwarzanie INF- γ w limfocytach typu B i komórkach NK. Ekspresja *IL-18* jest zależna od polimorfizmu -1297C>T (rs360719). Inhibitorowy czynnik transkrypcji OCT-1 łączy się w tym miejscu silnie z allelem T, lecz nie z allelem C, co w przypadku allelu C łączy się z dużo wyższą transkrypcją.

IL-12 jest prozapalną cytokiną o budowie heterodimeru, składającą się z łańcucha lekkiego o masie 35 kDa (podjednostka p35, kodowana przez gen *IL-12A*, znajdujący się na chromosomie 3p12-q13.2) oraz z łańcucha ciężkiego o masie 40 kDa (podjednostka p40, kodowana przez gen *IL-12B*, znajdujący się na chromosomie 5q3-33). IL-12 pełni podobną funkcję do IL-18, potencjalizując jej działanie. Regiony nie ulegające translacji po stronie 3' (*the 3' untranslated regions* – UTRs) wpływają na ilość produkowanej IL-12. Szczególnymi miejscami regulatorowymi są miejsca SNPów *IL-12A* G>A (rs568408) oraz *IL-12B* A>C (rs3212227), których różnice poprzez różne poziomy ekspresji IL-12 mogą wpływać na odpowiedź odpornościową na antygeny HBV.

Celem prac było badanie potencjalnego związku wyżej wymienionych polimorfizmów, zarówno pojedynczo, jak i w różnych wariantach kombinacyjnych, ze zdolnością do wytworzenia ochronnego stężenia anti-HBs w wyniku naturalnego zakażenia HBV lub szczepienia przeciw HBV u chorych leczonych IHD.

Metodyka

Grupa badana i kontrolna

Do udziału w badaniu zaproszono stacje hemodializ w województwie wielkopolskim. Stacje przekazywały do oceny dane demograficzne i posiadane wyniki badań wirusologicznych markerów zakażenia HBV i wirusem zapalenia wątroby typu C (*hepatitis C virus* - HCV) wszystkich hemodializowanych chorych. Brakujące wyniki oraz badania genetyczne wykonywano w ramach prezentowanej pracy.

Badania prowadzono u osób dorosłych (>18 lat), leczonych IHD z powodu przewlekłej choroby nerek (PChN) w stadium 5, bez względu na płeć, rodzaj choroby nerek i chorób współistniejących oraz długości leczenia nerkozastępczego. Ponadto kryterium włączenia do badań stanowiły:

1. Brak objawów infekcji wirusami przenoszonymi przez krew w ciągu 6 miesięcy poprzedzających badanie,
2. Określony panel seromarkerów HBV, odpowiedni do zakwalifikowania pacjenta do jednej z grup:

a) *Kidney Blood Press Res.* 2012;35:1-8.:

- pacjenci z wytworzonymi anti-HBs (grupa I, n = 219) w wyniku szczepienia (podgrupa Ia, n = 125) lub zakażenia naturalnego HBV (podgrupa Ib, n = 94)

- pacjenci bez wytworzonych anti-HBs (grupa II, n = 216) w wyniku szczepienia (podgrupa IIa, n = 176) lub zakażenia naturalnego HBV (podgrupa IIb, n = 40).

b) *BMC Nephrology* 2012;13:75.:

- pacjenci bez wytworzonych anti-HBs (grupa I, n = 207) w wyniku szczepienia (podgrupa Ia, n = 177) lub zakażenia naturalnego HBV (podgrupa Ib, n = 30),

- pacjenci z wytworzonymi anti-HBs (grupa II, n = 311) w wyniku szczepienia (podgrupa IIa, n = 213) lub zakażenia naturalnego HBV (podgrupa IIb, n = 98)

c) *Mol Biol Rep.* 2013, 40(12): 6899 – 911.:

- grupa szczepionych przeciwko HBV (grupa I, n = 602) bez (podgrupa Ia, n = 199) lub z (podgrupa Ib, n = 403) rozwiniętymi anty-HBs,

- grupa zainfekowanych HBV (grupa II, n = 237) bez (podgrupa IIa, n = 55) lub z (podgrupa IIb, n = 182) rozwiniętymi anty-HBs,

3. Spośród pacjentów, u których ujawniono pokrewieństwo genetyczne, tylko jedna osoba mogła uczestniczyć w badaniu.

4. Dostarczona pisemna, świadoma zgoda na udział w badaniu.

Jako pacjenta z wytworzonymi anty-HBs kwalifikowano chorego ze stężeniem anty-HBs ≥ 10 IU/l. Tylko pacjenci z negatywnym wywiadem w kierunku ostrego WZW-B, wykazujący ujemny wynik testu na obecność antygenu powierzchniowego HBV (*hepatitis B virus surface antigen* - HBsAg) oraz ujemny wynik anty-HBc we wszystkich badaniach, byli włączeni do grup chorych szczepionych. Pacjenci nigdy nie szczepieni przeciwko HBV, ze stale utrzymującymi się dodatnimi anty-HBc, również wykazującymi izolowane dodatnie anty-HBc (HBsAg i anty-HBs ujemni, ale anty-HBc dodatni), zostali uznani za zakażonych HBV w przeszłości. Analizowano wszystkie dostępne wyniki serologiczne HBV każdego pacjenta. Jeżeli pacjent posiadał miano anty-HBs ≥ 10 IU/l w przeszłości, ale stracił je z czasem, został uznany za konstytutywnie zdolnego do rozwoju anty-HBs i był włączany do grup z wytworzonymi anty-HBs. Grupy pacjentów szczepionych zawierały chorych hemodializowanych z ujemnym wynikiem przeciwciał anty-HBc, którzy byli szczepieni przeciwko HBV szczepionką rekombinowaną, złożoną z białka S HBsAg (Engerix B, GlaxoSmithKline Biologicals, Belgia; Hepavax-Gene, BIOMED SA, Polska; Euvax B, LG Chemical, Południowa Korea), zgodnie z regułami ustalonymi dla hemodializowanych pacjentów. Miano anty-HBs było sprawdzane po 4-8 tygodniach od ostatniej dawki szczepionki. Miano poniżej 10 IU/l uznawano za niewystarczające do ochrony szczepionego pacjenta i wówczas szczepienie było powtarzane. Jeżeli w trakcie badania doszło do serokonwersji w zakresie anty-HBs, przenoszono pacjenta do podgrupy zdolnej do wytworzenia anty-HBs.

Grupa kontrolna obejmowała 240 dawców krwi rasy kaukaskiej z tego samego rejonu geograficznego (Wielkopolska). Dawcy krwi byli zakwalifikowani do oddania krwi zgodnie z kryteriami przyjętymi przez polskie Ministerstwo Zdrowia. Wszystkie osoby z grupy kontrolnej wykazywały ujemne wyniki testów w kierunku obecności HBsAg i HBV DNA, jak również markerów serologicznych dla infekcji HCV, aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) wynosiła poniżej dwukrotności górnej granicy normy.

Analizę genotypową wykonano odpowiednio, w zależności od tematu badania dla *IL-18* -1297 T>C (rs360719), *IL-12A* G>A (rs568408) oraz *IL-12B* A>C (rs3212227) u wszystkich pacjentów dializowanych i w grupie kontrolnej.

Metody laboratoryjne

HBsAg oraz anty-HBc zostały oznaczone przy użyciu techniki Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA) (AxSYM; Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill., USA). Ta technika została wykorzystana również do oznaczenia anty-HBs oraz anty-HCV (Abbott, Wiesbaden, Germany). HBV DNA oznaczone zostało przy użyciu jakościowego testu przy pomocy Cobas Amplicor HBV Monitor, HCV RNA zostało oznaczone za pomocą Cobas Amplicor Hepatitis C Virus Test, wersja 2.0 (obydwa - Roche Diagnostics Ltd., Rotkreutz, Switzerland). Osoczowa aktywność enzymów wątrobowych została oznaczona przy użyciu rutynowych metod laboratoryjnych.

Metody genotypowania *IL-18*, *IL-12A* oraz *IL-12B*

DNA zostało wyizolowane z leukocytów krwi obwodowej przy pomocy standardowej procedury wysalania.

Fragmenty DNA *IL-12A* 3'UTR G>A (rs568408) zostały zamplifikowane przy użyciu primerów 5'ATGAGGAAACTTTGATAGGATG3' oraz 5'TTCCCTTCTTAGCAATTCATTC3'. Ten

polimorfizm był genotypowany za pomocą wysokorozdzielczej analizy krzywej topnienia (*high-resolution melting curve analysis* – HRM) przy użyciu Light Cycler 480 system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Identyfikacja *IL-12B* 3'UTR A>C (rs3212227) oraz *IL-18* -1287 T>C (rs360719) została dokonana za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy długości fragmentów restrykcyjnych (*polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism* – PCR-RFLP). PCR dla fragmentów *IL-12B* zostało przeprowadzone przy użyciu pary primerów 5'TTAAAGACACAACGGAATAGAC3' oraz 5'TGCTTTATCAACACCATCTCC3'. Powielone fragmenty *IL-12B* po wyizolowaniu wytrawiono endonukleazą TaqI (T/CGA) (New England Biolabs, Ipswich, USA). Po wytrawianiu fragment zawierający allel A pozostał w całości (557bp), natomiast fragment zawierający allel C został podzielony na fragmenty 454 i 103bp. PCR *IL-18* -1297 T>C (rs360719) została przeprowadzona przy użyciu primerów 5'CAACAGTGATTACAAAGGAAGT3' oraz 5'TAAATGGGTAGGAATAAGTGAGA3'. Zamplifikowane fragmenty *IL-18* (474bp) zostały wytrawione endonukleazą NlaIII (CATG) (New England Biolabs, Ipswich, USA). Allel C *IL-18* pozostał w całości, natomiast fragment z allelem T został podzielony na 295bp i 179 bp. Produkty wytrawiania DNA *IL-12B* 3'UTR A>C i *IL-18* -1297 T>C zostały rozdzielone za pomocą elektroforezy na 2% żelu agarozowym i zobrazowane po wybarwieniu bromkiem etydyny.

Metody statystyczne

Częstość genotypów w poszczególnych grupach badanych i grupie kontrolnej została porównana do częstości wynikającej z równowagi Hardy'ego-Weinberga za pomocą testu Fishera. Analiza różnic w poszczególnych genotypów w obrębie badanych grup została przeprowadzona za pomocą testu Fishera w oparciu o hipotetyczny model dziedziczenia:

a) recesywny [*IL-18* -1297 T>C (rs360719): CC vs CT + TT; *IL-12A* 3'UTR G>A (rs568408): AA vs GA + GG; *IL-12B* 3'UTR A>C (rs3212227): CC vs AC + AA]

b) dominujący: [*IL-18* -1297 T>C (rs360719): CC + CT vs TT; *IL-12A* 3'UTR G>A (rs568408): AA + GA vs GG; *IL-12B* 3'UTR A>C (rs3212227): CC + AC vs AA]

c) addytywny: [*IL-18* -1297 T>C (rs360719): CC vs TT; *IL-12A* 3'UTR G>A (rs568408): AA vs GG; *IL-12B* 3'UTR A>C (rs3212227): CC vs AA]

Analizowano również różnice w częstości występowania alleli w poszczególnych grupach za pomocą testu Fishera: [*IL-18* -1297 T>C (rs360719): C vs T; *IL-12A* 3'UTR G>A (rs568408): A vs G; *IL-12B* 3'UTR A>C (rs3212227): C vs A].

Powyższe analizy przeprowadzono dla genotypów polimorfizmów pojedynczych interleukin, jak również dla ich kombinacji.

Za znamienność statystyczną przyjęto wartość $p < 0,05$. Obliczono iloraz szans (*odds ratio* – OR) oraz 95% przedział pewności (*95% confidence intervals* – 95%CI). Moc próby została obliczona przy użyciu testu Fishera za pomocą programu PS – Power and Sample Size Calculation (<http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/main/powersamplesize>).

Pomiędzy badanymi grupami porównano dane demograficzne, kliniczne i laboratoryjne (płeć, wiek, długość leczenia nerkozastępczego, przyczyny schyłkowej niewydolności nerek: nefropatii cukrzycowej, przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek, nefropatii nadciśnieniowej, przewlekłego cewkowo-śródmiąższowego zapalenia nerek, ostrego zapalenia wątroby w wywiadzie, obecności HBsAg, HBV DNA, anty-HBc, przeciwciał przeciw HCV, HCV RNA, ALT, aminotransferazy asparaginowej, γ -glutamylotransaminazy). Normalność rozkładu danych sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilka. Dane dychotomiczne przedstawiono jako procent częstości występowania w danej grupie, dane o rozkładzie normalnym przedstawiono za pomocą średniej i odchylenia standardowego, dane niespełniające warunku rozkładu normalnego za pomocą mediany, wartości minimalnej i maksymalnej. Zależność zmiennych porównano za pomocą testu χ^2 lub testu χ^2 z poprawką Yates'a. Wyniki porównano przy użyciu testu t studenta dla rozkładu normalnego lub testu Manna-Whitney'a dla danych niespełniających rozkładu normalnego.

Do wyznaczenia wpływu częstości poszczególnych genotypów i innych danych demograficznych, klinicznych i laboratoryjnych na rozwój anty-HBs zastosowano regresję krokową wsteczną.

Do analizy możliwego wpływu interakcji międzygenowej danych polimorfizmów na zdolność do wytwarzania anty-HBs zastosowano technikę Multifactor Dimensionality Reduction (MDR wersja 2.0 beta 5).

Wyniki

1. Kidney Blood Press Res. 2012;35:1-8.:

Wykazano znamiennej statystycznie różnicę pomiędzy grupą II (pacjenci bez wytworzonych anty-HBs) w porównaniu do grupy I (pacjenci z wytworzonymi anty-HBs) w zakresie recesywnego modelu dziedziczenia allelu C *IL-18 -1297 T>C* (rs360719): $p = 0,010$; $OR = 0,239$; $95\%CI = 0,078 - 0,728$ oraz w zakresie addytywnego modelu dziedziczenia *IL-18 -1297 T>C* (rs360719): $p = 0,009$; $OR = 0,240$; $95\%CI = 0,078 - 0,738$. W dominującym modelu dziedziczenia allelu C i w porównaniu częstości wystąpienia poszczególnych alleli nie wykazano znamiennej różnicy.

Istotną statystycznie różnicę wykazano pomiędzy grupą II a grupą kontrolną w zakresie recesywnego i addytywnego dziedziczenia allelu C *IL-18 -1297 T>C* (rs360719), odpowiednio $p = 0,002$; $OR = 0,197$; $95\%CI = 0,066 - 0,582$ oraz $p = 0,001$; $OR = 0,191$; $95\%CI = 0,063 - 0,572$. Nie wykazano znamiennej różnicy w zakresie dominującego dziedziczenia allelu C oraz addytywnego modelu dziedziczenia alleli C i T *IL-18 -1297 T>C* (rs360719) pomiędzy grupą II a grupą kontrolną.

Nie wykazano znamiennej statystycznie różnic w zakresie częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli *IL-18 -1297 T>C* (rs360719) w żadnym modelu dziedziczenia pomiędzy grupą I a grupą kontrolną.

W grupie I (pacjenci z wytworzonymi anty-HBs) częściej przyczyną schyłkowej niewydolności nerek było przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek ($p = 0,0083$), rzadziej nefropatia cukrzycowa ($p = 0,0410$), pacjenci byli młodsi ($p = 0,0200$) oraz terapia nerkozastępcza była dłuższa ($p = 0,0149$) niż w grupie II (pacjenci bez rozwiniętych anty-HBs). Wpływ wymienionych wyżej danych na zdolność do wytwarzania anty-HBs wykazano również w analizie krokowej wstecznej.

2. BMC Nephrol. 2012;13:75:

Wykazano znamiennej statystyczną różnicę pomiędzy grupą I (pacjenci bez wytworzonych anty-HBs) a grupą II (pacjenci z wytworzonymi anty-HBs) w zakresie recesywnego modelu dziedziczenia allelu C *IL-18* ($p = 0,009$; $OR = 0,31$).

Wykazano znamiennej statystycznie różnicę pomiędzy grupą I a grupą II:

- w zakresie częstości jednoczesnego występowania genotypu CC *IL-18* z: genotypem GG *IL-12A* ($p = 0,048$; $OR = 0,38$), GA *IL-12A* ($p = 0,035$; $OR = 0,16$), GA lub AA *IL-12A* ($p = 0,034$; $OR = 0,16$) oraz AA *IL-12B* ($p = 0,046$; $OR = 0,37$) [warianty genotypowe o pozytywnym wpływie na zdolność do wytwarzania anty-HBs].

- w zakresie częstości jednoczesnego występowania genotypów TT *IL-18* i AA *IL-12A* ($p = 0,005$; $OR = 10,85$), TC *IL-18* i CC *IL-12B* ($p = 0,042$; $OR = 4,61$) [warianty genotypowe o negatywnym wpływie na zdolność do wytwarzania anty-HBs].

3. Mol Biol Rep. 2013, 40(12): 6899 – 911:

W obrębie grupy I (pacjenci szczepieni przeciw HBV) wykazano znamiennej statystycznie różnicę pomiędzy podgrupą Ia (pacjenci szczepieni przeciw HBV bez wytworzonych anty-HBs) a podgrupą Ib (pacjenci szczepieni przeciw HBV z wytworzonymi anty-HBs) w zakresie: długości leczenia nerkozastępczego ($p < 0,001$; $OR = 1,3$; $95\%CI = 1,2 - 1,5$), częstości przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek jako przyczyny schyłkowej niewydolności nerek ($p = 0,012$; $OR = 2,6$; $95\%CI = 1,2 - 5,4$), częstości heterozygoty GA *IL-12A* ($p = 0,035$; $OR = 1,6$; $95\%CI = 1,0 - 2,5$; nie wykazano znamiennej różnicy po zastosowaniu poprawki Bonferroni'ego), wieku ($p = 0,018$; $OR = 0,98$; $95\%CI = 0,97 - 1,0$), co potwierdzono w analizie krokowej wstecznej. Nie wykazano znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy podgrupą Ia i Ib w zakresie hipotetycznych modeli dziedziczenia

recesywnego, dominującego, addytywnego oraz różnicy w częstości występowania poszczególnych alleli polimorfizmów *IL-12A* i *IL-12B*.

W obrębie grupy II (pacjenci zainfekowani HBV) wykazano znamiennej statystycznie różnicę pomiędzy podgrupą IIa (pacjenci zainfekowani HBV bez wytworzonych anty-HBs) oraz IIb (pacjenci zainfekowani HBV z wytworzonymi anty-HBs) w zakresie: częstości genotypu AC *IL-12B* ($p = 0,002$; OR = 8,0; 95%CI = 2,6 – 24,9) oraz częstości genotypu CC *IL-12B* ($p = 0,011$; OR = 0,1; 95%CI = 0,03 – 0,06). Różnice pozostały znamienne po uwzględnieniu różnicy w zakresie częstości występowania przewlekłego kłębuszkowego zapalenia nerek oraz po poprawce Bonferroni'ego. Wykazano znamiennej różnicę pomiędzy podgrupą IIa i IIb w zakresie częstości jednoczesnego występowania genotypów GG *IL-12A* i AC *IL-12B* ($p = 0,012$; OR = 4,0), GG *IL-12A* i CC *IL-12B* ($p = 0,025$; OR = 0,2) oraz AA *IL-12A* i AA *IL-12B* ($p = 0,049$; OR = 0,09) w porównaniu do częstości występowania pozostałych genotypów.

Wnioski

1. Zdolność do wytworzenia ochronnego stężenia anty-HBs przez chorych leczonych nerkozastępczo jest zależna od polimorfizmu *IL-18 -1297 T>C* (rs360719) i jest prawdopodobnie dziedziczona autosomalnie recesywnie.

2. Polimorfizm *IL-12B 3'UTR A>C* (rs3212227) pojedynczo i wspólnie z polimorfizmem *IL-12A 3'UTR G>A* (rs568408) wpływa na zdolność do wytworzenia ochronnego stężenia anty-HBs w wyniku naturalnego zakażenia HBV u chorych dializowanych.

3. Polimorfizmy *IL-18 -1297 T>C* (rs360719), *IL-12A 3'UTR G>A* (rs568408) oraz *IL-12B 3'UTR A>C* (rs3212227) modulują wzajemnie swój wpływ na zdolność do wytwarzania anty-HBs przez chorych leczonych nerkozastępczo.

4. Polimorfizmy w obrębie immunomodulujących cytokin są częściowym wytłumaczeniem braku odpowiedzi na szczepienie przeciw HBV oraz na naturalną infekcję HBV w postaci wytwarzania anty-HBs u chorych leczonych nerkozastępczo.

