

UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU

Dominik Pajzderski

Warianty polimorficzne *IL13*, *IL4R* i *MCP1*
a wytwarzanie przeciwciał przeciw antygenowi
powierzchniowemu wirusa zapalenia wątroby typu B
u hemodializowanych chorych

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 - 12
3. Artykuł nr 1: „ <i>IL4R</i> and <i>IL13</i> polymorphic variants and development of antibodies to surface antigen of hepatitis B virus in hemodialysis patients in response to HBV vaccination or infection” (<i>Vaccine</i> 2013: Vol. 31, nr 14, s. 1766-1770)	13 - 38
4. Artykuł nr 2: „Monocyte chemoattractant protein-1 gene (<i>MCP1</i> -2518 A/G) polymorphism and serological markers of hepatitis B virus infection in hemodialysis patients” (<i>Med. Sci. Monit.</i> 2014: Vol. 20, s. 1101-1116)	39 - 54
5. Artykuł nr 3: “Polymorphism of monocyte chemoattractant protein 1 (<i>MCP1</i> -2518 A/G) and responsiveness to hepatitis B vaccination in hemodialysis patients” (<i>Pol. Arch. Med. Wew.</i> 2014: Vol. 124, nr 1-2, s. 10-18)	55 - 66
6. Pisemne oświadczenia współautorów prac o wyrażeniu zgody na wykorzystanie poszczególnych publikacji w postępowaniu o nadanie tytułu doktora nauk medycznych	67 - 70
7. Uchwała Komisji Bioetycznej	71 - 73

ŻYCIORYS

Dominik Pajzderski urodził się 13 kwietnia 1981 r. w Poznaniu. Ukończył Szkołę Podstawową nr 70 w Poznaniu i Liceum Ogólnokształcące nr 7 im. Dąbrowki w Poznaniu. W roku 2000 rozpoczął studia medyczne na Akademii Medycznej w Poznaniu, które ukończył w 2008. Przez okres studiów starał się poszerzać swoją wiedzę o medycynę naukową i badawczą. W latach 2003 - 2008 był członkiem SKN przy Klinice Kardiochirurgii w Szpitalu Klinicznym nr 1. W październiku 2008 roku rozpoczął staż podyplomowy w Szpitalu Klinicznym nr 2 w Poznaniu. W listopadzie 2009 roku zdał z pozytywnym wynikiem Lekarski Egzamin Państwowy i otrzymał prawo wykonywania zawodu. Od stycznia 2010 roku rozpoczął specjalizację z chorób wewnętrznych w trybie rezydenckim w Szpitalu Klinicznym nr 2 w Poznaniu na stanowisku młodszego asystenta w Oddziale Klinicznym Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych.

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

Dominik Pajzderski jest współautorem trzech prac oryginalnych, dwóch polskich artykułów kazuistycznych oraz dziewięciu streszczeń zjazdowych (sześciu zagranicznych i trzech polskich), w tym pierwszym autorem jednego polskiego streszczenia zjazdowego. IF wymienionych prac wynosi 6,902, a punktacja MN: 80,00.

Doktorant otrzymał list gratulacyjny Rektora UMP za osiągnięcia naukowe w 2013 roku.

STRESZCZENIE ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

„Warianty polimorficzne *IL13*, *IL4R* i *MCP1* a wytwarzanie przeciwciał przeciw antygenowi powierzchniowemu wirusa zapalenia wątroby typu B u hemodializowanych chorych”

Doktorant: lek. Dominik Pajzderski

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

Rozprawa na podstawie cyklu trzech publikacji, wykonanych 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. „*IL4R* and *IL13* polymorphic variants and development of antibodies to surface antigen of hepatitis B virus in hemodialysis patients in response to HBV vaccination or infection” (*Vaccine* 2013: Vol. 31, nr 14, s. 1766-1770, Wskaźnik Impact Factor ISI: 3.492, Punktacja Min. Nauki: 30.00),
2. „Monocyte chemoattractant protein-1 gene (*MCP1* -2518 A/G) polymorphism and serological markers of hepatitis B virus infection in hemodialysis patients” (*Med. Sci. Monit.* 2014: Vol. 20, s. 1101-1116, Wskaźnik Impact Factor ISI: 1.358, Punktacja Min. Nauki: 20.00),
3. „Polymorphism of monocyte chemoattractant protein 1 (*MCP1* -2518 A/G) and responsiveness to hepatitis B vaccination in hemodialysis patients” (*Pol. Arch. Med. Wew.* 2014: Vol. 124, nr 1-2, s. 10-18, Wskaźnik Impact Factor ISI: 2.052, Punktacja Min. Nauki: 30.00).

Wstęp

Krwio pochodne zakażenie wirusami, w szczególności wirusem zapalenia wątroby typu B (ang. *hepatitis B virus*, HBV), choć coraz rzadsze, nadal stanowi zagrożenie dla pacjentów leczonych nerkozastępczo z powodu schyłkowej niewydolności nerek. Infekcja HBV powoduje wytworzenie przeciwciał przeciw antygenowi rdzeniowemu HBV (ang. *antibodies to HBV core antigen* — anty-HBc), które w klasie IgM świadczą o kontakcie z HBV w niedawnym czasie, natomiast w klasie IgG najczęściej utrzymują się przez całe życie. U większości zakażonych HBV po 6 miesiącach od infekcji pojawiają się przeciwciała przeciw powierzchniowemu antygenowi HBV (ang. *antibodies to HBV surface antigen* — anty-HBs). Pojawienie się anty-HBs jest uważane za korzystną ewolucję zakażenia HBV, ponieważ ich obecność wiąże się z ustaniem replikacji HBV i zakaźności pacjenta.

Skuteczną metodą zapobiegania infekcji HBV są szczepienia ochronne. Zaleca się, aby pacjentom powyżej 20 roku życia leczonym powtarzającą hemodializą (IHD) podawać 3 dawki szczepionki po 40 µg/ml w schemacie 0-1-6 miesięcy lub 4 podwójne dawki po 20 µg/ml w schemacie 0-1-2-6 miesięcy. U około 30% chorych nie udaje się uzyskać ochronnego miana anty-HBs (≥ 10 IU/l). W związku z tym trwają poszukiwania powodów braku lub osłabionej odpowiedzi immunologicznej na szczepienie, jak również czynników zwiększających szansę na odpowiedź poszczepienną.

Wiele cytokin jest zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną w przebiegu zakażenia lub szczepienia przeciw HBV. Od kilkunastu lat badane są polimorfizmy genów kodujących interleukiny (IL), ponieważ mogą one mieć związek z wytwarzaniem przeciwciał odpornościowych.

Polimorfizm genetyczny to jednoczesne występowanie w obrębie populacji różnych odmian tego samego genu. Od umiejscowienia polimorfizmu zależy jego wpływ na poziom ekspresji danego genu, fenotyp lub obraz fragmentów restrykcyjnych DNA. W odróżnieniu od mutacji polimorfizm charakteryzuje się częstością występowania rzadszego wariantu allelu powyżej 1%. Wśród najczęstszych polimorfizmów znajdujemy polimorfizm pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphism* — SNP).

IL-13 jest produkowana w większości przez limfocyty T pomocnicze (ang. *helper*, h), komórki naturalnych zabójców (ang. *natural killer*, NK), limfocyty B i komórki tuczne. Cytokina ta związana jest z kilkoma etapami dojrzewania limfocytów B i ich różnicowania. IL-13 współdziała z IL-4 i ma wpływ na rozwój humoralnej odpowiedzi immunologicznej indukowanej przez limfocyty T. IL-4 jest czynnikiem kluczowym w polaryzacji limfocytów Th do różnicowania w kierunku Th2. IL-4 i IL-13 mogą dzielić wspólny receptor (IL-4R). Jeden z receptorów dla IL-13 jest multimerycznym kompleksem złożonym z IL-4R α i IL-13R α 1. Obie IL używają łańcucha IL-4R α do przekazywania sygnału. Polimorfizm genów kodujących IL-4R (*IL4R*) i IL-13 (*IL13*), poprzez zaangażowanie limfocytów Th1/Th2, może mieć wpływ na rozwój anty-HBs.

Przed opublikowaniem prezentowanej pracy w *Vaccine*, związek pomiędzy wytwarzaniem anty-HBs i wariantami polimorficznymi *IL4R* i *IL13* był oceniany w trzech niezależnych badaniach. Wang i wsp. (*J Immunogenet* 2008: Vol. 35, s. 45-49) nie wykazali istotnych różnic w częstości wariantów polimorficznych *IL4R* Gln55Arg w grupie osób z wytworzoną (84 osoby) i bez wytworzonej (78 badanych) odpowiedzi na szczepienie przeciw HBV. Chen i wsp. (*Vaccine* 2011: Vol. 29, s. 706-711) wykazali, że rzadszy allel C polimorfizmu rs1805015 genu *IL4R α* (Ser503Pro) chronił przed brakiem odpowiedzi na szczepienie przeciwko HBV, a genotyp AA *IL13* rs1295686 wiązał się ze zwiększonym ryzykiem braku odpowiedzi na szczepienie przeciw HBV w populacji chińskiej powyżej 16 roku życia. W badaniu Lina i wsp. (*Clin Chim Acta* 2012: Vol. 413, s. 1194-1198) miano anty-HBs \geq 1000 IU/l u Tajwańczyków (n = 183) było związane z obecnością genotypu AA polimorfizmu rs1805010 w genie kodującym IL-4R.

Białko chemotaktyczne dla monocytów 1 (MCP-1), określane także jako CCL-2 [ang. *chemokine (C-C motif) ligand 2*], jest produkowane przez komórki mezangialne, śródbłonkowe, napływowe komórki jednojądrzaste i cewkowe komórki nabłonkowe. MCP-1 powoduje przesunięcie równowagi limfocytów pomocniczych typu 1 (Th1) i typu 2 (Th2) w kierunku tych ostatnich. Białko to promuje produkcję cytokin Th2, IL-4 i IL-10, a jednocześnie hamuje wytwarzanie cytokin Th1, TNF- α i IFN- γ . MCP-1 podlega zjawisku „up-regulation” przez cytokiny Th2, IL-4 i IL-10. Według niektórych danych, MCP-1 jest zaangażowane w patomechanizm nefropatii cukrzycowej. Zmiany w stężeniu IL-4 i MCP-1 obserwowano podczas leczenia zakażenia HBV pegylovanym interferonem α -2a. Polimorfizm rs1024611 (-2518 A/G) w obrębie części promotorowej genu kodującego MCP-1 (*MCP1*) może zmieniać ekspresję MCP-1. Allel -2518G jest związany ze zjawiskiem „up-regulation” dla wielkości transkrypcji genu dla *MCP-1* i stężenia produktu białkowego. Pacjenci z genotypami AG i GG genu kodującego MCP-1 prezentowali wyższe stężenie MCP-1 niż pacjenci z wariantem AA. Stężenie MCP-1 we krwi jest związane z aktywnością limfocytów pomocniczych. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono doniesień na temat związku *MCP1* z wytwarzaniem anty-HBs w odpowiedzi na szczepienie przeciwko HBV.

Cele rozprawy

1. Ocena polimorfizmu *IL4R* (rs1805015), *IL13* (rs20541) oraz *MCP1* (rs1024611) u chorych leczonych IHD w porównaniu do częstości odpowiednich genotypów u osób zdrowych.
2. Poszukiwanie zależności pomiędzy występowaniem wariantów polimorficznych *IL13*, *IL4R* i *MCP1* a wytwarzaniem przeciwciał anti-HBs w wyniku szczepienia przeciwko HBV, jak też po zakażeniu HBV.
3. Badanie wpływu wariantów polimorficznych *MCP1* na odpowiedź immunologiczną po szczepieniu przeciwko HBV lub zakażeniu HBV u dializowanych chorych na cukrzycę typu 2 i pacjentów niewykazujących tej choroby.

Metodyka

Grupa badana i kontrolna:

Do wzięcia udziału w badaniach zaproszono lekarzy stacji hemodializ z terenu województwa wielkopolskiego, którzy przekazywali dane demograficzne i posiadane wyniki badań wirusologicznych markerów zakażenia HBV i wirusem zapalenia wątroby typu C (ang. *hepatitis C virus* - HCV) hemodializowanych chorych. Brakujące wyniki oraz badania genetyczne wykonywano w ramach prezentowanej pracy. Badania przeprowadzono u dorosłych osób (skończone 18 lat), leczonych IHD z powodu przewlekłej choroby nerek (PChN) w 5 stadium, bez względu na ich 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 pół roku przed badaniem,
2. Określony panel seromarkerów HBV, odpowiedni do zakwalifikowania pacjenta do jednej z grup:

a) *Vaccine* 2013: Vol. 31, nr 14, s. 1766-1770:

- pacjenci szczepieni przeciwko HBV (grupa I, n = 824) bez wytworzonych anti-HBs (podgrupa Ia, n = 190) lub z wytworzonymi anti-HBs (podgrupa Ib, n = 634)

- pacjenci zakażeni HBV (grupa II, n = 241) bez wytworzonych anti-HBs (podgrupa Ia, n = 56) lub z wytworzonymi anti-HBs (podgrupa Ib, n = 185)

b) *Pol. Arch. Med. Wew.*: 2014: Vol. 124, nr 1-2, s. 10-18:

- pacjenci szczepieni przeciwko HBV z wytworzonymi anti-HBs (n = 601), wśród nich podgrupa chorych na cukrzycę typu 2 (n = 175) i podgrupa wolna od tej choroby (n = 426)

- pacjenci szczepieni przeciwko HBV bez wytworzonych anti-HBs (n = 153), wśród nich podgrupa chorych na cukrzycę typu 2 (n = 47) i podgrupa wolna od tej choroby (n = 106)

c) *Med. Sci. Monit.* 2014: Vol. 20, s. 1101-1116:

- pacjenci zakażeni HBV bez wytworzonych anti-HBs (n = 43), wśród nich podgrupa chorych na cukrzycę typu 2 (n = 11) i podgrupa wolna od tej choroby (n = 32)

- pacjenci zakażeni HBV z wytworzonymi anty-HBs (n = 127), wśród nich podgrupa chorych na cukrzycę typu 2 (n = 37) i podgrupa wolna od tej choroby (n = 90).

3. Gdy ujawniono pokrewieństwo wśród pacjentów, tylko jedna ze spokrewnionych osób mogła uczestniczyć w badaniu.

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

Jako pacjenta z wytworzonymi przeciwciałami anty-HBs kwalifikowano chorego z mianem przeciwciał ≥ 10 IU/l. Do grupy chorych szczepionych zostali włączeni tylko pacjenci z negatywnym wywiadem w kierunku HBV, wykazujący ujemny wynik testu na obecność antygeny powierzchniowego HBV (ang. *surface antigen of hepatitis B virus* - HBsAg) oraz ujemny wynik anty-HBc we wszystkich badaniach. Jeśli pacjenci nigdy nie szczepieni przeciwko HBV mieli dodatnie anty-HBc, w tym również izolowane dodatnie anty-HBc (HBsAg i anty-HBs ujemni, ale anty-HBc dodatni), byli uznani za zakażonych HBV w przeszłości. Analizowano wszystkie posiadane wyniki serologiczne HBV. Pacjent, który posiadał miano anty-HBs ≥ 10 IU/l w przeszłości, ale stracił je z czasem, był uznawany za konstytutywnie zdolnego do rozwoju anty-HBs i tym samym włączany do grup chorych z wytworzonymi anty-HBs. Grupy szczepionych zawierały chorych leczonych IHD z ujemnym wynikiem przeciwciał anty-HBc, którzy byli szczepieni przeciwko HBV szczepionką rekombinowaną, złożoną z białka S HBsAg (Euvax B, LG Chemical, Południowa Korea; Hepavax-Gene, BIOMED SA, Polska; Engerix B, GlaxoSmithKline Biologicals, Belgia), zgodnie z zaleceniami dla hemodializowanych pacjentów. W przedziale czasu od 4 do 8 tygodni od ostatniej dawki szczepionki sprawdzano miano anty-HBs. Jeśli wynosiło ono poniżej 10 IU/l, powtarzano szczepienie. Jeżeli w trakcie badania stwierdzono wystąpienie serokonwersji w zakresie anty-HBs, pacjent był przenoszony do podgrupy oznaczonej jako zdolna do wytworzenia anty-HBs. Grupa kontrolna obejmowała 437 dawców krwi rasy kaukaskiej z jednego rejonu geograficznego - Wielkopolski. Dawcy krwi zostali zakwalifikowani do badania według kryteriów przyjętych przez Ministerstwo Zdrowia. Każda osoba z grupy kontrolnej wykazywała ujemne wyniki testów w kierunku obecności HBsAg i HBV DNA, jak również markerów serologicznych infekcji HCV. U wszystkich pacjentów hemodializowanych i w grupie kontrolnej wykonano analizę genotypową - w zależności od tematu badania dla *IL4-R* (rs1805015), *IL13* (rs20541) oraz *MCP1* -2518 A/G (rs1024611).

Metody laboratoryjne

HBsAg oraz anty-HBc oznaczono przy użyciu techniki Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA) (AxSYM, Abbott Laboratories, USA). Tą samą metodę wykorzystano do oznaczenia anty-HBs oraz anty-HCV (Abbott, Niemcy). HBV DNA oznaczone zostało przy użyciu jakościowego testu przy pomocy HUMAN HEPATITIS B VIRUS (Genekam Biotechnology AG, Niemcy; limit detekcji 250 kopii/ml). HCV RNA zostało oznaczone za pomocą Cobas Amplicor Hepatitis C Virus Test, wersja 2.0 (Roche Diagnostics Ltd., Szwajcaria).

Metody genotypowania *IL4-R*, *IL13*, *MCP1*

DNA zostało wyizolowane z limfocytów krwi przy pomocy standardowej procedury wysalania. Warianty polimorficzne genów *IL4R* (rs1805015) oraz *IL13* (rs20541) zostały określone za pomocą wysokorozdzielczej analizy krzywej topnienia (ang. *high resolution melting curve analysis* – HRM) przy użyciu Light Cycler 480 system (Roche Diagnostics, Niemcy). Fragmenty DNA *IL4R* zostały zamplifikowane przy użyciu primerów 5'AACCCTGCTTACCGCAGCTT3' oraz

5'TCGGGTTCTACTTCTCCAGGT3', fragmenty *IL13* przy użyciu 5'CCAGTTTGTAAGGACCTGCT3' oraz 5'CCTGTCTCTGCAAATAATGATG3'.

Warianty polimorficzne *MCP1* (rs 1024611) zostały określone przy pomocy łańcuchowej reakcji polimerazy – polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism*, PCR – RFLP). Fragmenty *MCP1* zostały zamplifikowane z wykorzystaniem primerów 5'CTTCCCTGTGTGTC3' oraz 5'TTACTCCTTTCTCCCAACC3'.

W ramach kontroli jakości badanych polimorfizmów losowo wybrane próbki były ponownie genotypowane z użyciem tych samych metod oraz bezpośrednio sekwencjonowane za pomocą ABI Prism™, BigDye™, Terminator Cycle Sequencing kit oraz ABI Prism 3730 capillary sequencer (Applied Biosystems; USA).

Metody statystyczne

Częstość genotypów w poszczególnych grupach badanych i grupie kontrolnej została porównana do częstości wynikającej z równowagi Hardy'ego-Weinberga za pomocą testu χ^2 . Analiza różnic poszczególnych genotypów w obrębie badanych grup została przeprowadzona za pomocą testu χ^2 lub testu dokładnego Fishera. Za znamienność statystyczną przyjęto wartość $p < 0,05$. Obliczono iloraz szans (ang. *odds ratio* – OR) oraz 95% przedział pewności (ang. *confidence interval* – CI). Moc próby została obliczona przy użyciu testu Fishera za pomocą programu PS Power and Sample Size Calculation (<http://biostatmc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/main/powersamplesize>). Analiza wpływu badanych polimorfizmów została przeprowadzona za pomocą testu χ^2 dla trendu (p_{trend}) oraz w odniesieniu do genotypów ($p_{\text{genotyping}}$). W przypadku możliwości wpływu na istotność wielokrotnych porównań danych stosowano poprawkę Bonferroniego.

Pomiędzy badanymi grupami porównano dane demograficzne, kliniczne i laboratoryjne (wiek, płeć, długość leczenia nerkozastępczego, główne przyczyny schyłkowej niewydolności nerek, obecność HBsAg, HBV DNA, anty-HBc, HCV RNA, przeciwciał przeciw HCV, aktywności ALT, AST, GGT). 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, niespełniające warunku rozkładu normalnego – za pomocą mediany, wartości minimalnej i maksymalnej. Zmienne dychotomiczne porównano za pomocą testu χ^2 lub testu χ^2 z poprawką Yatesa. Zmienne ciągłe porównano przy użyciu testu t Studenta dla rozkładu normalnego lub testu Manna-Whitne'a dla danych niespełniających warunków rozkładu normalnego.

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

Oprogramowanie PLINK (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) wykorzystano do analizy możliwego wpływu interakcji międzygenowej danych polimorfizmów na zdolność do wytwarzania anty-HBs.

Wyniki

1. *Vaccine* 2013: Vol. 31, nr 14, s. 1766-1770:

Pacjenci leczeni IHD nieodpowiadający na szczepienie w porównaniu do odpowiadających byli starsi ($p = 0,0001$), ich terapia nerkozastępcza trwała krócej ($p < 0,0001$), częściej wykazywali nefropatię cukrzycową ($p = 0,016$), a rzadziej przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek ($p = 0,0005$). Pacjenci leczeni IHD, którzy nie odpowiedzieli na szczepienie przeciwko HBV, nie różnili się częstością wariantów polimorficznych *IL4R* (TT 72,7%, CT 22,6%, CC 4,7%) oraz *IL13* (CC 59,0%, CT 34,2%, TT 6,8%) od pacjentów, którzy odpowiedzieli na szczepienie przeciwko HBV (*IL4R* TT 68,8%, CT 27,3%, CC 4,7%; *IL13* CC 55,5%, CT 38,5%, TT 6,5%). Pacjenci leczeni IHD, którzy nie wytworzyli anty-HBs pomimo infekcji HBV nie różnili się częstością wariantów polimorficznych *IL4R* (TT 67,8%, CT 26,8%, CC 5,4%) oraz *IL13* (CC 60,7%, CT 33,9%, TT 5,4%) względem pacjentów, którzy wytworzyli anty-HBs w wyniku infekcji HBV (*IL4R* TT 65,4%, CT 30,8%, CC 3,8%; *IL13* CC 60,5%, CT 34,6%, TT 4,9%). Wykluczenie pacjentów z chorobami obciążającymi układ odpornościowy nie wpłynęło na istotność różnic.

2. *Pol. Arch. Med. Wew.* 2014: Vol. 124, nr 1-2, s. 10-18:

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w częstości występowania wariantów polimorficznych *MCP1* pomiędzy grupą pacjentów leczonych IHD z cukrzycą typu 2 i grupą pacjentów leczoną IHD bez tej choroby. Podział pacjentów leczonych IHD (wszyscy, cukrzyca, nie cukrzyca) na grupy odpowiadających i nieodpowiadających na szczepienie przeciwko HBV również nie wykazał istotnych statystycznie różnic w rozkładzie odpowiednich genotypów i częstości występowania alleli *MCP1* pomiędzy każdą z podgrup pacjentów leczonych IHD i grupą kontrolną, a także pomiędzy tymi podgrupami. Wyniki graniczące z istotnością uzyskano porównując pacjentów leczonych IHD nieodpowiadających na szczepienie z grupą kontrolną ($p_{\text{trend}} = 0,073$) oraz porównując podgrupę wolną od cukrzycy pacjentów leczonych IHD nieodpowiadających na szczepienie z grupą kontrolną ($p_{\text{trend}} = 0,099$). W tych przypadkach powtórzono analizę statystyczną z pominięciem 20 pacjentów leczonych IHD z rozpoznaniem chorób poważnie osłabiającymi układ immunologiczny. Takie porównanie nie wykazało istotnego wpływu polimorfizmu *MCP1* na wytwarzanie anty-HBs.

3. *Med. Sci. Monit.* 2014: Vol. 20, s. 1101-1116:

Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w częstości występowania wariantów polimorficznych *MCP1* pomiędzy hemodializowanymi pacjentami anty-HBc pozytywnymi i grupą kontrolną, niezależnie od występowania u nich cukrzycy typu 2, czy obecności anty-HBs. Podobnie istotnych różnic nie stwierdzono pomimo posegregowania pacjentów anty-HBc pozytywnych na anty-HBs negatywnych i anty-HBs pozytywnych. Nie było również istotnej statystycznie różnicy w porównaniu pacjentów leczonych IHD z izolowanym dodatnim wynikiem anty-HBc i pacjentami leczonymi IHD po spontanicznym ustąpieniu infekcji HBV. W badaniu pilotażowym istotne statystycznie różnice w częstości rzadszego allelu *MCP1* wykazano pomiędzy grupą pacjentów HBsAg pozytywnych, która reprezentowała nosicieli HBV, a pacjentami HBsAg negatywnymi i anty-HBs pozytywnymi, u których nastąpiło spontaniczne ustąpienie infekcji HBV ($p_{\text{trend}} = 0,021$). Wykazano istotnie częstsze ($p = 0,033$) występowanie allelu G w grupie pacjentów zakażonych HBV.

Wnioski

1. Pacjenci leczeni IHD nie różnią się istotnie od osób zdrowych częstością występowania polimorfizmów *IL4R*, *IL13* oraz *MCP1*.
2. U pacjentów leczonych IHD warianty polimorficzne *IL4R*, *IL13* i *MCP1* nie są związane z wytwarzaniem anty-HBs – niezależnie od tego, czy immunizacja prowokowana jest szczepieniem przeciwko HBV, czy zakażeniem HBV.
3. Występowanie cukrzycy typu 2 powikłanej nefropatią cukrzycową nie wpływa u chorych leczonych IHD na istnienie zależności pomiędzy częstością wariantów polimorficznych *MCP1* a wytwarzaniem anty-HBs w przypadku zaszczepienia przeciwko HBV lub po zakażeniu HBV.