**Медицински университет - София**

**Медицински факултет**

**Катедра по Клинична лаборатория и клинична имунология**

**Атанаска Илиева Георгиева**

# Проучване на имуногенетични маркери свързани с протичането на хепатит В вирусна инфекция

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен "Доктор"**

**Научен ръководител**
**Проф. д-р Елисавета Наумова, дмн**

**Официални рецензенти:**

**Проф. д-р Мариана Атанасова Мурджева, дмн**

**Проф. д-р Константин Георгиев Чернев, дмн**

Докторска програма „Имунология"
**София, 2016**

# ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

| | |
|---|---|
| HBV-ДНК | ДНК на хепатитен В вирус |
| HCC | Хепатоцелуларен карцином |
| CHB | Хронична инфекция с хепатит В |
| HLA | Човешки левкоцитни антигени |
| MHC | Главен комплекс на тъканната съвместимост |
| NK | Естествените клетки убийци |
| KIR | Имуноглобулин-подобни рецептори при NK клетките |
| PCR | Полимеразна верижна реакция |
| PCR-SSP | Полимеразна верижна реакция със секвенционно-специфични праймери |
| Real Time PCR | Полимеразна верижна реакция в реално време |

# Съдържание


**I. ВЪВЕДЕНИЕ ..... 4**

**II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ ..... 6**

**III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ ..... 6**

1. Материали ..... 6
2. Методи ..... 7

*2.1 Изолиране на геномна ДНК ..... 7*
*2.2 Изолиране на вирусна ДНК ..... 7*
*2.3 HLA-клас I и клас II генотипизиране с ниска разграничителнаспособност чрез PCR-SSP метод ..... 8*
*2.4 Определяне на KIR полиморфизъм. ..... 8*
*2.5 Определяне на KIR HLA клас I лиганден полиморфизъм ..... 8*
*2.6 Определяне на HBV генотип ..... 8*
*2.7 Количествено определяне на HBV-ДНК, чрез Real Time PCR метод ..... 9*
*2.8 Статистически методи ..... 9*

**IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ ..... 10**

1. Въвеждане, оптимизиране и валидиране на „ in house" Real-Time PCR за количествено определяне на HBV-ДНК. ..... 10

*1.1 Аналитична специфичност ..... 10*
*1.2 Линейност и аналитична чувствителност ..... 11*
*1.3 Характеристики на PCR-ната реакция ..... 12*
*1.4 Точност ..... 14*
*1.5 Валидиране на метод за количествено определяне на HBV-ДНК, чрез използване на real time PCR. ..... 16*

2. Проучване връзката на HLA клас I и клас II генен полиморфизъм с предразположеността към хепатит B вирусната инфекция и отговора към интерферон и нуклеот(з)идни аналози при HBV инфекрирани пациенти. Изследване на вирусния генотип. ..... 17
3. Проучване на HLA клас I (-A и -B ) и клас II (-DR) генетичен полиморфизъм при хронично инфектирани с HBV и спонтанно оздравели пациенти. ..... 23
4. Проучване на KIR генен полиморфизъмпри хронично инфектирани и спонтанно оздравели пациенти. ..... 30

*4.1 KIR гени/псевдогени ..... 31*
*4.2 KIR профили ..... 35*

***5. Проучване на KIR / HLA лиганден полиморфизъм при група здрави индивиди от българската популация, хронично инфектирани и спонтанно оздравели пациенти.*** ..... 43

*5.1 KIR лиганди ..... 43*
*5.2 KIR/ HLA лигандни комбинации ..... 46*

**V. ОБОБЩЕНИЕ ..... 53**

**VI. ИЗВОДИ ..... 55**

**VII. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИ ..... 56**

1. Теоретични (научно-експериментални) приноси ..... 56
2. Приложни (научно-практически) приноси ..... 56

# I. ВЪВЕДЕНИЕ

Инфекцията с хепатитен вирус В (HBV) представлява глобален социален проблем. При приблизително една трета от населението на света се установяват вирус-индуцирани антитела срещу антигените на вируса. От 350 до 400 милиона индивида са носители на повърхностния HBV антиген HBsAg(1). Точните патогенетични механизми, отговорни за хронифицирането на инфекцията, все още не са установени. Голяма част от проучванията са концентрирани върху ролята на имунната система и в частност върху гените на вродения и адаптивен имунен отговор. Приема се, че самият HBV не е директно цитопатогенен. Имунният отговор на гостоприемника срещу вирусните антигени може да доведе както до изчистване на вируса, така и до разрушаване на инфектираните хепатоцити по време на HBV инфекцията. При хронична инфекция чернодробното увреждане се регулира най-вече от генетични фактори, фактори от страна на вируса (напр. вирусни мутации), както и такива от външната среда. Понастоящем се приема, че генетичните фактори са определящи за хронифицирането на инфекцията с HBV, но те могат да играят роля и при лечението й и при ваксиниране. Ключов момент в регулацията на оптимален имунен отговор срещу вирусната инфекция имат HLA клас I и клас II молекулите, които представят антигените на CD8+ клетки, разпознаващи инфектираните хепатоцити, експресиращи вирусните антигени на CD4+ Т клетки. Рестриктираните от HLA клас I и клас II Т клетъчни отговори срещу антигените на вируса са силни, поликлонални и мултиспецифични при пациенти с остра инфекция и водят до успешно елиминиране на вируса. Тези отговори обаче са относително слаби и с по-ограничена специфичност при болните с хронична инфекция, което е основна причина за персистирането на вируса по време на HBV инфекцията. Известно е, че различните HLA алотипи представят с различна ефективност вирусните епитопи на Т клетките. Това предполага асоциации на определени HLA алели с клирънса на вируса или персистирането на вирусната инфекция.

NK клетките убиват директно вирусно-инфектираните и трансформирани клетки, като по този начин имат директен антивирусен ефект и протектират срещу напредването на чернодробното увреждане и развитие на хепатоцелуларен карцином. Контролът за NK клетъчното

активиране и убиване на прицелните клетки представлява доста комплексна система от разнообразни инхибиращи и активиращи рецепторно-лигандни взаимодействия, улавящи промените в експресията на MHC молекулите. Основните разпознавателни механизми на NK клетките при хората, медииращи инхибиране или активиране на NK клетъчната функция, са свързани с експресията на рецепторите от имуноглобулиновото суперсемейство (killer immunoglobulin-like receptors – KIRs), както и на лигандите им, които за повечето KIRs са специфични мотиви на HLA клас I молекулите.

Полиморфизмът на гените на вродения и придобит имунен отговор, контролиращи и регулиращи имунната реактивност, е предпоставка която обеснява в голяма степен вариабилността в протичането и изхода от вирусната инфекция. Понастоящем съществуват доказателства за асоциации на тези гени с оздравяването и/или хронифицирането на инфекцията с HBV.

Всичко това ни даде основание да се насочим към проучване на имуногенетични маркери, които биха могли да играят роля за оздравяването, хронифицирането и начина на протичане на инфекцията в българската популация на пациентис HBV инфекция.

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**Целта** на настоящата дисертация е да се проучи полиморфизма на някои гени на вродения и придобит имунитет (HLA, KIR, KIR/лиганди) и вирусния генотип при HBV инфекция в българската популация.

За постигане на целта си поставихме следните **задачи:**

1. Въвеждане, оптимизиране и валидиране на методика за количествено определяне на HBV-ДНК, чрез Real time -PCR. Въвеждане на методика за генотипизиране на HBV,чрез nested-PCR изследване на вирусния генотип при хронично инфектирани пациенти от българската популация.
2. Количествено определяне на HBV-ДНК при лечение на хронично инфектирани пациенти. Оценяване влиянието на HLA клас I и клас II генен полиморфизъм за вирусната репликация при хронично инфектирани пациенти преди, по време и след приключване на антивирусно лечение.

3. Проучване на асоциацията на HLA клас I (-A и -B ) и клас II (DR) гените с хепатит B инфекция.

4. Проучване ролята на KIR генен полиморфизъм при хепатит B вирусна инфекция.

5. Проучване на KIR/лиганден полиморфизъм при хепатит B вирусна инфекция.

## III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. Материали

Изследвани бяха общо 139 пациенти, от които 118 с хроничен хепатит B (84 мъже и 34 жени на възраст от 18 до 73 [44±27] години) и 20 индивида, оздравели от остър хепатит B (10 мъже и 10 жени на възраст от 31 до 58 [44±13.5] години). Подборът на пациентите, включени в проучването, бе извършен в Клиниката по гастроентерология на УМБАЛ ”Александровска”

и в Инфекциозно отделение на ВМА гр. София, чрез комплексна оценка на съвкупност от включващи и изключващи критерии. Диагнозата на хроничната хепатит В инфекция е основана въз основа на препоръките на Американската асоциация за проучване на чернодробни болести. Петдесет и шест пациента са новодиагностицирани (скрининг) и нелекувани към момента на проучването. От останалите 62 пациента с хроничен хепатит 20 са на терапия с Пегинтерферон алфа-2а, а 42 – с нуклеозидни/нуклеотидни аналози (инхибитори на обратната транскриптаза).

В проучването се включени 126 случайно подбрани неродствени здрави индивиди от българската популация (58 мъже и 68 жени на възраст от 24 до 70 [46±12] години) при изследване на KIR/лиганден полиморфизъм и 204 (110 мъже и 96 жени на възраст от 22 до 73 [48±9] години) при изследване на HLA полиморфизма. Контролите са съпоставими по пол и възраст с изследваните болни, без фамилна анамнеза за наследствени заболявания, с нормална чернодробна функция и отрицателни серологични маркери за хепатитни вирусни инфекции. Мотивът за включването на контролна група от здрави индивиди беше, да се оцени, дали съществуват имунно-генетичните профили (маркери), благоприятстващи хронифицирането на заболяването при болните от хепатит В, които да са свързани с нарушени защитни механизми.

Всички включени в проучването пациенти и здрави индивиди са подписали информирано съгласие.

## 2. Методи

### 2.1 Изолиране на геномна ДНК

Изолирахме геномна ДНК от периферна венозна кръв, взета върху антикоагулант-3,8 M Na - цитрат с автоматизирана система за ДНК (iPrep™ Purification Instrument, Invitrogen, USA) с готов набор Prep PureLink® gDNA™ Blood. Технологията се основава на използването на магнитни частици със силиконова повърхност, свързващи ДНК откръвните проби и последващо елуиране на ДНК, чрез магнитен сепаратор.

### 2.2 Изолиране на вирусна ДНК

Изолирахме вирусна ДНК от серум чрез QIA viral mini кит (Qiagen). Методът се основава на лизиране на клетките и задържане, чрез центрофугиране на отделената ДНК върху силиконови мембрани в QIA amp колоните. След неколкократно измиване с оглед премахване на

контаминиращи агенти и потенциални PCR инхибитори, ДНК се елуира от колоната и може да бъде използвана директно.

### 2.3 HLA-клас I и клас II генотипизиране с ниска разграничителнаспособност чрез PCR-SSP метод.

За изследването използвахме кит на фирмата Protrans medizinische diagnostische Germany (Protrans HLA SSP). PCR-SSP методът се базира на принципа, че напълно комплементарни на ДНК матрицата праймери ще се използват по-ефективно в първите критични цикли на PCR реакцията в сравнение с праймери, съдържащи в 3` края си един или няколко различни нуклеотида. Taq полимеразата не притежава 3`-5` екзонуклеазна активност и поради това праймер с един или няколко несъвпадащи нуклеотида в 3` края не може да бъде използван ефективно.

### 2.4 Определяне на KIR полиморфизъм.

KIR генотипизирането се осъществи, чрез PCR-SSP, който беше валидиран в Клиниката по клинична имунология, използвайки търговски китове Olerup SSP® KIR Genotyping Kit (Olerup SSP AB, Sweden) и PEL-FREEZ® KIR Genotyping Kit (Dynal Biotech, USA).

### 2.5 Определяне на KIR HLA клас I лиганден полиморфизъм

За типизиране по HLA-C локуса използвахме търговски кит (Olerup SSP® "HLA-C low resolution"), съдържащ 32 праймерни смеси, позволяващи определянето на 14 специфичности.

За определяне на KIR HLA лигандните специфичности се използвахме два подхода:

1. Определяне на HLA клас I лигандни групи, чрез програма "KIR ligand calculator" (http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/kir/ligand_calculator.cgi), използвайки данните от HLA клас I генотипизиране с PCR-SSP, който е валидиран и се използват рутинно в Клиника по клинична имунология, УМБАЛ „Александровска" .
2. Директно определяне, чрез PCR-SSP метод с готов търговски кит (Olerup SSP® "KIR HLA Ligand SSP typing", Sweden).

### 2.6 Определяне на HBV генотип

За определяне наHBV генотипа използвахме PCR-SSOP метод с търговски кит INNO-LIPA HBVGenotyping. Китът е пригоден за

индентификация на генотипи: A, B, C, D, E и H, чрез детекция на типово-специфични последователности в HBV полимеразния ген- домейн B до C.

### 2.7 Количествено определяне на HBV-ДНК, чрез Real Time PCR метод

За реакцията използвахме реактиви на фирмата Applied Biosystams за Taq Man анализ-Taq Man Universal Master Mix(2x), прав праймер, обратен праймер, Taq Man probe (сонда).След изолиране на ДНК от пробата, се подготвя амплификационна реакция, която съдържа: PCR микс (dNTPs,буфер, Taq Pol, $MgCI_2$), прав праймер, обратен праймер, флуоресцентна сонда (проба) и ДНК темплейт. За построяването на стандартна крива се използват стандарти Clonit, Milano представляващи цялостен вирусен геном клониран в плазмид.

### 2.8 Статистически методи

Сравнителният анализ в болест-асоциативно проучване между болните от хепатит B вирус и здравите неродствени индивиди беше осъществен, чрез $\chi 2$ тест и Fisher exact тест с използване на програмата SPSS v.16.0. При статистически значими разлики между бинарни величини в модела случай/контрола, допълнително беше определена стойността на odd ratio (OR) в 95% интервал на достоверност (confidencial interval, CI). OR измерва относителния риск в зависимост от броя на засегнатите индивиди (заболели) изложени на анализирания фактор. OR=1 означава, че двете групи са с еднакъв риск за болестта в зависимост от анализирания фактор, OR<1 маркира фактора като протективен, докато OR > 1 е показател за рисков фактор.

HLA алелни честоти са анализирани, чрез maximum likelihood анализ с използване на програма Arlequin 1.1. Най-вероятните хаплотипи са определени, чрез EM алгоритъм с използване на същата статистическа програма. Сравненията между трите изследвани групи – оздравели пациенти, пациенти с хронична инфекция и здрава контролна група от българската популация са извършени чрез Chi square или Fisher exact тест, където е необходимо.

Генните честоти за: KIR, HLA-B Bw4 и HLA-Cw група 1 и 2 лиганди, и KIR/лигандни двойки бяха определени за пациенти и контроли, чрез директно броене с използване на статистическа програма SPSS v.16. Индивидуалните KIR хаплотипи и генотипи бяха определени съобразно международната KIR номенклатура:

http://www.allelefrequencies.net/kir6001a.asp, а честотното им разпределение във всяка отделна група, чрез изброяване.

# IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

## *1. Въвеждане, оптимизиране и валидиране на „ in house" Real-Time PCR за количествено определяне на HBV-ДНК.*

За оценка на лабораторния метод и неговата изпълнение, трябва да бъдат определени няколко параметри: аналитична специфичност, аналитична чувствителност, точност, линейност, PCR-ефективност, граница на детекция, граница на количествено определяне (231).

### 1.1 Аналитична специфичност

Аналитична специфичност се дефинира, катоспособност на метода да определя негативни резултати в съответствие с негативни, получени от референтен метод.

За валидиране на Real Time PCR, трябва да се използват референтни материали с известни точни концентрации. Клинични проби могат да се използват за валидиране, ако се използва втори метод. Специфичността на олигонуклеотидите (праймери и сонда) трябва да се провери по време на разработване на метода, за да се определи, че методът реагира само с целевата последователност (консервативна част от генома на HBV). Използваните от нас сонда и праймерите имат 100% хололожност с широк обхват клинично-свързани референтни последователности, базирани на задълбочен биоинформатичен анализ. Комплектът праймери и сонда за количествено определяне на HBV-ДНК е разработен и оптимизиран от фирмата производител Applied Biosystems. В нашето изследване ние използвахме предлаганите праймери и сонда като въведохме и валидирахме метода в конкретните лабораторни условия за определяне на HBV-ДНК при мониториране на хронично болни пациенти. Праймерите са проверени от производителя за хомология с други известни патогени чрез сравнителен анализ в съществуващата база данни.

Въпреки това, допълнително проверихме тяхната специфичност, като използвахме положителни проби за CMV, EBV, BKV. Нито един от тях не показа фалшиво положителна амплификация. За да изключим неспецифична амплификация се използваха десет серума от лица ваксинирани срещу HBV, положителни за anti-HBs, както и проба на

фирмата Affymetrix отрицателна за HBV. Не се установи наличие на фалшиво положителни резултати. Отрицателни проби от ВОК, се определиха като негативни.

### 1.2 Линейност и аналитична чувствителност

Аналитична чувствителност (Лимит на детекция - LOD) е най-ниската концентрация или количество на аналита, при което ≥ 95% от пусканията дават положителни резултати при последователни серийни разреждания на международен референтен материал, калиброван референтен материал или проба тествана в рутинни лабораторни условия (COI-95%) (231).

За определяне на аналитичната чувствителност на PCR анализ в реално време се използва калиброван референтен материал (с висок титър на HBV-ДНК - $1.10^6$ copies/ml). С цел да се направи оценка на линейния диапазон, проба с концентрация -$5.10^6$ copies/ml се разреди в серия от десетократни разреждания -$5.10^6$,$5.10^5$, $5.10^4$, $5.10^3$, $5.10^2$, $5.10^1$, 5 copies/ml (Табл. 7.) Всяко разреждане се тества трикратно. Получихме стандартна крива с корелационен коефициент 0,99868 и наклон -3.5, интерсепт -43,2. Параметрите са в допустимите граници за количествен real time HBV(233).

Линейността на изследваният от нас метод се определя от линейния обхват за количествено определяне на вируснатата ДНК. Характеризира се с регресионен коефициент след линейна регресия.Най-ниските и най-високите концентрации на аналита, които могат да бъдат открити с приемлива точност в рутинни лабораторни условия, определят линейния обхват на метода. (Лимит на количествено определяне- LOQ).Въз основа на направените анализи се установи, че аналитичната чувствителност на метода е 5 copies/ml, а линейният диапазон на метод в границите – 5 ÷$5.10^6$ copies/ml (Табл7.).

**Табл. 7 Диапазон на количествено определяне**

| Разреждане на HBV-ДНК | Прагов цикъл (Th) | Вирусен товар в copies/ml | Титърна група |
|---|---|---|---|
| **$10^0$** | 22,5 | 5 000 000 | висока |
| **$10^{-1}$** | 25,8 | 500 000 | |
| **$10^{-2}$** | 29,2 | 50 000 | |
| **$10^{-3}$** | 33,2 | 5 000 | ниска |
| **$10^{-4}$** | 35 | 500 | |
| **$10^{-5}$** | 37.9 | 50 | |
| **$10^{-6}$** | 41 | 5 | много ниска |

### 1.3 Характеристики на PCR-ната реакция

#### 1.3.1 Амплификационна ефективност

За определяне на вирусната концентрация използвахме абсолютно количествено определяне, който е метод използващ стандартна крива. Показателят амплификационна ефектичност може да се определи от стандартна крива, построена от десетократни серийни разреждания на вирусна ДНК в рамките на динамичния обхват на метода. Всяко разреждане се изследва трикратно. Стандартната крива се анализира 10 пъти в различни дни. Ct- стойността на разрежданията се чертаят срещу log от концентрацията на пробите или броя на копията. Наклона се изчислява чрез линейна регресия, в идеалния случай 3,329 отговаря на PCR-ефективност 1. При ефективност равна на едно, броя на целевите молекули се удвоява точно след всеки цикъл. Често ефективността се изразява като процентна стойност. Наклон между 3,1÷3,6 и ефективност съответно между 90%÷100% се считат за приемливи. Ефективността (E) -зависи от много фактори: PCR-инхибитори, PCR-усилватели, ДНК-концентрация, дължина на ампликоните, вторична структура на праймерите

Определя се, чрез следната формула:

$E = (10^{-1 / \text{наклон}} - 1) \times 100$

$E = 10^{(-1/-3.536423)} - 1 \times 100$

$= (10^{0.2828} - 1) \times 100$

$= (1.91778 - 1) \times 100$

$= 0.9178 \times 100$

$= 91.78\%$

#### 1.3.2 Наклон на стандартната крива

Наклонът на стандартна крива при real time PCR, често се използва за оценка на ефективността на амплификацията. Стандартна крива графично се представя като полулогаритмична регресионна линия на Ct стойността срещу логаритъм от вложената нуклеинова киселина. Сто процента

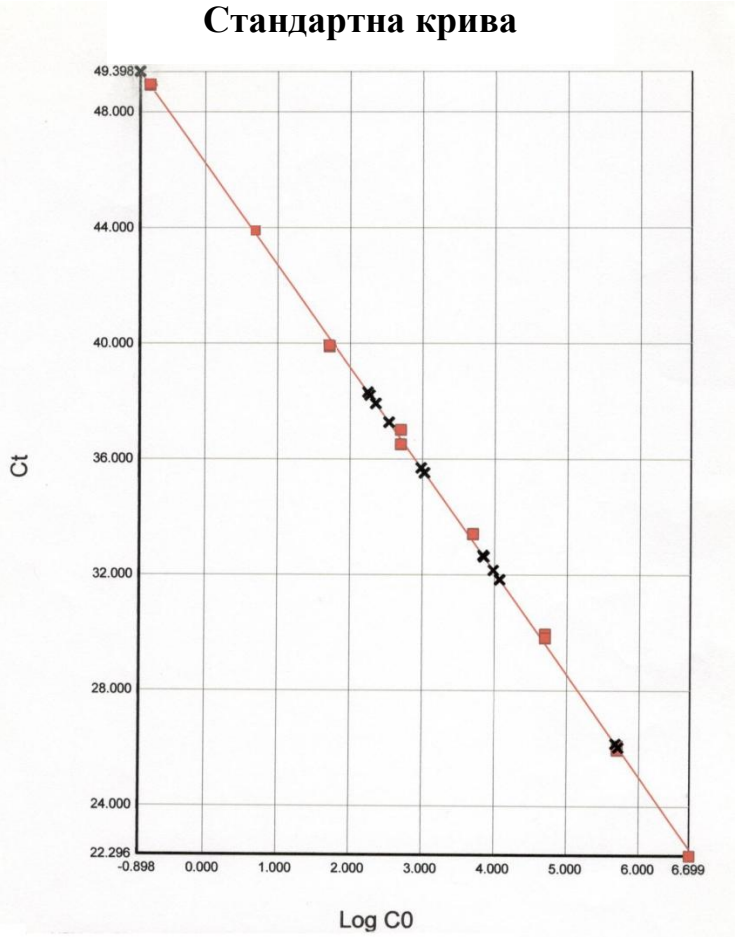
ефективност на реакцията, ще се получи при 10-кратно увеличение на PCR-ия продукт на всеки 3,32 циклъла, по време на експоненциалната фаза на амплификация ($\log 2^{10} = 3{,}3219$).Стандартната крива с наклон -3.32, показва 100% ефективност на PCR-ната реакция. Ако стандартната крива има регресионен коефициент-$R^2$ стойност <0.985, наклон извън обхвата -3,1 до -3,6 и интерсепт Y- извън 37-46, анализът трябва да се повтори (232)Табл.8. Примерна стандартна крива е представена на фиг.14.

**Табл. 8 Характеристика на стандартната крива**

| | **Наклон** | **Интерсепт** | **$R^2$** |
|---|---|---|---|
| Серия 1 | -3.28 | 39.1 | 0.998 |
| Серия 2 | -3.25 | 39.7 | 0.999 |
| Серия 3 | -3.25 | 39.8 | 0.999 |
| Серия 4 | -3.25 | 39.9 | 0.998 |
| Серия 5 | -3.25 | 39.9 | 0.999 |

### 1.3.3Корелационен коефициент

Друга характеристика на стандартната крива е корелационния коефициент ($R^2$), показващ до каква степен данните отговарят на стандартната крива. Стойността на $R^2$, отразява линейността на стандартната крива. В идеалния случай, $R^2=1$, въпреки това 0.999 обикновено е максималната стойност. Интерсепта съответства на теоретичната граница на откриване на реакцията, или стойността Ct, при която най-малък брой копия на прицелни молекули обозначени на оста x, е довела до статистически значима амплификация. Въпреки че, теоретично може да се открие единично копие на дадена целева молекула, 2÷10 е определена като най-ниското целевото ниво, което може да бъде надеждно определено, чрез количествен real time PCR (234).




**Фиг. 14 Стандартна крива с ефективност 91,8% на реакцията.**

### 1.4 Точност

Точността (повторяемост и възпроиводимост) се дефинира, като ниво на съответствие на индивидуалните тестови резултати в рамките на една амплификация (intra assay) и между отделни аплификации (inter assay). Характеризира се, чрез стандартното отклонение на измерените резултати и коефициента на вариация. Степента на съответствие на измерените или изчислени количества към тяхната действителна (истинска) стойност може да се определи, чрез анализ на референтен материал или сравнение на резултатите с тези, получени от референтен метод.

Вътрешно-аналитичната вариация се оцени при изследване на петкратни повторения на 2 проби- в нисък и висок товар на HBV-ДНК. При анализ на данните, се установи коефициент на вариация (CV%) от 0.63% до 1.04 % за Ct стойност и до 9,2 % за copies/ml HBV-ДНК. Възпроизводимостта между отделни серии варира от 0.95% до 1.28% за CV% за Ct стойност, и от 0,5 % до 33% CV% copies/ml HBV-ДНК. За по-лесно интерпретиране и съпоставимост на нашите резултати с in-house методи и комерсиални китове, преобразувахме получените резултати в $\log_{10}$ HBV-ДНК в copies/ml. Установихме, че вариабилността в рамките на самата серия на метода - "*inta-assay*") при изследване на две проби с 5 кратни повторения, показа коефициент на вариация % (CV%) и стандартно отклонения $\log_{10}$HBV-ДНК в copies/ml, съответно 0.72% и 0.04. При "*inter-assay*" - вариабилност на метода между няколко серии при изследването на 3 проби в рамките на десет последователни дни, показа коефициент на вариация % (CV%) и стандартно отклонения $\log_{10}$ HBV-ДНК в copies/ml, съответно 4,9% и 0,33(табл. 9)

**Табл. 9 Възпройзводимост в „ *inta-assay* " и „*inter-assay*" при $\log_{10}$ от copies/mlHBV-ДНК**

| **HBV-ДНК ($\log_{10}$copies/ml)** | **Intra-assay ($\log_{10}$ copies/ml)** | | | **Inter-assay ($\log_{10}$ copies/ml)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Средна стойност | Стандартно отклонение | Коефициент на вариация (%) | Средна стойност | Стандартно отклонение | Коефициент на вариация (%) |
| **Проба 1** | 7.19 | 0.04 | 0.5 | 5.42 | 0.027 | 0.5 |
| **Проба 2** | 2.68 | 0.02 | 0.72 | 2.97 | 0.14 | 4.9 |
| **Проба 3** | | | | 8.33 | 0.33 | 4.0 |

**Табл. 10 Стойности на Ct и HBV-ДНК (copies/ml), при проби използвани за оценяване на повторяемостта на метода.**

| **Проба** | **Ct-стойност** | **HBV-ДНК (copies/ml)** |
|---|---|---|
| **1** | 20,15 | $1.6875.\ 10^7$ |
| **1** | 20,14 | $1.7372.10^7$ |
| **1** | 20,16 | $1.5536.\ 10^7$ |
| **1** | 19,86 | $1.3875.\ 10^7$ |
| **1** | 20,10 | $1.4822\ .10^7$ |
| **2** | 36,33 | 491 |

| | | |
|---|---|---|
| **2** | 36,34 | 487 |
| **2** | 36,59 | 464 |
| **2** | 36,8 | 448 |
| **2** | 36,25 | 505 |

### 1.5 Валидиране на метод за количествено определяне на HBV-ДНК, чрез използване на real time PCR.

Метода е валидиран, чрез използването на референтни материали–проби с известни концентрации, посредством участие във външен качествен контрол – INSTAND e. V. Разработената от нас in-house методика, показа успешно преминаване на 4 качествени контроли и получи сертификати за количествено и качествено определяне на HBV-ДНК. Част от резултатите са представени на Табл. 12.

**Табл.12 Консенсусни резултати от ВОК схема (INSTAND e. V - 06. 2010г.).**

| Проба | Резултат (HBV-ДНКcopies/ml) | INSTAND e. V (HBV-ДНК copies/ml ± 1 $log_{10}$ от средната стойност) | INSTAND e. V (HBV-ДНК copies/ml ± 0,25 $log_{10}$ от средната стойност) |
|---|---|---|---|
| **31001** | 2500 | 248 - 24 750 | 1390- 4401 |
| **31002** | 98 000 | 11 000 - 1 100 000 | 61 858- 195 611 |
| **31003** | Отр. | Отр. | Отр. |
| **31004** | 8350 | 890 - 89 000 | 5005-15 827 |

Получените резултати се намират в близост до средните на консенсусните стойности на референтните проби и попадат в тесния доверителен интервал ± 0.25 $log_{10}$ на средната стойност.

Въведеният от нас метод е с добра клинична чувствителност, специфичност и възпроизводимост, широк линеен обхват, съчетано с малък обем на пробата и ниска цена. Анализът има добра клинична чувствителност 5 copies/ml, при използване на проба с първоначален обем 200 µl и 6 $log_{10,}$ линеен динамичен обхват, без необходимост от разреждане и добра клинична възпроизводимост между сериите - до 33% CV% copies/ml HBV-ДНК. Тези резултати са в съответствие с предишни изследвания, описващи подобни in-house методи (236, 237, 238), както с данни за вариабилност, възпроизводимост, чувствителност и линейност, описани в предлаганите комерсиални китове (238).

## *2.Проучване връзката на HLA клас I и клас II генен полиморфизъм с предразположеността към хепатит B вирусната инфекция и отговора към интерферон и нуклеот(з)идни аналози при HBV инфекрирани пациенти. Изследване на вирусния генотип.*

Чрез въведената и валидирана методика за количествено определяне на HBV-ДНК се проследиха 118 хронично инфектирани пациенти. Петдесет и седем от тях бяха изследвани многократно през период от 3 или 6 месеца (в продължение на среден период от две години) в етапа на диагностициране на хроничната инфекция, включване на антивирусна терапия и по време на антивирусното лечение. Пациентите бяха разпределени в 3 групи - скрининг (n=22), терапия с нуклеот(з)идни аналози (n=25), терапия с интерферон-α (n-12). Описаните пациенти се типизираха за HLA-A, B, DRB1 локусите, с цел да се проучи влиянието HLA клас I (-A и -B ) и клас II (-DRB1), полиморфизма за вирусната репликаци и флуктуацията на вирусния товар при лечение с нуклеот(з)иднианализи и интерферон-α.

Установиха се алели със сигнификантна значимост в групата на пациентите лекувани с нуклеот(з)идни аналози –Tenofovir, Lamivudine, Entecavir. Те са разделени на две подгрупи - добър и незадоволителен терапевтичен отговор, в зависимост от наличието или липсата на флуктуация на вирусния товар - до 10 000 копия/мл, след спада на вирусната ДНК и получаване на отрицателен резултат за HBV-ДНК. При 11 от пациентите се установи флуктуация на вирусния товар - незадоволителен терапевтичен отговор, а при 14 от тях - добър терапевтичен отговор.

Анализът на данните показа добър терапевтичен отговор при пациентите, които носят HLA-A*24 антигена (one-tailed Fischer's exact p = 0.020), докато носителството на HLA-DRB1*14 антигена, се асоциира с незадоволителен терапевтичен отговор (one-tailed Fischer's exact p = 0.047). При пациентите с добър терапевтичен отговор, най-честите алели са A*24, B*35, DRB1*11, а при пациентите с незадоволителен терапевтичен отговор, A*01, A*02, B*35 и DRB1*14. Наблюдаваните алелни честоти при пациентите от двете подгрупи са представени в табл.13.

**Табл. 13 HLA алелни честоти при пациенти лекувани с нуклеот(з)идни аналози.**

| HLA алел | Добър терапевтичен отговор (n=14) | Незадоволителен терапевтичен отговор (n=11) | P |
|---|---|---|---|
| A*01 | 0.1021 | 0.2273 | |
| A*02 | 0.1301 | 0.2273 | |
| A*03 | 0.0769 | 0.1818 | |
| A*11 | 0.1154 | 0.0455 | |
| A*24 | 0.3561 | 0.0909 | p = 0.020 |
| A*25 | 0 | 0 | |
| A*26 | 0.0769 | 0.0455 | |
| A*33 | 0 | 0.0909 | |
| A*66 | 0 | 0.0877 | |
| A*68 | 0.0385 | 0.0455 | |
| A*69 | 0 | 0.0455 | |
| B*07 | 0.0357 | 0.0632 | |
| B*08 | 0.0714 | 0.1364 | |
| B*18 | 0.0714 | 0.1154 | |
| B*27 | 0.0357 | 0.0455 | |
| B*35 | 0.2240 | 0.2273 | |
| B*38 | 0.0357 | 0 | |
| B*39 | 0.0357 | 0 | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| B*41 | 0.0714 | 0 | |
| B*44 | 0.0857 | 0.0455 | |
| B*49 | 0 | 0.0455 | |
| B*50 | 0.0357 | 0 | |
| B*51 | 0.1629 | 0.1364 | |
| B*55 | 0.0357 | 0 | |
| B*56 | 0 | 0.0455 | |
| B*57 | 0.0357 | 0.0455 | |
| B*58 | 0 | 0.0455 | |
| DRB1*01 | 0.1154 | 0.1000 | |
| DRB1*03 | 0.1538 | 0.2000 | |
| DRB1*04 | 0.0385 | 0 | |
| DRB1*07 | 0.1461 | 0 | |
| DRB1*10 | 0.0385 | 0.1000 | |
| DRB1*11 | 0.2692 | 0.1500 | |
| DRB1*12 | 0.0385 | 0 | |
| DRB1*13 | 0 | 0.0500 | |
| DRB1*14 | 0.0385 | 0.2500 | p = 0.047 |
| DRB1*15 | 0.0385 | 0.1000 | |
| DRB1*16 | 0.1054 | 0.0500 | |

От проведения анализ на HLA-A-B и HLA-A-B-DRB1 хаплотипни честоти единствено хаплотипа A*24-B*35, се асоциира с добър отговор на лечение с нуклеот(з)идни аналози - статистическият анализ показа гранично ниво на сигнификантност (one-tailed Fischer's exact p = 0.062). Само при

един от пациентите с добър терапевтичен отговор се установи пълна сероконверсия (наличие на анти-HBs).

При изследване на HLA алелни и хаплотипни честоти при пациенти, лекувани с интерферон (n-12), не се установиха алели и хаплотипи свързани с отговора към терапия, тъй като всички изследвани пациенти имат вирусен товар в края на лечението и през 1-годишния период на наблюдение, след приключване на лечението. При повишаването на HBV-ДНК пациентите са повторно включени на антивирусно лечение, но този път с нуклеот(з)идни аналози. Най-честите алели са HLA-A*24, B*18, B*35, DRB1*11.

При изследване на третата група пациенти (етап скрининг - първо изследване при диагностициране на хронична инфекция), не се установиха HLA алелни и хаплотипи протективни или предразполагащи за висок или нисък вирусен товар. Най високата измерена стойност е 1 120 000 копия/мл, а най- ниската – 25 копия/мл (средно 64370 ± 12 345 копия/мл). При пациентите с висок товар, най-честите алели са B*51, DRB1*14, а при пациентите с нисък, съответно B*35, DRB1*03. Честотното разпределение е показано в Табл.14.

**Табл. 14 HLA алелни честоти при новодиагностицирани пациенти**

| **HLA алел** | **Висок вирусен товар (n=8)** | **Нисък вирусен товар (n=15)** |
|---|---|---|
| A*01 | 0.0625 | 0.1667 |
| A*02 | 0.5000 | 0.3667 |
| A*03 | 0.0625 | 0.0667 |
| A*11 | 0.1875 | 0.1000 |
| A*24 | 0.0625 | 0.1000 |
| A*26 | 0.0625 | 0.1000 |
| A*32 | 0.0625 | 0.0333 |
| A*66 | 0 | 0.0333 |

| | | |
|---|---|---|
| A*68 | 0 | 0.0333 |
| B*07 | 0 | 0.0333 |
| B*08 | 0.1250 | 0.1000 |
| B*13 | 0 | 0.0333 |
| B*15 | 0.0625 | 0.0667 |
| B*18 | 0.1250 | 0.0667 |
| B*27 | 0 | 0.0333 |
| B*35 | 0.1250 | 0.2333 |
| B*38 | 0.0625 | 0 |
| B*40 | 0 | 0.100 |
| B*41 | 0.0625 | 0.0333 |
| B*44 | 0.0625 | 0.0667 |
| B*49 | 0 | 0 |
| B*50 | 0.0625 | 0 |
| B*51 | 0.1875 | 0.1000 |
| B*55 | 0 | 0 |
| B*56 | 0 | 0.0333 |
| B*57 | 0.0625 | 0.0333 |
| DRB1*01 | 0.0714 | 0.1786 |
| DRB1*03 | 0.2143 | 0.2500 |
| DRB1*04 | 0 | 0.1714 |
| DRB1*07 | 0.2143 | 0.1714 |
| DRB1*09 | 0.0714 | 0 |
| DRB1*11 | 0.1429 | 0.1786 |

| | | |
|---|---|---|
| DRB1*12 | 0 | 0.0357 |
| DRB1*13 | 0 | 0.0357 |
| DRB1*14 | 0.2143 | 0.0357 |
| DRB1*15 | 0 | 0 |
| DRB1*16 | 0.0714 | 0.1429 |

Съществуват оскъдни данни за влиянието на HLA генния полиморфизъм при лечението на пациенти с хроничен хепатит В с интерферон-α или нуклеот(з)идни аналози. Проучване в Корея установява, че при лечение с LamivudineHLA-Cw 1 и HLA-DRB*14 алели са свързани с липса на терапевтичен отговор, а HLA-A2 и HLA-DRB4 с добър терапевтичен отговор и сероконверсия. Пациентът със сероконверсия в нашето проучване е хомозигот- HLA-A*02 (239) . Han N. и сътр. установяват, че HLA-DRB1*14 алела може да се асоцира с добър, а HLA-DQB1*07 с лош терапевтичен отговор при интерферонова терапия (240).

Човешките левкоцитни антигени (HLA) са неразделна част от имунния отговор. Силно полиморфни HLA гени могат да играят ключова роля в отговора на антивирусна терапия и нивото на вирусната ДНК при хронична инфекция. Установените от нас антигени и хаплотипи могат да се използват като прогностични и предиктивни биомаркети при хронична HBV инфекция.

Носителството на конкретен HBV генотип може да бъде асоциирано с някои особености в протичането на заболяването и елиминирането на вируса от организма. Смята се, че вирусният товар е основния фактор, формиращ риска от късни последствия на инфекцията с HBV, особено риска от развитие на хапатоцелуларен карценом (241,242). Изследването на генотипа на вируса може да се изследва при подбора на пациенти, подходящи за лечение с интерферонови препарати, поради диференциалното повлияване в зависимост от генотипа на HBV, инфектирал съответния болен (243).

В настоящото проучване генотипите на HBV бяха изследвани от една страна, за да определим генетичната компонента на вируса и от друга да допринесем за характеризиране на разпространението на HBV генотипите, сред хепатитно болните в нашата страна. С оглед дефинираните в хода на въвеждане детекционни граници на методиката, за генотипизиране бяха подбрани само вирусни ДНК, изолирани от пациенти с виремия > 1000

копия/мл. От изследваните 108 индивида, при 106 установихме наличие на генотип D, а при двама - на генотип А. Изследваната от нас група пациенти са носители на най-често срещания в Южна Европа и Средния изток генотип D на хепатит В вируса(244). Нашите резултати потвърждават, че този HBV генотип е най-разпространен и у нас (2).

### *3. Проучване на HLA клас I (-A и -B ) и клас II (-DR) генетичен полиморфизъм при хронично инфектирани с HBV и спонтанно оздравели пациенти.*

В настоящата работа изследвахме разпределението на HLA клас I (-A и –B) и клас II (-DRB1)алелите и хаплотипите при общо77 пациента: 20 спонтанно оздравели след остър хепатит и 57 хронично болни. Получените данни бяха сравнени с 204 здрави индивида от българската популация.

Наблюдаваните алелни честоти при индивидите от двете групи са представени на табл. 15. Не се установи отклонение от равновесието на Hardy-Weinberg. Общо двадесет и един HLA-Ви 15 HLA-A, и 13 HLA- DR алела бяха идентифицирани при изследваните HLAклас I и II локуса.

**Табл. 15. HLAалели при пациенти с хроничен хепатит В, оздравели от HBVи здрави контроли.**

| HLA алел | Оздравели (n=20) | Хронична инфекция (n=57) | Контроли (n=204) | P |
|---|---|---|---|---|
| A*01 | 0.15000 | 0.15789 | 0.1299 | |
| A*02 | 0.30000 | 0.28947 | 0.3015 | |
| A*03 | 0.10000 | 0.09649 | 0.0801 | |
| A*11 | 0 | 0.08772 | 0.0686 | |
| A*23 | 0.02500 | 0 | 0.0392 | |
| A*24 | 0.20000 | 0.15789 | 0.1300 | |
| A*25 | 0.05000 | 0 | 0.0172 | OR -5.56; p-0.019 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| A*26 | 0.10000 | 0.07018 | 0.0539 | |
| A*29 | 0.02500 | 0.01754 | 0.0122 | |
| A*30 | 0.02500 | 0.02632 | 0.0172 | |
| A*31 | 0 | 0 | 0.0319 | |
| A*32 | 0 | 0.01754 | 0.0466 | |
| A*33 | 0 | 0.01754 | 0.0221 | |
| A*36 | 0 | 0 | 0.0049 | |
| A*43 | 0 | 0 | 0.0025 | |
| A*66 | 0 | 0.00877 | 0.0025 | |
| A*68 | 0.02500 | 0.02632 | 0.0245 | |
| A*69 | 0 | 0.00877 | 0.0123 | |
| A*80 | 0 | 0 | 0.002 | |
| | | | | |
| B*07 | 0.10000 | 0.04386 | 0.0466 | |
| B*08 | 0.07500 | 0.13158 | 0.0515 | OR-2.94, p-0.0018 |
| B*13 | 0 | 0.02632 | 0.0172 | |
| B*14 | 0 | 0 | 0.0196 | |
| B*15 | 0.02500 | 0.02632 | 0.0294 | |
| B*18 | 0.15000 | 0.10526 | 0.0882 | |
| B*27 | 0.05000 | 0.03509 | 0.0466 | |
| B*35 | 0.15000 | 0.21053 | 0.1495 | OR-1.78, p-0.03 |
| B*37 | 0 | 00 | 0.0074 | |
| B*38 | 0.02500 | 0.02632 | 0.0294 | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| B*39 | 0.05000 | 0.00877 | 0.0221 | |
| B*40 | 00 | 0.03509 | 0.0637 | |
| B*41 | 0.02500 | 0.03509 | 0.0147 | |
| B*44 | 0.17500 | 0.06140 | 0.0882 | OR-3,24; p-0,032 |
| B*45 | 0 | 0 | 0.0025 | |
| B*47 | 0 | 0 | 0.0098 | |
| B*48 | 0.02500 | 0 | 0 | |
| B*49 | 0 | 0.00877 | 0.0245 | |
| B*50 | 0.02500 | 0.01754 | 0.0221 | |
| B*51 | 0.10000 | 0.15789 | 0.1544 | |
| B*52 | 0.02500 | 0 | 0.0343 | |
| B*53 | 0 | 0 | 0.0123 | |
| B*55 | 0 | 0.00877 | 0.0147 | |
| B*56 | 0 | 0.01754 | 0.0049 | |
| B*57 | 0 | 0.03509 | 0.0343 | |
| B*58 | 0 | 0.00877 | 0.0123 | |
| | | | | |
| DRB1*01 | 0.07500 | 0.11404 | 0.1029 | |
| DRB1*03 | 0.07500 | 0.21053 | 0.0931 | OR-2.36, p-0.002 |
| DRB1*04 | 0.07500 | 0.04386 | 0.0858 | |
| DRB1*07 | 0.10000 | 0.11404 | 0.0686 | |
| DRB1*08 | 0.02500 | 0 | 0.0270 | |
| DRB1*09 | | 0.00877 | 0.0049 | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| DRB1*10 | 0.02500 | 0.01754 | 0.0147 | |
| DRB1*11 | 0.12500 | 0.20175 | 0.2034 | |
| DRB1*12 | 0.02500 | 0.01754 | 0.0074 | |
| DRB1*13 | 0.10000 | 0.02632 | 0.1103 | OR-0.21, p-0.006 |
| DRB1*14 | 0.10000 | 0.10526 | 0.0613 | |
| DRB1*15 | 0.05000 | 0.03509 | 0.0637 | |
| DRB1*16 | 0.17500 | 0.10526 | 0.1569 | |

Сравняването на алелното разпределение показа статистически достоверни повишени честоти на HLA- A *25 и B *44 алелни групи при пациенти, оздравели от инфекцията в сравнение с тези с хронична инфекция и контролната група.Предразполагащи за хронифициране на инфекцията бяха установени HLA-B*08, B*35, DRB1*03 алелни групи, докато DRB1*13 беше намерен със статистически значима понижена честота (табл. 16).

**Табл.16HLA алели и хаплотипи асоцирани с вирусен клирънс или вирусно персистиране при хепатит В.**

| **Алели асоцирани с клирънс** | **Оздравели n=20** | **Хронични n=57** | **Контроли (n=204)** | **OR** | **P** |
|---|---|---|---|---|---|
| A*25 | 0.05000 | 0 | 0.0172 | 5,56 | 0,019 |
| B*44 | 0.17500 | 0.06140 | 0.0882 | 3,24 | 0,32 |
| DRB1*13 | 0.10000 | 0.02632 | 0.1103 | 0,21 | 0,006 |
| **Алели асоцирани с вирусно персистиране** | | | | | |
| B*08 | 0.13158 | 0.0515 | 0.0515 | 2,94 | 0,00018 |
| B*35 | 0.15000 | 0.21053 | 0.1495 | 1,78 | 0,03 |
| DRB1*03 | 0.07500 | 0.21053 | 0.0931 | 2,36 | 0,002 |
| **Хаплотипи асоцирани с вирусно персистиране** | | | | | |
| A* 01 B*08 DRB1*03 | 0 | 0.5263 | 0.0286 | | |
| A* 24 B*35 DRB1*11 | 0 | 0.04386 | 0.00274 | | |

При пациентите с хронична инфекция бяха намерени 11 хаплотипа с повишена честота в сравнение с контролната група, които не са установени при оздравелите пациенти. Сред тези хаплотипи, най-чести са A*01-B*08-DRB1*03, като честотата на A*24-B*35-DRB1*11 хаплотипа, е 21 пъти по-висока в групата на хронично болните пациенти, в сравнение с честотата на хаплотипа в здравите контроли (Табл. 17).

Анализът на най-вероятните хаплотипи показа преобладаване на следните хаплотипи при оздравелите пациенти: HLA-A*02-B*18-DRB1*11, A*02-B*44-DRB1*16, A*02-B*35-DRB1*01, A*03-B*44-DRB1*14, A*24-B*44-DRB1*13. Посочените хаплотипи не бяха намерени при пациентите с хронична инфекция, докато честотата им в здравата контролна група беше значимо по-ниска.

**Табл. 17 HLAхаплотипи алели при пациенти с хроничен хепатит B, оздравели от HBVи здрави контроли.**

| HLAхаплотип | Оздравели (n=20) | Хронична инфекция (n=57) | Контроли (n=204) |
|---|---|---|---|
| A*02-B*18-DRB1*11 | 0.07500 | 0 | 0.0309 |
| A*02-B*44-DRB1*16 | 0.07500 | 0 | 0.00735 |
| A*02-B*35-DRB1*01 | 0.05000 | 0 | 0.0217 |
| A*03-B*44-DRB1*14 | 0.05000 | 0 | 0 |
| A*24-B*44-DRB1*13 | 0.05000 | 0 | 0 |
| A*01-B*08-DRB1*03 | 0 | 0.05263 | 0.0286 |
| A*01-B*51-DRB1*01 | 0 | 0.02632 | 0.00245 |
| A*02-B*08-DRB1*03 | 0 | 0.02632 | 0.00257 |
| A*02-B*13-DRB1*07 | 0 | 0.01754 | 0.00245 |
| A*02-B*18-DRB1*16 | 0 | 0.01754 | 0.00505 |
| A*02-B*35-DRB1*16 | 0 | 0.02632 | 0.0128 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| A*02-B*40-DRB1*03 | 0 | 0.02632 | 0 |
| A*02-B*51-DRB1*11 | 0 | 0.02632 | 0.0269 |
| A*03-B*35-DRB1*04 | 0 | 0.01754 | 0.00735 |
| A*03-B*35-DRB1*11 | 0 | 0.02632 | 0.0123 |
| A*11-B*51-DRB1*14 | 0 | 0.01754 | 0.00245 |
| A*24-B*35-DRB1*11 | 0 | 0.04386 | 0.00274 |

В настоящата работа проучихме генетичния полиморфизъм на HLA системата (HLA клас I-A, B и HLA клас II-DRB1, локусите) при пациенти спонтанно оздравели от HBV, хронично болни и здрави контроли от български произход с оглед обогатяване на данните от световната литература за връзкатана HLA гените и изхода от HBV в контекста на нашата популация. Днес се приема, че полиморфните варианти в гени, кодиращи молекули на имунния отговор играят важна роля в предразположеността и развитието на инфекциозните заболявания. През последните години генетичната предразположеност към хепатит В инфекция е проучвана усилено в различни етнически групи и е установена асоциация с полиморфните гени на имунния отговор, включително и HLAгените (245).

HLA-B*08 алелът се среща сравнително често в нашата популация (p=0.0515), но сред хронично болните се установява с по-висока честота (p=0.13158). Рискът, индивидите, носещи този алел да развият хроничен хепатит е приблизително 2,3 пъти по-висок в сравнение с този за общата популация.Тези резултати корелират с данните получени от Sungи сътр., Poli сътр., Patersun.

Установената от нас статистически значима повишена алелна честота на DRB1*13, в групата на спонтанно оздравелите, потвърди протективната роля на DRB1*13 и неговите алелни варианти DRB1*1301 и DRB1*1302, демонстрирани в независими проучвания, в няколко мета анализи (245, 248). От друга страна HLA DRB1*13, се отчита, като предразполагащ ген за хронична HBV инфекция за турското население (174). Предстои тези данни да бъдат потвърдени, поради относително малкия брой на изследваните пациенти (n=20). Предполага се, че протективната роля на DRB1*13, се дължи на ефективното антигенно представяне на DRB*13 молекулите, или на полиморфизми в съседен имуно-регулаторен ген. Интерес представлява

факта, че DRB1*13, има предпазваща роля за вертикално предаване при HCV, HIV, HPV ималарийна инфекция (249).

Установената от нас статистически значима повишена честота на DRB1*03, при пациентите с хронична инфекция, подкрепя данните от други проучвания, демонстриращи асоциация на тази алелна група с понижен антителен отговор и персистираща инфекция в китайската Хан група и други етнически групи (248). Резултатите могат да бъдат обяснени с неефективното представяне на имунодоминантните епитопи на HBsAg от DRB1 *03 молекулите на CD4 + Т клетки.

Като допълнителни фактори, асоциирани с развитието на хронична хепатит В инфекция са намерени HLA клас I аленните групи: B*08, B*35. Алелът HLA- B*35 е установен, като предразполагащ в различни проучвания, проведени при пациенти от Русия, Китай, САЩ, Турция и Сенегал (177,250), както и рисков фактор за по-бързо прогресиране наHIV. (251)

Алелът HLA-B *08 е сравнително чест в българската популация (p - 0.0515), но с по-висока честота при хора с хронична инфекция (p -0.13158). Рискът за лицата, носещи HLA-B*08, да развият хроничен HBV е приблизително 2.3 пъти по-висок в нашата популация. Честотата на HLA антиген B*08, е по-висока при индивиди, които не са в състояние да развият антителен отговор след ваксинация HBV. HLA-B * 08 и неговия разширен хаплотип е свързан с други имунно-медиирани заболявания, като автоимунен хепатит. Karan и сътр. установиха, че HLA-B *08 и DRB1*03, са свързани с висок риск за хроничен HBV (174). HLA-B * 08 е свързан с вирусна резистентност или самостоятелно, или като част от кавказкия хаплотип A *01- B * 08-DRB1 *03(ancestral).

Нашите данни показват статистически значима повишена честота на HLA-A*25 и B*44 при пациентите, оздравели от хепатит В, в сравнение със здравата контролна група и пациентите с хронична инфекция. Това предполага възможна роля на тези алели, като предразполагащ фактор за развитие на хепатит В, но свързан с по-добра възможност за изчистване на вирусната инфекция.

Поради комплексната роля на отделните HLA локуси, в развитието на имунния отговор, е необходимо проучване на ролята на хаплотипите за развитие на инфекциозния отговор. Понастоящем тези данни се сравнително ограничени. В нашето проучване са анализирани хаплотипните асоциации при хепатит В инфекцията и са установени значими разлики в хаплотипното разпределение, вероятно свързани с различната форма на протичане на заболяването. Интерес представлява значително повишената

честота на HLA-A*01B*08 DRB1*03 хаплотипа при пациентите с хронична инфекция. Посоченият хаплотип е намерен, като предразполагащ при редица инфекциозни и автоимунни заболявания. Функционални изследвания на пациенти с този хаплотип, показват дефект в ранната Т клетъчна активация (252), намалено производство на цитокини – тип 1, включително INF-γ, IL-2, IL-12.(253) и намалена NK клетъчна активност (254). Въпреки това, не е изяснен нито точния механизъм, нито точния ген отговорен за това, но се запазва вероятността HLA-B*08, да е частично отговорен за тези фенотипи.

Честотата на HLA-A*24-B*35-DRB1*11 хаплотипа, е 21 пъти по-висока в сравнение с честотата на този хаплотип сред здравите контроли. Няма данни за установяването му, като предразполагащ в други проучвания.

Проучването на HLA гените показа, че предразполагащи за хронифициране на инфекцията в нашата популация са алелните групи: HLA-B*08, B*35, DRB1*03, докато HLA-A*25, B*44 и DRB1*13 алелни групи са протективни. Значително е повишена честотата на HLA-A*01-B*08-DRB1*03 хаплотипа, при пациентите с хронична инфекция. Поради хетерогенността на HLA алелното разпределение в различни етнически групи, установените болестни асоциации е коректно да се интерпретират в контекста на специфичния популационен генофонд. Остават отворени въпросите кои човешки гени са важни за инфекцията и как да ги открием. Установяването на генетично базирани болестни маркери, предсказващи кои пациенти ще развият хроничен хепатит и прогресиращо чернодробно заболяване и кои ще елиминират вируса, е от съществено значение за въвеждане на клинични подходи. Нашето проучване се проведе, за да се определи връзката между някои от HLA алели и изхода от HBV инфекция.

## *4. Проучване на KIR генен полиморфизъмпри хронично инфектирани и спонтанно оздравели пациенти.*

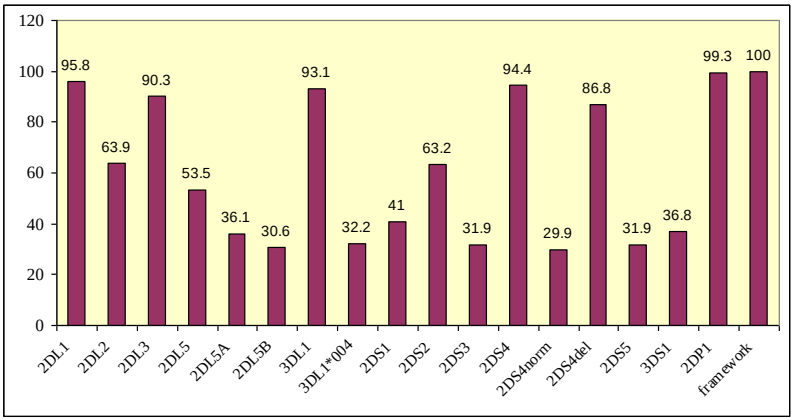
В настоящото проучване бяха сравнени носителството и честотата на 14 KIR гени (7 инхибиращи - 2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5 (A/B), 3DL1, 3DL2, 3DL3; 6 активиращи - 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4 (нормален ген -norи ген с делеция - del), 2DS5, 3DS1, един с предполагаема инхибираща и активираща активност (2DL4) и 2 KIR псевдогени (2DP1, 3DP1), KIRHLA лигандите, както и KIR/HLA лигандните комбинации между пациенти с хепатит В

вирусна инфекция и контролна група от случайно подбрани здрави неродствени индивиди от българската популация.

### 4.1 KIR гени/псевдогени

Честотите на KIR гените/псевдогените в двете изследвани групи са представени на фиг.14 и табл. 18. Като изключим KIR2DL4, 3DL2, 3DL3, 3DP1, които се срещат при всички изследвани индивиди, най-честите KIRs гени сред пациентите са тези на 2*DL1* (95.8%), 3*DL1* (93.1%), *2DS4* (94.4%), *2DL3* (90.34%) и на *2DP1* (99.3%) псевдогена. *KIR2DL2, KIR2DS2* и *KIR2DL5* гените са разпространени също в по-голяма част (над ½) от изследваните, съответно в 63.9%, 63.26% и 53.5%. Със значително по-ниска честота на разпространение (под 50%) са *KIR2DS1, KIR3DS1, KIR2DS5* и *KIR2DS3*. С най-ниска честота е представен *KIR2DS5* (31.9%). Известно е, че някои KIR2DL5 алели от KIR2DL5B групата са нулеви (255), или кодират функционално неактивни рецептори, които не допринасят за цитотоксичния потенциал на NK клетките. От диференцирането на алелните варианти на *KIR2DL5* (*KIR2DL5A* от *KIR2DL5B*) и *KIR2DS4* гените (функционално неекспресирани алели обединени в обща група – *2DS4del/1D* от останалите *KIR2DS4* алели- *KIR2DS4norm*) и *KIR3DL1* гените (нулев алел - *KIR3DL1*004* от останалите *3DL1* алели), показа следните генни честоти: *KIR2DL5A* (36.1%), *KIR2DL5B* (30.6%), *KIR2DS4norm* (29.9%), *KIR2DS4del* (86.8%) и *KIR3DL1*004* (32.2%) при болните.

В здравата българска популация (табл. 18), най-честите инхибиторни KIR гени са KIR2DL1 (93.7%), 3DL1 (90.4%), 2DL3 (85.7%). 3DL1*004 алелът на KIR3DL1, който не кодира функционално активен рецептор, се открива в 17.6% от изследваните здрави контроли. От активиращите KIR гени с най-висока честота е KIR2DS4 (92.1%), от който нормалният вариант (KIR2DS4 nor) е много по-слабо разпространен (20.2%) в сравнение с нулевия вариант (KIR2DS4 del- 78.7%). В над 1/2 от изследваните се откриват KIR2DS2 (65.1%) и 2DL2 (60.3%) гени. Разпространението на KIR2DL5 при здравите индивиди от българската популация е 65.1%, с малко по-голяма честота на 2DL5B-45.5% в сравнение с 2DL5A-34.7% варианта. Със сравнително по-ниска честота (под 50%) са KIR2DS1, 3DS1, 2DS5 и 2DS3 гените. Подобно на други европеидни популации в здравата българска популация гените за активиращите KIRs са представени с доста по-ниска честота в сравнение с тези, кодиращи инхибиторните рецептори, като само два активиращи KIRs(2DS4 и 2DS2) се срещат в над 50% от всички изследвани.




**Фиг. 14 Честотно разпределение на KIRs при пациенти с HBV инфекция**

Разпределението на изследваните KIR гени и алелни варианти при пациентите с HBV инфекция, като цяло не се отличава съществено от това на здравите индивиди от българската популация. Прави впечатление, че за разлика от здравите, в общата група болни (с хроничен хепатит В и оздравели), честотата на 2DL5B (30.6%) е по-ниска в сравнение с тази за 2DL5A (36.1%) варианта, което рефлектира в значимо по-ниска честота за KIR2DL5B при болните (p=0.022) спрямо контролите. Установена бе също по-висока честота на функционално инертния вариант на KIR3DL1 гена (KIR3DL1*004) сред болните. Беше наблюдавана и слабо изразена тенденция за по-нисък процент на KIR2DL5 (като цяло) и на KIR3DS1 позитивни индивиди в групата на заболелите, сравнено със здравите контроли.

Допълнително беше направен сепариран сравнителен анализ KIR генните честоти в подгрупите на болни с HBV инфекция – с хроничен хепатит В и преболедували, но оздравели от остра HBVинфекция (табл. 18).

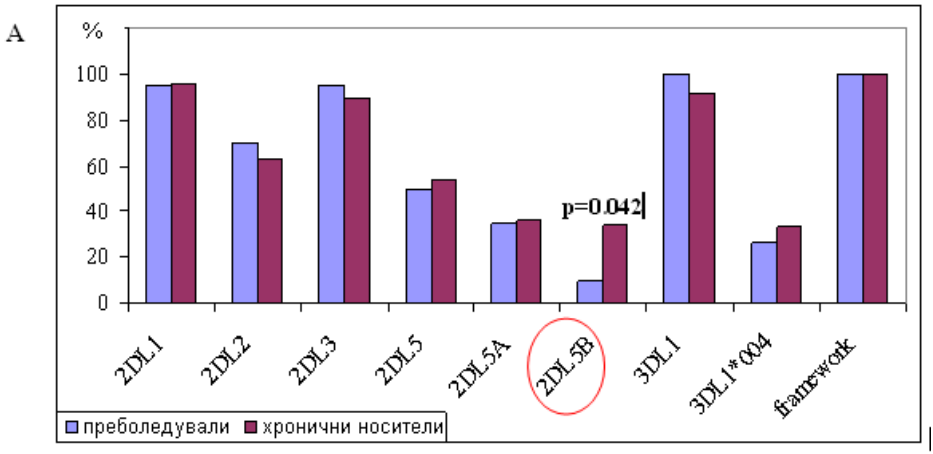
**Табл. 18 KIR генни честоти при пациенти с HBV инфекция и здрави контроли**

| **KIR ген** | **Здрави** (n=126)n(%) | **Болни** (n=144)n (%) | **Хронични носители** (n=124)n (%) | **Преболедували** (n=20)n (%) |
|---|---|---|---|---|
| *3DL2;3DL3; 3DP1* | 126 (100) | 144 (100) | 124 (100) | 20 (100) |
| *2DL4* | 125 (99.2) | 144 (100) | 124 (100) | 20 (100) |
| *2DP1* | 122 (96.8) | 143 (99.3) | 123 (99.2) | 20 (100) |
| *2DL1* | 118 (93.7) | 138 (95.8) | 119 (96.0) | 19 (95.0) |
| *2DL2* | 76 (60.3) | 92 (63.9) | 78 (62.9) | 14 (70.0) |
| *2DL3* | 108 (85.7) | 130 (90.3) | 111 (89.5) | 19 (95.0) |
| *2DL5* | 82 (65.1) | 77 (53.5) **p=0.053, OR 0.62[0.37-1.04]** | 67 (54.0) | 10 (50.0) |
| *2DL5A* | #42 (34.7) | 52 (36.1) | 45 (36.3) | 7 (35.0) |
| *2DL5B* | #40 (45.5) | 44 (30.6) **p=0.022, OR 0.53[0.29-0.95]** | 42 (33.9) | **2 (10.0) p=0.003, OR 0.13[0.02-0.63]** |
| *2DS1* | 57 (45.2) | 59 (41.0) | 53 (42.7) | 6 (30) |
| *2DS2* | 82 (65.1) | 91 (63.2) | 77 (62.1) | 14 (70.0) |
| *2DS3* | 48 (38.1) | 46 (31.9) | 42 (33.9) | 4 (20.0) |
| *2DS4* | 116 (92.1) | 136 (94.4) | 116 (93.5) | 20 (100) |
| *2DS4norm* | ##18 (20.2) | 43 (29.9) | 35 (28.5) | 8 (40.0) |
| *2DS4del* | ##70 (78.7) | 125 (86.8) | 107 (86.3) | 18 (90.0) |
| *2DS5* | 48 (38.1) | 46 (31.9) | 40 (32.3) | 6 (30.0) |
| *3DS1* | 60 (47.6) | 53 (36.8) **p=0.072,** | 47 (37.9) | 6 (30.0) |

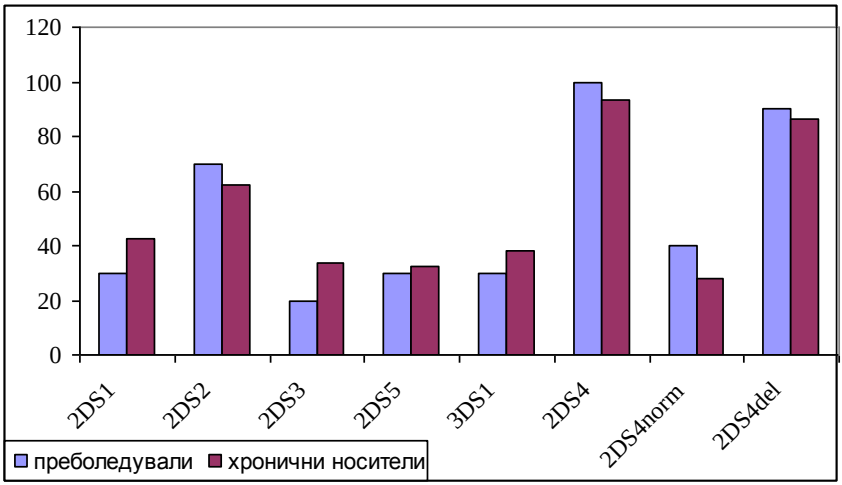
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **OR 0.64[0.38-1.07]** | | |
| *3DL1* | 114 (90.5) | 134 (93.1) | 114 (91.9) | 20 (100) |
| *3DL1*004* | '13 (17.6) | 46 (32.2) **p=0.022, OR 2.23[1.06-4.74]** | **41 (33.1) p=0.018, OR 2.3[1.1-4.7]** | 5 (26.3) |

# n=85, ## n=89, ' n=74, * статистически достоверна разлика при сравняване на групата пациенти със здрави неродствени контроли, [] 95 % интервал на достоверност

В съответствие с вече установената по-висока честота на *3DL1*004* в общата група болни спрямо здравата популация, същата зависимост бе намерена и при сравнителния анализ между пациентите хронични носители на HBV и контролната група (33.1% vs. 17.6%, p=0.018). Независимо, че различията не достигат статистическа значимост и при преболедувалите (оздравели) индивиди *3DL1*004,* е с по-висока честота в сравнение с контролите. Изследваните оздравели от HBV инфекция се отличават от неродствените здрави индивиди по по-ниското разпространение на още една KIR алелна група - *KIR2DL5B* (10.0% vs. 45.5 %, p= 0.003).



**Б**




**Фиг. 15Честотно разпределение на KIRs сред пациентите, според персистиране на HBV инфекция: хронични носители и преболедували. А**: инхибиторни KIRs;**Б**: активиращи KIRs.

За да се определи дали има находки, свързани с риск за хронифициране на HBV инфекцията, беше направено сравнение на KIRs честотите между двете подгрупи болни: хронични носители и преболедували (оздравели), като се прие, че двете кохорти са изложени на общ рисков фактор на околната среда -HBV вирус (фиг. 15). Приложеният вътрегрупов анализ доказа достоверно най-ниска честота на разпределение на KIR2DL5B гена сред преболедувалите пациенти (10.0% vs. 33.9%, p=0.042; OR 0.2 [95%CI 0.05-1.05]).

### 4.2 KIR профили

Определените KIR профили според индивидуалния набор KIR гени на изследваните индивиди, показаха висока степен на вариации в двете групи – пациенти и здравите контроли. Като цяло, общите и за двете групи изследвани KIR профили, процентно съставляват по-голяма част от разнообразието им, а редките, формират по-малко от 1/9 от KIR генотипните вариации сред пациентите и контролите. Идентификационен номер на генотипа е определен в http://www.allelefrequencies.net/kir6001a.asp

Най-честият генотип и в двете групи е ID1, отговарящ на хомозиготност по група AKIR хаплотипи (ID1- *2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DS4, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DP1, 3DP1*), съответно 24.3% сред пациентите и 17.5% при контролите, следван от ID4 от не-AA генотипните комбинации - 18.6% в групата на

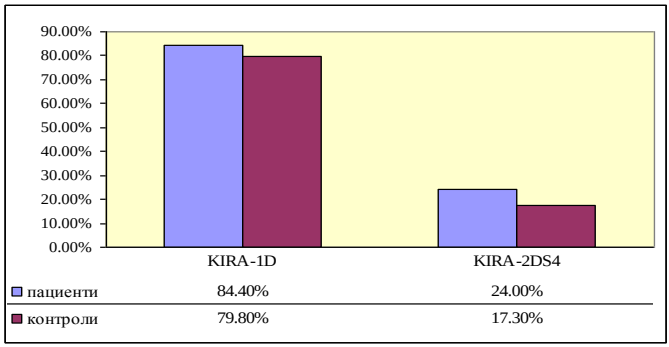
болните и ID5 (13.5%) сред неродствените здрави контроли. При сравнителен анализ между болни и здрави, генотип ID 2, който е изграден от всички известни активиращи KIRs, с изключение на *2DS2* и *2DS3* и от един инхибиращ рецептор (*KIR2DL2*), се среща с по-висока честота в контролите (13.5% vs. 5.6%, p=0.025; OR 0.38 [95%CI 0.14-0.85]).

Според А и В хаплотипната номенклатура, включените в настоящото проучване индивиди бяха класифицирани в двете групи - KIRAA или KIRBx (AB/BB), където АА генотипна комбинация представлява случаите, в които единственият активиращ рецептор е *KIR2DS4*, а всички останали KIR генотипи са приети за Bx. В сравнение с описаната вече честота на KIRA група хомозиготност, KIRBx комбинациите бяха доминиращи и за двете групи – болни и здрави, без да са наблюдавани различия между тях по отношение разпределението на KIRA и KIRB хаплотипи и техните комбинации (табл.20)

***Табл. 20*** **KIRA и B хаплотипи при пациенти с HBV инфекция (n=144) и здрави контроли (n=126).**

| **KIR хаплотип** | **Пациенти 2n(%)** | **Контроли 2n(%)** |
|---|---|---|
| KIRA | 179 (62.2) | 148 (58.7) |
| KIRB | 109 (37.8) | 104 (41.3) |
| AA | 70 (24.3) | 44 (17.5) |
| Bx | 218 (75.6%) | 208 (82.5) |

В двете анализирани групи моделът на KIR A хаплотипното разпределение беше сходен, доминиране на KIRA-1D в сравнение с KIRA-2DS4 (пациенти: 84.4% vs. 24.0% и здрави: 79.8% vs. 17.3% съответно, фиг.16).



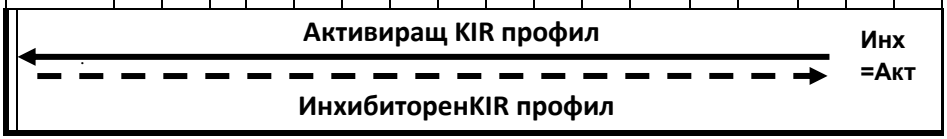

***Фиг.*16KIR A-1D и A-2DS4 хаплотипи при пациенти с HBV инфекция и здрави индивиди.**

Изчислено беше и съотношението от броя на активиращите към броя на инхибиращите KIRs в генотипа на всички индивиди включени в настоящата работа. Прилагайки този подход изключихме от анализа *KIR2DS4del*, тъй като те не кодират протеинова молекула.*KIR2DL4* беше причислен към групата на активиращите рецептори, въпреки,че данните за неговата функция са все още противоречиви. Стойностите на изчислените съотношения варира от 0.17 (преобладаване на инхибиторните KIR гени) до 1.20 (преобладаване на активиращите KIR гени) (табл.21 ). С най-висока честота сред здравите контроли беше представен генотип със съотношение 0.67 (4 активиращи/ 6 инхибиторни гени), като разликата между болните и здравите е статистически значима. Сред пациентите най-често срещана е KIR генната комбинация с отношение 0.2 (1 активиращи/ 5 инхибиторни гени), която е със значимо по-висока честота в сравнение с контролите. Интерес представлява и намерената тенденция за по-висока честота на индивидите със съотношение = 0.57 сред вирус инфектираните в сравнение с контролната група (8.3% vs. 3.2%, p=0.073; OR 2.77 [95% CI 0.8-10.5]).

Допълнително беше извършен анализ на разпределението на KIR профилите определени според броя на активиращите и инхибиторните KIR гени в отделните индивиди (табл.22). Установи се статистически значима разлика за KIR профил, съставен от шест активиращи гена, който е по-чест при контролите в сравнение с пациентите, както и тенденция за по-висока честота на KIR генотип съставен от четири активиращи KIR гени сред незасегнатите индивиди (болни vs. контроли: 16.0% vs. 25.8%, p=0.066; OR 0.55 [95% CI 0.27-1.1]).

***Табл. 21*Съотношение м/у активиращите и инхибиторните KIRs при пациентите с HBV (n=144) и здрави контроли (n=126).**

| **Съотношение акт./.инх:** | 0.17 | 0.2 | 0.33 | 0.4 | 0.43 | 0.5 | 0.57 | 0.6 | 0.67 | 0.71 | 0.75 | 0.8 | 0.83 | 0.86 | 1,0 | 1.17 | 1.2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Здрави n (%)** | 0 | 17 (13.5) | 7 (5.7) | 6 (4.6) | 10 (8.0) | 12 (9.3) | 4 (3.2) | 1 (0.8) | **30 (23.8)** | 7 (5.7) | 1 (0.8) | 1 (0.8) | 7 (5.7) | 10 (8.0) | 12 (9.3) | 0 | 1 (0.8) |
| **Пациенти n (%)** | 2 (1.38) | 26 (18.1) | 14 (9.7) | 11 (7.6) | 6 (4.2) | 16 (11.1) | 12 (8.3) | 1 (0.695) | **8 (5.6)** | 15 (10.4) | 1 (0.695) | 3 (2.1) | 10 (6.9) | 8 (5.6) | 9 (6.25) | 2 (1.38) | 0 |
| **p** | | ns | ns | ns | ns | ns | 0.073 | ns | **0.001** | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| **OR [95% CI]** | | | | | | | 2.77 [0.8-10.5] | | 0.2 [0.08-0.45] | | | | | | | | |




[] 95 % интервал на достоверност, ns- notsignificant, без статистическа значимост

***Табл. 22*KIR профили определени според броя на инхибиторните и активиращите KIRs при пациенти с HBV (n=144) и здрави контроли (n=126).**

| **Брой акт. KIR** | **Пациенти n (%)** | **Здрави n (%)** | **p** | **Брой инх. KIR** | **Пациенти n (%)** | **Здрави n (%)** | **p** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **7** | 5 (3.5) | 0 | ns | **7** | 44 (30.55) | 35 (27.8) | ns |
| **6** | **11 (7.6)** | **16 (18.0)** | **0.017** OR 0.4 [0.2-0.9] | **6** | 54 (37.5) | 53 (42.1) | ns |
| **5** | 28 (19.4) | 12 (13.5) | ns | **5** | 44 (30.55) | 35 (27.8) | ns |
| **4** | 23 (16.0) | 23 (25.8) | ns | **4** | 2 (1.4) | 3 (2.4) | ns |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **3** | 23 (16.0) | 17(19.1) | ns | | | | |
| **2** | 26 (18.1) | 9 (10.1) | ns | | | | |
| **1** | 28 (19.4) | 12 (13.5) | ns | | | | |

[] 95 % интервал на достоверност; ns- notsignificant, без статистическа значимост

В съответствие с нашата работна хипотеза, че генетичен дисбаланс между активиращи и инхибиращи KIR гени може да повлияе върху „поведението" на NKклетките в посока на понижена активация и/или повишена инхибиция и да способства за повишена антивирусна защита, е намерена слабо изразена тенденция за по-ниска честота на KIR3DS1 в групата на заболелите в сравнение със здравите контроли. Следователно KIR3DS1 допринася за повишена NK клетъчна антивирусна защита и предпазва от развитие на вирусна инфекция. Тези резултати са в унисон и с данните от сходно генетично-популационно проучване на Kibar и сътр. (174) проведено при спонтанно оздравели и хронични носители на HBV. Те установяват висока честота на KIR2DL3 и KIR3DS1 в контролната група и при пациентите със спонтанна ремисия. Така, че би могло да се дискутира идеята за протективен характер на двата гена KIR2DL3 и KIR3DS1 за HBV инфекцията. По същия начин, проучването на Gao и сътр. (259), сравняващо 182 хронични HBV пациенти с 140 здрави контроли, установи че KIR2DL3(+)/ C1(+) хомозиготността е протективна при HBV инфекция, а KIR2DL1(+)/C2(+) е предразполагащ за хронична HBV инфекция. Рецепторно-лигандната двойка KIR2DL3(+)/ C1(+) е протективна при HCV инфекция без анти-HCV антитела, но при ко-инфекция с ХИВ, тя губи своят протективен ефект (260). Висока честота на двойка KIR2DL3(+)/ C1(+) се наблюдава в пациенти, които преминават успешно интерферон-α базирана терапия в сравнение с тези които не постигат успешен терапертичен отговор, докато KIR2DL5 се асоциира с лош терапевтичен отговор (260). Zhi-ming и сътр. (261) установяват, че KIR2DS2 и KIR2DS3 са гени предразполагащи към хроничност при HBV, докато KIR2DS1, KIR3DS1 и KIR2DL5 могат да бъдат защитни гени, които улесняват изчистването от HBV в китайската популация (262). За разлика от последното проучване нашите резултати показват, че инхибиторния KIR2DL5 и неговия алелен вариант KIR2DL5B, логично свързани с по-висока инхибиторна NK-клетъчна функция, имат сигнификантно предразполагащ ефект за хроничност при HBV инфекцията. Тези резултати могат да се обяснят и с факта, че някои алели на KIR2DL5 се асоциират с KIR генотипи, съдържащи по-нисък брой активиращи рецептори. Следователно повишената честота на 2DL5B при хроничните носители на HBV може да се

приеме като индикатор за по-силна инхибиция и по-ниска активация, което вероятно е причина за понижена анти-HBV активност на NK и инсуфициентен противовирусен имунен отговор, резултиращо в хронифициране и персистиране на инфекциозния причинител.

Трябва да се отбележи и намерената тенденция за по-висока честота на активиращият KIR3DS1 в здравата популация срямо общата група на заболелите, който вероятно допринася за повишена NK клетъчна антивирусна защита и предпазване от развитието на вирусни инфекции. Установен е протективен ефект на този рецепторен ген и при развитието на вирусни инфекции, причинени от друг патоген – Human immunodeficiency virus (HIV). Генетичните анализи на популацията разкриха, че честотата и разпространението на KIR гени и хаплотипове варира спрямо етноса (263). Въпреки, че нашите изследвания и тези на "Zhi-Ming" са били извършени в различни популации, KIR3DS1 гена е установен като защитен и в двете проучвания. За ролята на KIR3DS1 като трансдюсер на повишена NK активация е и посочения му протективен ефект, асоцииран с хепатоцелуларен карцином (264).

В сравнение с описаната вече честота на KIRA група хомозиготност, KIRBx комбинациите са доминаращи и за двете групи – болни и здрави, без да са наблюдавани различия между тях по отношение разпределението на KIRA и KIRB хаплотипи и техните комбинации (табл. 23).

В по-широко проучване, Zhi-Ming" и сътр. (261). анализират KIR гените при 150 пациента с хронична HBV инфекция, 251 в спонтанна ремисия, и 451 здрави контроли. Те откриват по-ниска стойност на А и по-висока на В хаплотипа при хронични пациенти и спонтанно оздравели, в сравнение със здрави контроли, което определя хаплотип В като предразполагащ в китайската кохорта. Нашите резултати показват, че хаплотип А преобладава в двете групи пациенти и контроли. Противоположните резултати се обесняват с популационните различия между кавказката и азиатската кохорта. При кавказката популация доминира хаплотип А, а при азиатците В хаплотип.

Моделът на KIR А хаплотипното разпределение в двете анализирани групи: пациенти и контроли е сходен като доминира KIR A-1D, в сравнение с KIRA-2DS4. В неотдавнашно проучване, Пан и сътр., чрез мултивариационен регресионен анализ установяват, че комбинация от KIR2DS4 и KIR2DS4/1D е свързана с прогресията на заболяването през цироза към развитие на хепатоцелуларен карцином, независимо от влиянието на други активиращи KIR рецептори, като KIR 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5и 3DS1.

Въпреки, че KIR2DS4 се причислява към групата на активиращите рецептори от имуноглобулиновото семейство и следователно би трябвало да е медиатор на засилена NK клетъчна антивирусна защита, липсата на информация за неговата лигандна специфичност и за значението му в регулацията на NK, затрудняват значително интерпретацията на получените резултати. Тези данни, недвусмисленно доказват сложността на KIR-рецепторната генна система и необходимостта от по-задълбочени и продължителни проучвания.

Независимо от голямото разнообразие в честотата на индивидуалните KIR и вариабилността на формираните от тях KIR хаплотипни комбинации в световен мащаб (265), съществуват и ясни сведения за наличието на някои общи характеристики на KIR генотипите (266). Определихме 41 различни KIR генотипа, като 23 от тях се срещат в двете групи. Най-честият генотип за двете групи е KIR генотип с ID1 (24,3% при пациентите и 17.5 % при контролите), кореспондиращ на хомозиготно носителство на група A KIR хаплотипи (KIRAA). Този генотип е представен с най-висока честота и в други не кавказки популации като; чехи (25.6%) (267), македонци (21.5%) (268), италианци (28.6%) (269), ирландци (35.1%) (270). Установените KIR хаплотипни комбинации в изследваните здрави контроли показват доминиране на група A KIR хаплотипи в българската, подобно на други кавказки и не кавказки популации – корейци (271), японици (272). Докато групата на KIR B хаплотипите са по-често срещани в Южна Азия, афро-карибския и северно-индийския региони (273). Тези данни за доминантно разпространение на инхибиторните KIRгени и група A KIR хаплотипи в нашата и други кавказки популации са в подкрепа на предположението за позитивна селекция на инхибиторните KIRs в човешката популация и по-специално в тези от кавказки произход. Логично е инхибиторните KIR, чиято основна функция е предпазване на организма от автолиза, да се запазват еволюционно. Според една от теориите в популациите с предимно активиращ KIR генен профил (австралийски аборигени, южно-азиатски, афро-карибски и северно-индийски региони), по-честата атака на организма от различни патогени на околната среда - вируси и паразити, е наложила необходимостта от еволюционно запазване на активиращите KIR генни профили, осигуряващи по-бърза и силна първична защита на организма, медиирана от NK клетките.

В подкрепа на хипотезата, че генетичен дисбаланс между активиращи и инхибиращи KIR гени може да повлияе „поведението" на NK клетките в посока на понижена активация и/или повишена инхибиция и да способства за развитието на вирусни инфекции, е намерената противоположна болестна асоциация на два KIR генотипи, дефинирани въз основа на съотношението от броя на инхибиторните към броя на активиращите KIRs. Двата генотипа са изградени от еднакъв брой активиращи KIRs, но различен брой

инхибиторни KIR, което определя различната им функционална активност. KIR генотип със съотношение 0.57 (4 активиращи KIRs/7 инхибиторни KIRs) с предимно инхибиторен NK-клетъчен потенциал е предразполагащ, а KIR генотип със съотношение 0.67 (4 активиращи KIRs/6 инхибиторни KIRs) с по-слаба инхибиторна NK-клетъчна активност е протективен за развитието на HBV инфекция. Допълнително KIR профил съставен от шест активиращи KIRs, който се приема за медиатор на силни активиращи NK-рецепторни сигнали също е установен с протективен ефект. По-високата честота на KIR профил ID2 сред здравите контроли може да се разглежда в посока на по-висока вирусна резистентност в контекста на характерния за него липсващ KIR2DL2, но вприсъствие на KIR2DL3алелния му вариант, който е трансдусер на по-слаби инхибиторни сигнали и следователно се асоциира с по-слаба инхибиторна активност и повишена противовирусна NK-клетъчна функция.

Известно е, че NK клетките са първата линия на защита срещу вирусни инфекции. Но все още обект на дискусии е до каква степен имуногенетичните фактори, свързани с NK клетъчната фунция биха могли да допринесат за успешно елиминиране или за персистиране и хронифициране на вирусната инфекция. Намираме се в период на интензивно разработване на имуномодулираща терапия, насочена към ефективно и безопасно модулиране на противовирусните имунни отговори. Обнадеждаващи терапевтични резултати са получени не само в експериментални модели, но и при пациенти. Това обуславя необходимостта от по-нататъшни проучвания върху инхибиращите и активиращите клетъчни пътища, за да могат да се установят точните механизми на изплъзване от вродения и адаптивния имунен надзор, използвани от различни видове вируси, за да се приложат тези познания в клиничната практика. В тази насока манипулирането на NK клетъчната активност в посока на повишена активация или намалена инхибиция, или чрез двете, може да стимулира ефективен NK клетъчен имунен отговор срещу вирусно инфектирани клетки и да разкрие нови перспективи за имунотерапията в допълнение на специфичната антивирусна терапия, с цел по-бързо и ефективно ранно елиминиране на патогенния причинител, скъсяване периода на вирусно персистиране и свързаното с него хронично носителство и късни усложнения от вирусни инфекции.

## *5. Проучване на KIR / HLA лиганден полиморфизъм при група здрави индивиди от българската популация, хронично инфектирани и спонтанно оздравели пациенти.*

### 5.1 KIR лиганди

Лиганди за повечето KIR са специфични мотиви на HLA клас I молекулите. От особено значение за NK клетъчното разпознаване са полиморфните HLA-C молекули. Диморфизмът в HLA-Cα1 домейна, характеризиран от Ser77/Asn80 и Asn77/Lys80 дефинира серологично различни HLA-C групи - C1 и C2, които са лиганди за различни рецептори от KIR2DL и KIR2DS субфамилиите (274). Следователно, функционалната активност на тези рецептори ще зависи от HLA-C генотипа на индивида. За да проучим, дали инфектираните с хепатит В пациенти се различават от здравите индивиди по отношение на геномното представяне на предполагаемите KIR лиганди, извършихме сравнителен анализ в зависимост от присъствието на група 1 или 2 HLA-C алели. Анализът на KIR лигандите показа, че всички изследвани носят поне по един HLA-*C*лиганд (табл. 23). И в двете групи доминира HLA-*C1* алотипът, като сред болните процентната разлика в разпределението на двете групи HLA-C лиганди е почти незначителна, което резултира в статистически значима по-висока честота на HLA-C2 лигандната група сред болни в сравнение със здрави контроли (71.5% vs. 66.4%, p=0.04; OR 0.53 [95% CI 0.27-1.03]) .

Разпределението на отделните HLA-*C*алотипни комбинации (табл. 23)показа някои особености. Подобно на здравите сред вирус инфектираните пациенти в най-голям процент са представени хетерозиготните носители на HLA–C лиганди (*C1C2* – 44.4%, 50.4%, болни и здрави съответно). Сред пациентите хомозиготните индивиди по група *C1* и група *C2* са приблизително равни (*C1C1* – 29.2%, *C2C2*- 26.4% ), докато в здравата популация по-често срещани са хомозиготните носители на C1 (*C1C1* – 32.7%), а *C2* хомозиготните индивиди (*C2C2*) се срещат по-рядко (17.0%). Въпреки, че честотата на HLA-*C* лигандните профили е различна за двете групи, не се установиха статистически значими различия асоциирани със заболяването. Единствено беше наблюдавана тенденция за по-висока честота на хомозиготни носители на C2 лиганди сред болните в сравнение със здравите контроли (26.4% vs. 17.0%, p=0.07; OR 1=75 [95% CI 0.91-3.41]).

***Табл*. 23Разпределение на група 1 и група 2 HLA-C алелите при пациенти с HBV инфекция и здрави индивиди.**

| | **Пациенти (n=144)n (%)** | **Контроли (n=113)n (%)** | **p** |
|---|---|---|---|
| ***HLA-C1*** | 106 (73.6) | 95 (84.1) | ns |
| ***HLA-C2*** | 103 (71.5) | 75 (66.4) | **0.044** OR 1.27 [0.27-1.03] |
| ***HLA-C1C1*** | 42 (29.2) | 37 (32.7) | ns |
| ***HLA- C1C2*** | 64 (44.4) | 57 (50.4) | ns |
| ***HLA-C2C2*** | 38 (26.4) | 19 (17.0) | ns |

[ ] 95 % интервал на достоверност; ns- notsignificant, без *статистическа з*начимост

Разпределението на отделните HLA-*C* лигандни групи и алотипни комбинации сред пациентите, според персистиране на HBV инфекция (табл. 24 показа, че при хроничните носители на HBV честота на C1 група лиганди е най-ниска, като разликата е значима спрямо контролната здрава популация.

***Табл.*24Разпределение на група 1 и група 2 HLA-C алелите при пациентите, според персистиране на HBV инфекция и здравите индивиди**

| | **Контроли n=113 n (%)** | **Хронични носители n=124 n (%)** | **Преболедували n=20 n (%)** |
|---|---|---|---|
| ***HLA-C1*** | 95 (84.1) | 91 (73.4) **p. 0.046;** OR0.5 [0.28-0.99] | 15 (75.0) |
| ***HLA-C2*** | 75 (66.4) | 89 (71.8) | 14 (70.0) |
| ***HLA-C1C1*** | 37 (32.7) | 36 (29.0) | 6 (30.0) |
| ***HLA- C1C2*** | 57 (50.4) | 55 (44.4) | 9 (45.0) |
| ***HLA-C2C2*** | 19 (17.0) | 33 (26.6) | 5 (25.0) |

[] 95 % интервал на достоверност

В следваща стъпка беше определено разпределението на HLA клас I лигандите за *KIR3DL1/S1* (алели с *Bw4* мотив) при изследваните индивиди (табл.25), но не се установиха статистически значими различия между пациентите и здравите контроли, както и между групите на пациентите.

***Табл. 25*** **Разпределение на HLA-Bw4 лигандите, при пациентите с HBV инфекция и здравите индивиди.**

| | **Контроли** n (%) | **Пациенти** n (%) | **Хронични носители** n (%) | **Преболедували** n (%) |
|---|---|---|---|---|
| *HLA- $B^{Bw4}$* | 84 (74.3) | 57 (65.3) | 83 (66.9) | 11 (55.0) |
| *HLA- $A^{Bw4}$* | 32 (33.7) | 57 (39.6) | 48 (38.7) | 9 (45.0) |

[ ] 95 % интервал на достоверност; ns- notsignificant, без статистическа значимост

HLA-B алотипи с Bw4 мотив на позиция 77-83 са лиганди за инхибиращия KIR3DL1 (p70) [9, 10]. Според най-новите проучвания KIR3DL1 разпознава и някои HLA-A алели с Bw4 мотиви (121). Афинитетът на свързване между рецептор и лиганд варира в зависимост от аминокиселинния остатък на 80-та позиция в HLA молекулата и е по-силен, когато HLA-Bw4 алелите имат изолевцин на 80-та позиция (Ile80) в сравнение с тези, при които на същата позиция е аминокиселината треонин (Thr80) (117).

***Табл. 26*** **Разпределение на HLABw4 лигандите, при пациентите с HBV инфекция и здравите индивиди в зависимост от АК на позиция 80.**

| | **Контроли** n (%) | **Пациенти** n (%) | **Хронични носители** n (%) | **Преболедували** n (%) |
|---|---|---|---|---|
| *HLA-$Bw4^{Ile80}$* | 72 (63.7) | 68 (47.2) **p=0.008;** OR 0.51 [0.3-0.9] | 62 (50.0) **p=0.033;** OR 0.5 [0.3-0.99] | 6 (30.0) **p=0.005;** OR 0.24 [0.09-0.7] |
| *HLA-$Bw4^{Thr80}$* | 9 (8.0) | 28 (15.3) | 18 (14.5) | 4 (20.0) |
| *HLA-$Bw4^{Ile80Thr80}$* | 3 (2.7) | 4 (2.8) | 3 (2.4) | 1 (5.0) |

[ ] 95 % интервал на достоверност

При определено разпространение на HLA-Bw4, според присъствието на Ile80 или Thr80 на посочената позиция (табл.26), се наблюдават различия в честотата на индивидите носещи HLA-*Bw4* алел с аминокиселината изолевцин на 80 позиция (HLA- $Bw4^{Ile80}$). Техният процент е статистически значимо по-нисък при пациентите с хепатит В вирусна инфекция в сравнение с контролната група (47.2% v.s. 63.7%, p=0.008).Тази разлика е обусловена от намалена честота на HLA-$Bw4^{Ile80}$ позитивните индивиди в двете подгрупи HBV инфектирани, сформиращи общата група болни, но е по-силно изразена при преболедувалите от HBV, при които HLA-$Bw4^{Ile80}$позитивността е едва 30.0% (преболедували vs. здрави: 30.0% vs. 63.7%, p=0.005). Анализът на резултатите между двете групи болни показва, че установената тенденция е запазена като такава и при сравнението на хроничните носители спрямо преболедувалите пациенти (хронични носители vs. преболедували: 50.0% vs. 30.0%, p=0.076).

### 5.2 KIR/ HLA лигандни комбинации

Ефекторната функция на NK рецепторите е резултат от сложната взаимовръзка и баланса между проведените активационни и инхибиторни сигнали при тяхното специфично свързване със съответните им лиганди. Предполагайки, че двойката KIR/HLA лиганд оказва влияние върху функцията на NK клетките, логична следваща стъпка беше да се оцени разпределението на възможните комбинации в сравняваните групи, базирайки се на известните KIR/HLA лиганди взаимодействия. От анализа са изключени рецепторно-лигандни двойки, които не се срещат в никоя от изследваните проби (честота = 0%), както и такива, които са без функционална значимост (отрицателен рецептор/отрицателен лиганд). Резултатите (табл. 27 и 28) показват статистически значими различия в честотата на инхибиторните рецептор/лигандните комбинации, в които участват KIR2DL2/L3 - по-висока честота на нефункциалната рецеторно-лигандна комбинация сред общата група болни [KIR2DL2/L3(+)/HLA-C1(-): 26.4% vs. 15.9%, болни vs. здрави] и тези с хроничен хепатит В [KIR2DL2/L3(+)/HLA-C1(-): 26.6% vs.15.9%, хронични HBV носители vs. здрави] за сметка на по-висока честота на функционално значимия KIR лиганден генотип в групата на здрави контроли [KIR2DL2/L3(+)/HLA-C1(+): 73.6% vs. 84.1%, болни vs. здрави; 73.4% vs. 84.1%, хронични носители vs. здрави]. В активиращите рецепторно-лигандни двойки със сигнификантно различно разпределение присъства *KIR3DS1*. Установена е по-ниска честота на *KIR3DS1(+)/HLA-*$A^{Bw4}$*(-)* комбинация сред общата група на заболелите, както и при пациентите с персистираща HBV инфекция, сравнявайки ги със случайно подбраните неродствени контроли (22.2% vs.

35.8% - болни спрямо здрави и 22.6% vs.35.8% - хронични носители спрямо здрави). Преболедувалите индивиди се различават от здравите контроли единствено по носителството на *KIR3DL1(+)/HLA-B$^{Bw4}$ (-)* [45.0% vs. 22.1%].

***Табл. 27*Инхибиращ KIR/лиганд комбинации при пациентите HBV инфекция и здравите индивиди.**

| **KIR/ лиганд*** | **Контроли** n (%) | **Пациенти** n (%) | **Хронични носители** n (%) | **Преболедували** n (%) |
|---|---|---|---|---|
| *2DL1(+)/ HLA-C2 (+)* | 67 (59.3) | 100 (69.4) | 86 (69.4) | 14 (70.0) |
| *2DL1(+)/ HLA-C2 (-)* | 38 (33.3) | 38 (26.4) | 33 (26.6) | 5 (25.0) |
| *2DL1(-)/ HLA-C2 (+)* | 8 (7.1) | 3 (2.1) | 3 (2.4) | 0 |
| *2DL2/L3(+)/HLA-C1 (+)* | 95 (84.1) | 106 (73.6) **p=0.044,** OR 0.53 [0.27-1.03] | 91 (73.4) **p=0.046,** OR 0.52 [0.28-0.99] | 15 (75.0) |
| *2DL2/L3(+)/ HLA-C1 (-)* | 18 (15.9) | 38 (26.4) **p=0.044,** OR 1.89 [0.97-3.71] | 33 (26.6) **p=0.046,** OR 1.9 [1.0-3.6] | 5 (25.0) |
| *3DL1(+)/ HLA-B$^{Bw4}$ (+)* | 77 (68.1) | 87 (60.4) | 76 (61.3) | 11 (55.0) |
| *3DL1(+)/HLA-B$^{Bw4}$ (-)* | 25 (22.1) | 47 (32.6) | 38 (30.6) | 9 (45.0) **p=0.031**, OR 2.8 [01.1-7.7] |
| *3DL1(-)/HLA-B$^{Bw4}$ (+)* | 7 (6.2) | 7 (4.9) | 7 (5.6) | 0 |
| *3DL1(+)/HLA-A$^{Bw4}$ (+)* | 28 (29.5) | 51 (35.4) | 42 (33.9) | 9 (45.0) |
| *3DL1(+)/HLA-A$^{Bw4}$ (-)* | 57 (60.0) | 83 (57.6) | 72 (58.1) | 11 (55.0) |
| *3DL1(-)/HLA-A$^{Bw4}$ (+)* | 4 (4.2) | 6 (4.6) | 6 (4.8) | 0 (0) |

[ ] 95 % интервал на достоверност; *KIR/HLA лигандни комбинации, които не са идентифицирани в никоя от изследваните групи не са представени.

***Табл. 28*** **Активиращ KIR/лиганд комбинации, при пациентите с HBV инфекция и здравите индивиди.**

| **KIR/лиганд*** | **Контроли** n (%) | **Пациенти** n (%) | **Хронични носители** n (%) | **Преболедували** n (%) |
|---|---|---|---|---|
| *2DS1(+)/ HLA-C2 (+)* | 33 (29.2) | 41 (28.5) | 37 (29.8) | 4 (20.0) |
| *2DS1(+)/ HLA-C2 (-)* | 18 (15.9) | 18 (12.5) | 16 (12.9) | 2 (10.0) |
| *2DS1(-)/ HLA-C2 (+)* | 42 (37.2) | 62 (43.1) | 52 (41.9) | 10 (50.0) |
| | | | | |
| *2DS2(+)/ HLA-C1 (+)* | 60 (53.1) | 66 (45.8) | 56 (45.2) | 10 (50.0) |
| *2DS2(+)/ HLA-C1 (-)* | 12 (10.6) | 25 (17.4) | 21 (16.9) | 4 (20.0) |
| *2DS2(-)/ HLA-C1 (+)* | 35 (31.0) | 40 (27.8) | 35 (28.2) | 5 (25.0) |
| | | | | |
| *3DS1(+)/ HLA-$B^{Bw4}$ (+)* | 38 (33.6) | 35 (24.3) | 32(25.8) | 3 (15.0) |
| *3DS1(+)/HLA-$B^{Bw4}$ (-)* | 18 (15.9) | 18 (12.5) | 15 (12.1) | 3 (15.0) |
| *3DS1(-)/ HLA-$B^{Bw4}$ (+)* | 46 (40.7) | 59 (41.0) | 51 (41.1) | 8 (40.0) |
| *3DS1(+)/ HLA-$A^{Bw4}$ (+)* | 15 (15.8) | 21 (14.6) | 19 (15.3) | 2 (10.0) |
| ***3DS1(+)/ HLA-$A^{Bw4}$ (-)*** | 34 (35.8) | 32 (22.2) **p=0.022,** OR 0.5 [0.28-0.95] | 28 (22.6) **p=0.032,** OR 0.5 [0.3-0.95] | 4 (20.0) |
| *3DS1(-)/ HLA-$A^{Bw4}$ (+)* | 17 (17.9) | 36 (25.0) | 29 (23.4) | 7 (35.0) |

[ ] 95 % интервал на достоверност. *KIR/HLA лигандни комбинации, които не са идентифицирани в никоя от изследваните групи не са представени.

В следващ етап бяха определени KIR/HLA клас I лигандните комбинации вземайки в съображение HLA клас I лиганда и съответната двойка инхибиторен/активиращ рецептор. Този подход позволява оценка на комплексното въздействие на инхибиращи и активиращи сигнали, проведени в резултат на специфично рецепторно-лигандно взаимодействие, в което участват рецептори с аналогична лигандна специфичност от една страна и

едновременно с антагонистична функционална активност. Резултатите са представени на табл. 29.

Една рецепторно лигандна двойка, в която е наличен само инхибиторния рецептор - *KIR3DL1(+)/3DS1(-)/HLA-B$^{Bw4}$(-)* е достоверно установена по-често във всички анализирани групи пациенти в сравнение със здравите контролите (22.2%, 21.0% и 30.0% vs. 9.7%, болни, хронични носители и преболедували vs. здрави контроли съответно). Друга комбинация, характеризираща се с наличие на лиганд без специфичния му инхибиторен и активиращ KIR – *KIR2DL1(-)/2DS1(-)/HLA-C2*(+), е представена с по-ниска честота сред общата група пациентиспрямо контролната група (0.7 % vs. 4.4%, p=**0.049,**OR 0.15 [95%CI 0.01-1.36]), като и в двете подгрупи болни същата е представена с по-ниска честота, дори 0% при преболедувалите, въпреки че значими разлики не се констатираха.

***Табл. 29*** **Инхибиращ/активиращ KIR/лиганд комбинации, при пациентите с HBV инфекция и здравите индивиди.**

| **KIR/ лиганд*** | **Здрави** | **Болни** | **Хронични носители** | **Преболедували** |
|---|---|---|---|---|
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| *2DL1(+)/2DS1(+)/HLA-C2(+)* | 30 (26.5). | 39 (27.1) | 35 (28.2) | 4 (20.0) |
| *2DL1(+)/2DS1(-)/HLA-C2(+)* | 37 (32.7) | 61 (42.4) | 51 (41.1) | 10 (50.0) |
| *2DL1(-)/2DS1(+)/HLA-C2(+)* | 3 (2.7) | 2 (1.4) | 2 (1.6) | 0 |
| ***2DL1(-)/2DS1(-)/HLA-C2(+)*** | 5 (4.4) | 1 (0.7)<br>**p=0.049,**<br>OR 0.15 [0.01-1.36] | 1 (0.8) | 0 |
| *2DL1(+)/2DS1(+)/HLA-C2(-)* | 18 (15.9) | 17 (11.8) | 15 (12.1) | 2 (10.0) |
| *2DL1(+)/2DS1(-)/HLA-C2(-)* | 20 (17.7) | 21 (14.6) | 18 (14.5) | 3 (15.0) |
| *2DL1(-)/2DS1(+)/HLA-C2(-)* | 0 | 1 (0.7) | 1 (0.8) | 0 |
| | | | | |
| *2DL2/L3(+)/2DS2(+)/HLA-C1(+)* | 60 (53.1) | 66 (45.8) | 56 (45.2) | 10 (50.0) |
| *2DL2/L3(+)/2DS2(-)/HLA-C1(+)* | 35 (31.0) | 40 (27.8) | 35 (28.2) | 5 (25.0) |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *2DL2/L3(+)/2DS2(+)/HLA-C1(-)* | 12 (10.6) | 25 (17.4) | 21 (16.9) | 4 (20.0) |
| *2DL2/L3(+)/2DS2(-)/HLA-C1(-)* | 6 (5.3) | 13 (9.0) | 12 (9.7) | 1 (5.0) |
| | | | | |
| *3DL1(+)/3DS1(+)/HLA-B$^{Bw4}$(+)* | 31 (27.4) | 28 (19.4) | 25 (20.2) | 3 (15.0) |
| *3DL1(+)/3DS1(-)/HLA-B$^{Bw4}$(+)* | 46 (40.7) | 59 (41.0) | 51 (41.1) | 8 (40.0) |
| *3DL1(-)/3DS1(+)/HLA-B$^{Bw4}$(+)* | 7 (6.2) | 7 (4.9) | 7 (5.6) | 0 |
| *3DL1(+)/3DS1(+)/HLA-B$^{Bw4}$(-)* | 14 (12.4) | 15(10.4) | 12 (9.7) | 3 (15.0) |
| ***3DL1(+)/3DS1(-)/HLA-B$^{Bw4}$(-)*** | **11 (9.7)** | **32 (22.2) p=0.008,** OR 2.65 [1.2-5.9] | **26 (21.0) p=0.017,** OR 2.46 [1.2-5.3] | **6 (30.0) p=0.023,** OR 3.97 [1.3-12.4] |
| *3DL1(-)/3DS1(+)/HLA-B$^{Bw4}$(-)* | 4 (3.5) | 3 (2.1) | 3 (2.4) | 0 |
| | | | | |
| *3DL1(+)/3DS1(+)/HLA-A$^{Bw4}$(+)* | 11 (11.6) | 15 (10.4) | 13 (10.5) | 2 (10.0) |
| *3DL1(+)/3DS1(-)/HLA-A$^{Bw4}$(+)* | 17 (17.9) | 36 (25.0) | 29 (23.4) | 7 (35.0) |
| *3DL1(-)/3DS1(+)/HLA-A$^{Bw4}$(+)* | 4 (4.2) | 6 (4.2) | 6 (4.8) | 0 |
| *3DL1(+)/3DS1(+)/HLA-A$^{Bw4}$(-)* | 28 (29.5) | 28 (19.4) | 24 (19.4) | 4 (20.0) |
| *3DL1(+)/3DS1(-)/HLA-A$^{Bw4}$(-)* | 29 (30.5) | 55 (38.2) | 48 (38.7) | 7 (35.0) |
| *3DL1(-)/3DS1(+)/HLA-A$^{Bw4}$(-)* | 6 (6.3) | 4 (2.8) | 4 (3.2) | 0 |

*KIR/HLA лигандни комбинации, които не са идентифицирани в никоя от изследваните групи не са представени, ns- notsignificant, без статистическа значимост.

Участието на NK клетките в противовирусната защита на организма е безспорно. Правдоподобно е да се предположи, че полиморфизми в KIRs и техните HLA клас I лиганди, предетерминиращи на генно ниво NK клетъчната функционална активност в посока на повишена инхибиция и/или понижена активация, може да благоприятстват изплъзването на вирус инфектираните клетки от вродения имунен надзор и да участват пряко в патогенезата и развитието на вирусни инфекции, както и в механизмите на вирусна персистенция и хронифициране на инфекциозното заболяване. По отношение на взаимодействията между KIR и HLA лиганди, предишни изследвания подчертават значението им за вирусните инфекции (274-276).

Въпреки това, малко е известно за комбинации KIR/HLA-C при хроничния хепатит B. Данните за ролята на KIR генния фон за възприемчивостта, оздравяването или хронифицирането на инфекцията с HBV сред населението са оскъдни и противоречиви (261, 277). В достъпната ни литература открихме малък брой проучвания на KIR/лигандния полиморфизъм при хепатит B (259).

Разпределението на отделните HLA-C лигандни групи и алотипни комбинации сред пациентите и здравите контроли показа, че при хроничните носители на HBV честотата на C1 група лиганди е най-ниска, като разликата е значима спрямо контролната здрава популация. Това опрелеля носителството на HLA-C2 лиганди като предразполагащи, а HLA-C1 лигандната група като протективна за развитието на хроничен хепатит. В съответствие с нашите резултати Gao и сътр. (259) провеждат изследване на азиатската популация и установяват, по-висока честота на HLA-C2 лигандна група при пациентите с хронична инфекция. Те са направили сравнителен анализ въз основа на присъствието или отсъствието на HLA-C1 или HLA-C2 лиганди. Индивидите хомозиготни за HLA-C1(C1C1) лиганди са по-рядко срещани в групата на пациентите (43,4% vs.57.9%, p = 0.01; OR = 0.56; 95% CI, 0.36-0.87) в сравнение с контролната група. Пациентите, носещи само HLA-C2(C2C2) алели (10,4% срещу 5,0%) и тези, които имат и двете HLA-C1C2 алели (46.2% срещу 37.1%) са били по-чести при сравнение със здрави индивиди, но не са достигнали статистическа сигнификантност. Популационно генетични анализи показват, че честотата и разпределение на KIR гени и хаплотипове, варират при различните етноси. Тази вариабилност на KIR фенотипните честоти в различните етнически групи от населението могат да бъдат свързани с целеви NK клетъчни отговори към различни инфекционни причинители (259).

Предразполагащият ефект на HLA клас I лигандната група HLA-C2 и противоположно протективният ефект на HLA-C1, вероятно са свързани с функционално значимо инхибиторно KIR/лигандно взаимодействие, което е в подкрепа на ролята на HLA клас I лигандния полиморфизъм за регулацията на NK-медиирания противовирусен имунен надзор. Известно е, че съществува йерархия в силата и афинитета на KIR/HLA лигандното свързване от инхибиторните KIR, взаимодействащи с HLA-C лигандите. Най-силен сигнал се предава от KIR2DL1, следван от KIR2DL2 и най-слаб от KIR2DL3. Допълнително инхибиторните KIR са с по-голям афинитет на свързване в сравнение с активиращите им аналози. Обобщено може да се предположи, че по-високата честота на HLA-C2 позитивни индивиди при болните, съответства на по-силна HLA-C2 медиирана NK клетъчна инхибиция, опосредствена от KIR2DL1 рецепторно взаимодействие и обратно, протективният ефект на HLA-C1, свързващ KIR2DL2/L3, вероятно се асоциира с по-слабаинхибиция и по-силна противовирусна активност.

Установи се функционално значим генотип с протективна роля за развитие на HBV инфекцията - KIR2DL2(+)/HLA-C1(+), който вероятно е в съответствие с описаната вече по-високата честота на HLA-C1 лиганди сред здравите контроли. Gao и сътр. (259) също установяват KIR2DL3 или KIR2DL3 хомозиготност в присъствието на HLA-C1C1 генотип, като протективен при хронична HBV инфекция.

Независимо, че механизмите за регулиране на NK клетъчната функция не са напълно изяснени е известно, че MHC клас I молекулите като основни лиганди, влияят върху инхибирането и активирането на NK клетките, чрез KIR специфично разпознаване. По този начин индивидуалните HLA-C, HLA-B/$A^{Bw4}$ и HLA-A алотипи са пряко свързани с функцията съответно на KIR2D и KIR3D рецепторите, което изисква анализ на KIR в контекста на съответните им лиганди.

При определяне разпространението на HLA-Bw4, според присъствието на Ile80 или Thr80 на посочената позиция се установиха различия в честотата на индивидите носещи HLA-Bw4 алел с аминокиселината изолевцин на 80 позиция (HLA- $Bw4^{Ile80}$ ). Техният процент беше статистически значимо по-нисък при пациентите с хепатит В вирусна инфекция в сравнение с контролната група (47.2% v.s. 63.7%, p=0.008). Тази разлика е обусловена от намалена честота на HLA- $Bw4^{Ile80}$ позитивните индивиди в двете подгрупи HBV инфектирани, сформиращи общата група болни, но е по-силно изразена при преболедувалите от HBV, при които HLA- $Bw4^{Ile80}$ позитивността е едва 30.0 % (преболедували vs. здрави: 30.0% vs. 63.7%, p=0.005). Анализът на резултатите между двете групи болни показа, че установената тенденция е запазена като такава и при сравнението на хроничните носители спрямо преболедувалите пациенти (хронични носители vs. преболедували: 50.0% vs. 30.0%, p=0.076). Поради значително по-ниската честота на KIR3DS1 в сравнение с KIR3DL1 и известният по-голям афинитет на свързване на инхибиторните KIRs в сравнение с активиращите им аналози, може да се предположи, че експресията на HLA-Bw4 лиганди има значение по-скоро за поддържане на NKклетките в състояние на хипореактивност, отколкото да допринася за тяхната активация, чрез KIR3DS1/HLA-$B^{Bw4}$взаимодействие. Освен това, други изследвания показват, че HLA-Bw4 алел с аминокиселината изолевцин на 80 позиция, който се свързва с по-висок афинитет с инхибиторния KIR3DL1, отколкото HLA-Bw4 алела с треонин на същата позиция намалява цитотоксичния потенциал на NK клетките и увеличава риска от HCC честота (224). Следователно активираните NK клетки участват в HBV асоцирани усложнения като HCC, което от своя страна показва ролята на генетичния фонд на гостоприемника -KIR и HLA. Пан и сътр. установяват, че конбинацията от HLA-C1C1 хомозиготност, HLA-

$Bw4^{Ile80}$ позитивност и KIR2DS4 (KIR2DS4 /dell) са свързани с увеличаване риска за развитие на HCC.

При анализиране на KIR/HLA клас I лигандните комбинации се установи, че всеки от изследваните индивиди притежава поне една функционална рецепторна-лигандна двойка, в която участва KIR с инхибиращ потенциал. Този факт не е ново откритие, а потвърждава есенциалното значение на KIRxDLx/HLA клас I лигандното взаимодействие в регулацията на NK клетъчната автоцитотоксичност.

Установените асоциации на KIR/HLA клас I лигандните генотипи: KIR3DS1(+)/HLA-ABw4(-),KIR2DL1(-)/2DS1(-)/HLA-C2(+), KIR2DL2(+)/HLA-C1(-), KIR3DL1(+)/3DS1(-)/HLA-BBw4(-) са трудни за интерпретация, тъй като това са функционално инертни генотипни комбинации, в които липса свързващия лиганд или неговият специфичен рецептор и те не би следвало да имат отношение върху болестната предразположеност като регулатори на NK клетъчната антивирусна активност.

Обобщавайки получените резултати, както и наличните, макар и оскъдни данни в литературата, може да се допусне, че генетично обусловените профили на KIRи KIR/лигандните комбинации от една страна и от друга страна епистатични взаимодействия между определени HLA и KIR хаплотипи могат да допринесат за генерирането на динамичен имунен отговор, осигуряващ успешното елиминиране на вирус инфектираните клетки или за превалирането на инхибиторни KIR фенотипи и KIR/лигандни комбинации, благоприятстващи изплъзване от имунния контрол и представляващи рисков генетичен профил. Все още обаче точният механизъм на действие на активиращите и инхибиторните рецептори остава неизяснен. На базата на литературните данни се предлагат различни модели на взаимодействие на KIR и HLA генетичните системи при NK клетъчно разпознаване и елиминиране на вирусно инфектирани клетки, което налага по-обстойни функционални изследвания за изясняване на биологичната роля на KIR в инфекциозния имунитет.

## V. ОБОБЩЕНИЕ

Днес се счита, че полиморфизмът на KIR и HLA гените, кодиращи молекулите на имунния отговор, може да определя предразпожеността и развитието на инфекциозни заболявания. Специфични HLA алели се асоцират с вирусна устойчивост или персистиране. Нашето изследване се проведе, за да се определи връзката на имуногенетичният профил на

гостоприемника (HLA алели, KIR алели, HLA хаплотипи и KIR/лигандни комбинации) с изхода от HBV инфекция при българското население.

Проучването на HLA гените показа, че предразполагащи за хронифициране на инфекцията в нашата популация са алелните групи: HLA-B*08, B*35 , HLA-DRB1*03, докато DRB1*13 е със значимо понижена честота. Установиха се статистически достоверни повишени честоти на HLA-A*25 и B*44 алелни групи при пациенти, оздравели от инфекцията в сравнение с тези с хронична инфекция и контролната група. Значително повишена е честотата на HLA- A*01-B-08*DRB1*03 хаплотипа при пациентите с хронична инфекция.

Разпределението на изследваните KIR гени и алелни варианти при пациентите с HBV инфекция като цяло не се отличава съществено от това на здравите индивиди от българската популация.

Намерената тенденция за по-висока честота на активиращият KIR3DS1 в здравата популация срямо общата група на заболелите вероятно допринася за повишена NK клетъчна антивирусна защита и предпазване от развитието на вирусни инфекции.

Нашите резултати показват, че инхибиторния KIR2DL5 и неговия алелен вариант KIR2DL5B, логично свързани с по-висока инхибиторна NK-клетъчна функция, имат сигнификантно предразполагащ ефект за хроничност при HBV инфекция.

Установена бе също по-висока честота на функционално инертния вариант на KIR3DL1 гена (KIR3DL1*004) сред болните. Беше наблюдавана и слабо изразена тенденция за по-нисък процент на KIR2DL5 (като цяло) и на KIR3DS1 позитивни индивиди в групата на заболелите сравнено със здравите контроли.

Най-честият генотип и в двете групи (здрави контроли и пациенти) е ID1, отговарящ на хомозиготност по група AKIR хаплотипи (ID1- *2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DS4, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 2DP1, 3DP1*).

Предразполагащият ефект на HLA-C2 лигандната група и противоположно протективният ефект на HLA-C1, вероятно са свързани с функционално значимо инхибиторно KIR/лигандно взаимодействие, което е в подкрепа на ролята на HLA клас I лигандния полиморфизъм за регулацията на NK-медиирания противовирусен имунен надзор. Обобщено може да се предположи, че по-високата честота на HLA-C2 позитивни индивиди при болните съответства на по-силна HLA-C2 медиирана NK-клетъчна инхибиция, опосредствена от KIR2DL1 рецепторно

взаимодействие и обратно, протективният ефект на HLA-C1, вероятно се асоциира с по-слаба инхибиция и по-силна противовирусна активност.

Единственият функционално значим генотип с протективна роля за развитие на HBV инфекция е KIR2DL2/L3(+)/HLA-C1(+), който вероятно е следствие от описаната вече по-високата честота на HLA-C1 лиганди сред здравите контроли.

Въз основа на нашите резултати бихме могли да приемем, че имуногенетичният профил от HLA, KIR иKIR/лигандни комбинации, установен при пациенти с хроничен хепатит В, в сравнение със здравите контроли и оздравели индивиди, предразполага към персистиране на вирусната инфекция и насочва към възможна роля на изброените генетични системи за хронифициране на инфекцията с HBV.

## VI. ИЗВОДИ

1. Въведеният, оптимизиран и валидиран метод за количествено определяне на HBV-ДНК, чрез използване на RealTime PCR метод, е надежден и може да се използва рутинно в лабораторната практика.
2. Потвърди се, че най-честия генотип сред пациентите от български произход е генотип D.

3. Установиха се сигнификантни HLA асоциации с изхода от HBV инфекция в българската популация:

А. Предразполагащи за хронифициране на инфекцията са алелните групи: HLA-B*08, B*35, DRB1*03.

Б. Протективни за хронифициране на инфекцията се установиха алелните групи:HLA-A*25, B*44, DRB1*13.

В. Предразполагащи за хронифициране на инфекцията са хаплотипите: A*01-B*08-DRB1*03, A*24-B*35-DRB1*11.

4. Установиха се HLA алели и хаплотипи свързани с незадоволителен и добър отговор при лечение на хронично инфектирани пациенти с нуклеозидни/нуклеотидни аналози.

А. Инхибиторния KIR2DL5B, пряко свързан с по-висока инхибиторна NK - клетъчна функция, е предразполагащ за хронифициране на инфекцията.

Б. KIR генотип със съотношение 0.57 (4 активиращи KIRs/7 инхибиторни KIRs) с по-силен инхибиторен NK-клетъчен потенциал, е предразполагащ, докато KIR генотип със съотношение 0.67 (4 активиращи KIRs/6 инхибиторни KIRs) с по-слаба инхибиторна NK-клетъчна активност, е протективен за хронифицирането на HBV инфекцията.

В. Носителството на **HLA-C2 лиганди** има предразполагащ ефект за развитие на инфекция, докато **HLA-C1 лигандната група** е с протективен ефект за хронифициране на инфекцията.

Г. Функционално значимият генотип **KIR2DL2/L3(+)/HLA-C1(+) е** с протективна роля при HBV инфекция.

5. Установените предразполагащи генетични фактори могат да бъдат използвани като биомаркери за изхода от HBV инфекция.

## VII. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИ

### *1. Теоретични (научно-експериментални) приноси*

1. За първи път у нас се оцени влиянието на генетичните фактори управляващи вродения и адаптивен имунен отговор при хронично инфектирани пациенти и спонтанно оздравели от инфекция с HBV.

2. За пръв път се проучи полиморфизма на HLA клас I (-Аи - B) и клас II (DR) при хронично инфектирани и спонтанно оздравели пациенти от българската популация, като се установиха асоциации на HLA алели и хаплотипи с изхода от HBV инфекция.

3. За първи път в българската популация се проучи полиморфизма на KIR гените и техните HLA клас I лиганди при хронично инфектираниипри пациенти, спонтанно оздравели от инфекция с HBV, като се установиха асоциации на KIR алели и KIR/лигандни комбинации с изхода от инфекцията.

4. За първи път у нас, се проучи влиянието на броя активиращи KIRs / инхибиторни KIRs, за протичането на HBV инфекция.

5. За пръв път се проучи влиянието на HLA алели и хаплотипи при лечение с нуклеозидни/нуклеотидни аналози на пациенти с хронична HBV от българската популация.

### *2. Приложни (научно-практически) приноси*

1. Въведен, валидиран и оптимизиран е Real-time PCR метод за количествено определяне на HBV-ДНК, с много добра аналитична

чувствителност и широк линеен обхват, с ниска себестойност приложим в клиничната медицинска практика за изследане на вирусен товар.

2. Въведен и оптимизиран е PCR-SSOP метод за изследване на вирусния генотип при пациенти с хронична HBV инфекция, прилоложим в клиничната практика.

3. Особено значим принос на настоящата работа е установяването на генетични фактори, които могат да бъдат използвани, като прогностични биомаркери за изхода от HBV инфекция и отговор на лечение с нуклеозидни/нуклеотидни аналози.- изводи- 3А, 3Б, 3В, 4А, 4В.

**Публикации, свързани с темата на дисертационния труд:**

1. **Atanaska Georgieva,** Milena Ivanova-Shivarova, Diana Petrova_,Snejina Mihailova, Tsvetelin Lukanov, Elissaveta Naumova, HLA associations with chronic hepatitis B In the bulgarian population, Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci, 2015, 68(12):1593-1598
2. **Атанаска Георгиева,** Анастасия Михайлова, Елисавета Наумова, KIR гени, HLA лиганди и вирусни инфекции. Медицински преглед, , 2015, LI (5), 5-10
3. Anastasiya Mihaylova, Marta Baleva, **Atanaska Georgieva**, Valentina Atanasova, Diana Petrova, Snejina Mihailova, Georgi Popov, Naumova Elissaveta,Viral load and lymphocyte subpopulations in newly diagnosed patients with chronic Hepatitis B, Scripta Scientifica Medica, 2015, 47, 3.65-70.

**Участия в научни проекти, свързани с темата на дисертационния труд:**

"Имуногенетични маркери свързани с протичането на инфекцията с хепатит В", МОМН, проект ДТК 02/12 от 2009г., член на научния колектив

**Участия в конгреси и научни прояви, свързани с темата на дисертационния труд:**

1. Varbanova, V., M.Ivanova, **A.Georgieva**, A.Mihaylova, E.Naumova. Killer immunoglobulin-like receptor and ligand gene diversity in the Bulgarian population. 25th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 4-7 .05.2011, Прага, Чехия. Tissue Antigens, 2011, 77, 427, P 78 (постер).

2. **Atanaska Georgieva**, Viktoria Varbanova , Konstantin Chernev , Diana Petrova , Milena Ivanova, Elissaveta Naumova, Anastassia Mihaylova. KillercellimmunoglobulinlikereceptorsandHLAligandsgeneticcompositionmay favordevelopmentofchronichepatitisBinfectionsintheBulgarianpopulation. MolecularImmunologyandImmunogeneticsCongress, 27-29.04.2012, Белек, Турция (постер)

3. V. P. Varbanova, M. I. Ivanova, **A. I. Georgieva**, A. P. Mihazlova, E. J. Naumova. Killer immunoglobulin-like receptor and ligand gene diversity in the Bulgarian population. 26th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 31.05-03.06.2012, Liverpool,UK Tissue Antigens, 2012, 79, 542,P 267(постер).

4. Varbanova V., **Georgieva A**., Lukanov Ts. et al., Influence of donor and recipient KIR and HLA class I ligand gene polymorphism on allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcome. The 27th EFI European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 11-14.05.2013, Maastricht, the Netherlands. Tissue Antigens, 2013, 81(5), P30 (постер).

5. Kandilarova S., **Georgieva A**., Varbanova V., Ivanova M., Lukanov Ts., et al., Significance of KIR and HLA Genotypes as Prognostic Factors for Development of Hepatitis B Infection and Clinical Outcome. The 28th EFI European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, 25-28.06.2014, Stockholm, Sweden. Tissue Antigens, 2014, 84-1, P283 (постер).

6. Snezhina Mihailova, **A. Georgieva,** V. Varbanova, M. Baleva, D. Petrova , G.Petrov, E. Naumova, A. Mihaylova. KIR and HLA genetic background influences the course of HBV infection. Anniversary Scientific Conference "Science forHealth", 20-22.05. 2015, Plovdiv Награда Диплом Първо място за представена устна презентация на

Юбилейна научна сесия „Наука за здраве“, 20-22 Май 2015 г. Пловдив (доклад)