

MDR1 gēna polimorfismu rs2032582 un rs1045642 saistība ar hroniska C vīrushepatīta attīstības risku un gaitu

*Dmitrijs Rots, Adele Grasmāne, Madara Kreile, Agnese Zariņa,
Jāzeps Keišs, Valentīna Sondre¹, Linda Piekuse*

*Rīgas Stradiņa universitāte, Molekulārās ģenētikas zinātniskā laboratorija, Latvija
Dmitrijs.Rots@rsu.lv*

¹ *Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca, stacionārs Latvijas Infektoloģijas centrs*

Kopsavilkums

Ievads. C hepatīta vīrusa (HCV) infekcija ir viens no galvenajiem hronisku aknu slimību cēloņiem pasaulē un Latvijā. Latvijā izmantotā antivirālā standartterapija, izmantojot pegilēto interferonu 2 (PEG-IFN) un ribavirīnu (RBV), ir efektīva 40–50% pacientu ar 1. genotipu. Tik zema efektivitāte ir saistīta ar vīrusa un saimniekorganisma faktoriem. Pēc pētījumu datiem polimorfismi endobiotiķu un ksenobiotiķu metabolismā iesaistīto enzīmu kodējošos gēnos ir saistīti ar hroniska C vīrushepatīta (HVHC) attīstības risku un terapijas efektivitāti. Vieni no tiem ir *MDR1* gēna polimorfismi rs2032582 un rs1045642, kas izraisa samazinātu P-glikoproteīna aktivitāti, kas savukārt var mainīt šūnu metabolismu.

Materiāls un metodes. Pētījumā tika iekļauti 228 pacienti, kuriem tika diagnosticēts HVHC, un 191 brīvprātīgais indivīds kontroles grupā. Polimorfismu genotipu identifikācijai tika izmantota PCR-RFLP metode.

Rezultāti. Pētījuma laikā netika atrasti statistiski ticami pierādījumi minēto polimorfismu saistībai ar paaugstinātu HVHC attīstības risku. Polimorfisma rs2032582 G alēle gan homozigotiskā (RR = 0,25, 95% TI 0,07–0,9, p = 0,036), gan heterozigotiskā (RR = 0,2, 95% TI 0,07–0,6, p = 0,006) formā ir saistīta ar efektīvu antivirālu terapiju (p < 0,05), kā arī G alēle heterozigotiskā formā ir saistīta ar paaugstinātu GGT līmeni, bet šī saistība ir vāja (RR = 0,29, 95% TI 0,09–0,94, p = 0,039).

Secinājumi. 1. Pētījumā netika pierādīta *MDR1* gēna polimorfismu rs1045642 un rs2032582 saistība ar HVHC attīstības risku. 2. rs2032582 G alēle dominantā iedzimšanas modelī ir statistiski ticami saistīta ar SVR sasniegšanu pacientiem ar 1. HCV genotipu. 3. rs2032582 G alēle homozigotiskā un heterozigotiskā formā ir statistiski ticami saistīta ar SVR sasniegšanu. 4. Paaugstināts GGT līmenis asins serumā ir statistiski ticami saistīts ar polimorfisma rs2032582 G alēli heterozigotiskā stāvoklī, bet šī saistība ir vāja un tiek zaudēta homozigotiskā stāvoklī.

Atslēgvārdi: hronisks C vīrushepatīts, *MDR1* gēns, polimorfismi.

Ievads

C hepatīta vīrusa (HCV) infekcija ir viens no galvenajiem hronisku aknu slimību cēloņiem pasaulē (WHO, 2014). Latvijā aptuveni 2,4% iedzīvotāju ir inficēti ar HCV (Tolmane, 2011). Inficējoties ar HCV, hronisks C vīrushepatīts (HVHC) attīstās aptuveni 85% gadījumu (Alter, 1997). HVHC ir diagnosticējams,

kad HCV RNS ir nosakāma asins plazmā vismaz sešus mēnešus (*EASL*, 2015). Parasti HVHC ir asimptomātiska gaita, bet, ja šī infekcija netiek ārstēta, tad 25% pacientu 15–20 gadu laikā attīstās aknu ciroze vai hepatocelulāra karcinoma (HCC) (*Blachier*, 2013).

Līdz šim ir aprakstīti 6 HCV genotipi (*Hussain*, 2013). Vīrusa genotipam ir nozīme slimības progresēšanā, kā arī atbildes reakcijā uz antivirālo terapiju. Eiropā un arī Latvijā ap 60–70% gadījumu ir sastopams 1. vīrusa genotips (*Tolmane*, 2012).

Antivirāla terapija tiek veikta, lai eliminētu HCV un novērstu infekcijas izraisītās komplikācijas. Terapija ir veiksmīga, ja tiek sasniegta noturīga virusoloģiska atbilde (SVR) (angļu. val. – *sustained viral response*) 12 (SVR12) vai 24 nedēļās (SVR24) – pēc terapijas beigām nav nosakāms HCV RNS līmenis asins plazmā. Vairāk nekā 99% gadījumu sasniegta SVR nozīmē pilnīgu izārstēšanos no HCV infekcijas (*EASL*, 2015). Atkarībā no atbildes uz terapiju pacientus iedala atbildētājos, kuriem tiek sasniegta SVR, un neatbildētājos, kuriem SVR netiek sasniegta vai tiek sasniegta īslaicīgi.

Latvijā izmanto antivirālo standartterapiju, kas sastāv no pegilētā interferona 2a vai 2b (PEG-IFN) un ribavirīna (RBV). Ar iepriekšminēto terapiju SVR tiek sasniegta 40–50% pacientu ar 1. genotipu un līdz 80% pacientu ar 2. un 3. genotipu (*Manns*, 2001). Tik zemo SVR sasniegšanas biežumu var skaidrot ar vīrusa faktoriem, saimniekorganisma ģenētiskiem un neģenētiskiem faktoriem, kā arī ar zemu medikamentu efektivitāti (*Kong*, 2014). Sākot ar 2011. gadu, ir pieejami tiešās darbības antivirālie aģenti (*Muir*, 2011). Jaunākie medikamenti ir efektīvāki un pacientiem ar 1. genotipu kombinācijā ar standartterapiju ļauj sasniegt SVR līdz 90% gadījumu (*Lawitz*, 2013), bet dārdzības dēļ nevar tikt izmantoti visiem pacientiem ar HVHC. Identificējot faktorus, kas nosaka standartterapijas neefektivitāti, varētu palīdzēt noteikt pacientus, kam uzreiz būtu nepieciešams saņemt terapijā jaunus tiešās darbības antivirālos medikamentus, tādējādi uzlabojot terapijas rezultātus un samazinot ārstēšanas izmaksas.

Veicot genoma plašus asociācijas pētījumus, tika atklāts, ka *IL28B* gēna polimorfismam rs12979860 ir visstiprākā saistība ar SVR sasniegšanu pacientiem, kuri ir inficēti ar HCV 1. genotipu (*Duggal*, 2013). Šis polimorfisms ļauj precīzāk prognozēt atbildi uz antivirālo standartterapiju pacientiem ar HCV 1. genotipu. Kaut gan jau ir atklāti vairāki saimnieka ģenētiskie faktori, kas ietekmē HVHC attīstības risku un terapijas efektivitāti, joprojām ir aktuāli veikt pētījumus, lai atrastu jaunus ģenētiskos marķierus (*Stattemayer*, 2014). Ir pierādīts, ka polimorfismi endobiotiķu un ksenobiotiķu metabolismā iesaistīto enzīmu kodējošos gēnos, piemēram, *GSTT1* un *GSTM1*, ir saistīti ar HVHC attīstības risku un aknu bojājuma pakāpi pie HCV infekcijas, savukārt dati par ietekmi uz terapijas efektivitāti ir pretrunīgi (*Piekuse*, 2014).

MDR1 gēns kodē P-glikoproteīnu, kas nodrošina daudzveidīgo endobiotiķu un ksenobiotiķu izvadīšanu no šūnām (*Ambudkar*, 2003). Polimorfismi rs2032582 un rs1045642 spēj samazināt P-glikoproteīna aktivitāti un ekspresiju (*Chinn*, 2007), kas savukārt var mainīt šūnu, tostarp limfocītu un hepatocītu, metabolismu. Pētījumi liecina, ka palielināta P-glikoproteīna ekspresija samazina dažādu vīrusu (piemēram, gripas, cilvēka imūndeficīta vīrusa) spēju iekļūt šūnā, bet šobrīd trūkst datu par P-glikoproteīna ietekmi uz HCV dzīves ciklu (*Lee*, 2000; *Raviv*, 2000). Iespējams, P-glikoproteīns spēj arī ietekmēt antivirālo medikamentu koncentrāciju šūnās (*Weiss*, 2014), tādējādi samazinot to efektivitāti.

Pēc pētījuma datiem polimorfisma rs1045642 TT genotips, kas saistīts ar samazināto P-glikoproteīna ekspresiju, saistīts ar sliktāku HCV infekcijas atbildes reakciju uz terapiju, bet nav datu par rs2032582 polimorfismu (*Timucin*, 2013). *MDR1* gēnā ir zināmi vairāk nekā 50 polimorfismi, tomēr visplašāk pētītie ir rs2032582 un rs1045642 (*Li*, 2006), tāpēc tieši šie divi polimorfismi tika izvēlēti analīzei šajā pētījumā.

Darba mērķis

Šī pētījuma mērķis bija noskaidrot gēnā *MDR1* lokalizēto polimorfismu rs2032582 un rs1045642 saistību ar HVHC attīstības risku un gaitu.

Materiāls un metodes

Pētījumā tika iekļauti 228 pacienti, kuriem tika diagnosticēts HVHC Latvijas Infektoloģijas centrā laikposmā no 1992. līdz 2009. gadam. No 228 pacientiem ar HVHC 107 (47%) bija sievietes un 121 (53%) – vīrietis. Pētījuma veikšanas brīdī 129 (57%) pacientiem bija pabeigta antivirāla terapija ar PEG-IFN un RBV. Pacientu ar HVHC grupai bija pieejama informācija par asins seruma GGT (gamma-glutamīltransferāze), ALAT (alanīnaminotransferāze), ASAT (aspartāminotransferāze) un citohroma C līmeni.

Kontroles grupu veidoja 191 brīvprātīgais indivīds, kuri, aizpildot informētu piekrišanas formu, piekrita piedalīties pētījumā. No kontroles grupas indivīdiem 144 (75%) bija sievietes un 47 (25%) vīrieši. Kontroles grupas indivīdiem nebija pieejami dati par HCV infekcijas statusu (nebija noteiktas anti-HCV un HCV-RNS), tāpēc tā tika izmantota, lai noteiktu analizēto ģenētisko marķieru biežumu vispārējā populācijā un salīdzinātu to ar ģenētisko marķieru biežumu HVHC pacientu grupā.

Pētījums tika veikts saskaņā ar Latvijas Republikas Centrālās medicīnas ētikas komitejas atļauju Nr. 01-29.1/18 (izsniegta 29.07.2011.).

Genoma DNS tika izdalīta no perifērajām venozajām asinīm, izmantojot standarta fenola-hloroforma metodi (*Sambrook*, 2006). *MDR1* gēna polimorfismu alēles tika noteiktas, izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju un restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma (PCR – RFLP) analīzi.

Polimorfisma rs1045642 (pēc HGVS nomenklatūras: NG_011513.1:g.208920T>C; NM_000927.4:c.3435T>C, NP_000918.2:p.Ile1145=; pēc tradicionālās nomenklatūras: C3435T) genotipēšanas metode tika adaptēta no literatūras (*Leal-Ugarte*, 2008). PCR izmantoto sintētisko oligonukleotīdu secības un to piesaistīšanas temperatūra ir attēlota 1. tabulā. Pēc PCR pavairotie DNS fragmenti tika apstrādāti ar restrikcijas endonukleāzi MboI (*Thermo Scientific*, ASV), inkubējot paraugus 37 °C divas stundas. Produktus analizēja, izmantojot 8% poliakrilamīda gela elektroforēzi. Rezultāti tika vizualizēti, krāsojot DNS ar etīdija bromīdu.

Polimorfisma rs2032582 (pēc HGVS nomenklatūras: NG_011513.1:g.186947G>T>A; NM_000927.4:c.2677G>T>A; NP_000918.2:p.Thr893Ser893Ala; pēc tradicionālās nomenklatūras: G2677T/A) genotipēšanas metode tika adaptēta no pētījuma (*Ayaz*, 2013). Katram indivīdam bija nepieciešams veikt divas PCR-RFLP reakcijas. PCR izmantoto sintētisko oligonukleotīdu secības un to piesaistīšanās temperatūra ir attēlota 1. tabulā.

No sākuma tika noteikta A alēles esamība analogiski iepriekšminētajam polimorfismam, izmantojot BsrI restrikcijas endonukleāzi (*Thermo Scientific*, ASV) un inkubējot paraugus 65°C divas stundas. BsrI restrikcijas enzīms spēj šķelt tikai A alēli, bet nespēj šķelt G vai T alēli, tāpēc bija nepieciešama turpmāka analīze. G un T alēles tika noteiktas, izmantojot sintētiskos oligonukleotīdus ar izmainītām nukleotīdu secībām, kas G alēles gadījumā veidoja restrikcijas saiti BanI restrikcijas endonukleāzei (*Thermo Scientific*, ASV). PCR paraugi tika inkubēti ar BanI restrikcijas endonukleāzi 37 °C vismaz divas stundas. Produktus analizēja, izmantojot 8% poliakrilamīda gela elektroforēzi. Rezultāti tika vizualizēti, krāsojot DNS ar etīdija bromīdu.

1. tabula. Sintētisko oligonukleotīdu secības un to piesaistīšanās temperatūra

Sequences and annealing temperature of used synthetic oligonucleotides

Polimorfisms	Sintētisko oligonukleotīdu secības	Oligonukleotīdu piesaistīšanās temperatūra
rs1045642	F: 5' TGT TTT CAG CTG CTT GAT GG 3'	60 °C
	R: 5' AAG GCA TGT ATG TTG GCC TC 3'	
rs2032582 – A alēles noteikšanai	F: 5' TCA GAA AAT AGA AGC ATG AGT TG 3'	60 °C
	R: 5'AGC AGT AGG GAG TAA CAA AAT AAC 3'	
rs2032582 – G un T alēles noteikšanai	F: 5' TTT GCA GGC TAT AGG TTC CAG 3'	60 °C
	R: 5' TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCC G 3'	

F – forward, R – reverse.

Datu statistiskā apstrāde tika veikta, izmantojot *R* programmas 3.2.1 *Haplin* 5.5 spraudni (*Gjessing*, 2006), *PLINK* 1.07 (*Purcell*, 2007) un *MS Excel* 2010 programmu.

Lai analizētu asociācijas starp gadījuma un kontroles grupu, tika izmantoti dažādi testi: gan aditīvais, gan trīs iedzimšanas modeļu (dominantā, recesīvā un alēliskā) analīze. Bioķīmisko rādītāju saistība ar alēlēm un genotipiem tika noteikta, izmantojot lineāro regresiju. Dati tika koriģēti pēc dzimuma un vīrusa genotipa.

Rezultāti

No visiem pacientiem pētījuma veikšanas brīdī antivirālo terapiju bija beiguši 129 (57,6%) pacienti ar HVHC, no kuriem 80 terapija bija efektīva, bet 49 – neefektīva, 3 (1,3%) pacientiem terapija vēl nebija pabeigta, savukārt 96 (42,1%) pacientiem dažādu iemeslu dēļ terapija vēl nebija sākta.

Dati par vīrusa genotipiem ir pieejami 2. tabulā. Salīdzinot terapijas efektivitāti pacientiem ar 1. genotipu un pacientiem ar 2. un 3. genotipu, tika atklāta statistiski ticama saistība ar labāku terapijas iznākumu pacientiem ar 2. un 3. genotipu (RR = 2,4, 95% TI 1,2–5,4, p = 0,006).

Pacientu asins seruma bioķīmisko izmeklējumu dati pirms terapijas ir attēloti 3. tabulā.

MDR1 gēna polimorfismu rs1045642 un rs2032582 genotipu sadalījums atbilst Hārdija–Veinberga likumam (p > 0,05).

rs1045642 un rs2032582 polimorfismu genotipu un alēļu biežums ir atainots 4. tabulā. rs1045642 C alēles biežums gadījuma un kontroles grupās statistiski ticami neatšķiras (RR = 1,04, 95% TI 0,84–1,42, p = 0,53). Starp abām pētījumā iesaistītajām grupām CC un CT genotipu biežums statistiski ticami neatšķiras (attiecīgi RR = 0,87, 95% TI 0,49–1,5, p = 0,65 un RR = 1,1, 95% TI 0,75–1,61, p = 0,6).

Otram analizētajam polimorfismam rs2032582 statistiski ticamas atšķirības alēļu biežumam starp pacientu ar HVHC un kontroles grupu netika atklātas (G alēlei RR = 0,92, 95% TI 0,71–1,2, p = 0,55), T alēlei RR = 0,94, 95% TI 0,69–1,19, p = 0,46 un A alēlei RR = 1,4, 95% TI 0,65–3,18, p = 0,36). Analizējot rs2032582 genotipu saistību ar pacientu, kam ir HVHC, kopējo grupu, statistiski ticamas atšķirības netika atklātas (p > 0,05).

2. tabula. Pacientu ar hronisku C vīrushepatītu (HVHC) C hepatīta vīrusa genotipi kopējā grupā, kā arī efektīvas terapijas un neefektīvas terapijas grupā

HCV genotypes for chronic hepatitis C patients (CVHC) in a total group and in patients with finished antiviral therapy

Vīrusa genotips	Pacientu ar HVHC kopējā grupa (n = 228)	Efektīvas terapijas grupa (n = 80)	Neefektīvas terapijas grupa (n = 49)
1.	184	48	41
2.	8	5	3
3.	36	24	4
Nav noteikts	74	3	1

3. tabula. Pacientu asins seruma bioķīmiskie rādītāji

CVHC patients blood serum biochemical analysis data

Bioķīmiskie rādītāji	Pacienti ar HVHC (n = 228)	
	Vid.	SD
ALAT (U/l)	110,31	86,22
ASAT (U/l)	65,92	51,23
GGT (U/l)	80,13	91,54
Citohroms C (ng/l)	0,40	1,31

HVHC – hronisks C vīrushepatīts, SD – standartnovirze, vid. – vidējā vērtība.

4. tabula. Pacientu ar hronisku C vīrushepatītu (HVHC) grupas un kontroles grupas genotipu un alēļu sadalījums

Allele and genotype frequencies in CVHC patients and control group

Polimorfisms	Genotips / alēle	Pacientu ar HVHC grupa (n = 228)	Kontroles grupa (n = 191)
rs1045642	CC	0,22	0,19
	CT	0,52	0,54
	TT	0,26	0,27
	C	0,48	0,46
rs2032582	AG	0,02	0,04
	AT	0,05	0,01
	GG	0,29	0,27
	GT	0,49	0,50
	TT	0,15	0,18
	A	0,04	0,03
	G	0,55	0,53
	T	0,41	0,44

Salīdzinot dzimumu sadalījumu starp pacientu ar HVHC grupu un kontroles grupu, tika atklāta statistiski ticama atšķirība ($p = 0,0001$), tomēr, analizējot rs1045642 un rs2032582 saistību ar HCVH attīstības risku un to koriģējot pēc dzimuma, statistiskā ticamība nemainījās ($p > 0,05$).

Analizējot terapijas efektivitāti pacientiem ar 1. vīrusa genotipu, tika atklāts, ka polimorfisma G alēle dominantā modelī ir statistiski ticami saistīta ar labāku terapijas iznākumu (RR = 0,8, 95% TI 0,61–0,98, $p = 0,01$). rs1045642 nebija saistīts ar terapijas iznākumu 1. vīrusa genotipam.

MDR1 gēna polimorfismu saistība ar terapijas efektivitāti otrajam un trešajam vīrusa genotipam netika pārbaudīta mazās grupas dēļ.

Polimorfisma rs2032582 G alēle gan homozigotiskā (RR = 0,25, 95% TI 0,07–0,9, $p = 0,036$), gan heterozigotiskā (RR = 0,2, 95% TI 0,07–0,6, $p = 0,006$) formā ir saistīta ar protektīvu efektu pret neefektīvo antivirālo terapiju jeb ar efektīvu antivirālo terapiju. Tā kā polimorfismam ir trīs alēles un analīzei bija nepieciešams izmantot *HaplIn* spraudni, nebija iespējams veikt korekciju pēc vīrusa genotipiem.

Analizējot abu polimorfismu saistību ar GGT, ALAT, ASAT un citohroma C līmeni pirms terapijas pacientu ar HVHC grupā, statistiski ticama saistība tika atrasta GGT līmenim pirms terapijas ar rs2032582 polimorfisma G alēles heterozigotisko genotipu (RR = 0,29, 95% TI 0,09–0,94, $p = 0,039$), bet statistiska ticamība tika zaudēta homozigotiskajā stāvoklī. Citi bioķīmiskie rādītāji nebija statistiski nozīmīgi saistīti ar abiem polimorfismiem.

Pacientu ar HVHC grupā, kuriem antivirālā terapija bija neefektīva, GGT, ALAT, ASAT un citohroma C līmenis asins serumā nav statistiski ticami saistīts ar *MDR1* gēna polimorfismiem rs1045642 un rs2032582.

Diskusija

Hroniska aknu mazspēja, aknu ciroze un hepatocelulāra karcinoma (HCC) ir galvenās komplikācijas pacientiem ar neārstētu HVHC vai pacientiem ar neefektīvu antivirālo terapiju (Muhlberger, 2009; Zatonski, 2010). Efektīva antivirāla terapija ļauj novērst vai samazināt komplikāciju biežumu (van der Meer, 2012).

Ar visjaunāko pieejamo antivirālo terapiju SVR ir iespējams sasniegt līdz 90% gadījumu (Lawitz, 2013), bet dārdzības dēļ tā nav pieejama lielākajai daļai pacientu ar HVHC. Tāpēc ir nepieciešams identificēt faktorus, kas nosaka standartterapijas neefektivitāti, un noteikt pacientus, kam būtu nepieciešams saņemt jaunās paaudzes antivirālo terapiju, tādējādi uzlabojot pacientu aprūpi.

Līdz šim ir identificēti vairāki saimniekorganisma ģenētiskie faktori, kas ietekmē HVHC attīstības risku un terapijas efektivitāti (*Duggal, 2013; Suppiah, 2011*). Visnozīmīgākā ietekme uz HVHC attīstības risku un terapijas efektivitāti ir pierādīta *IL28B* gēna polimorfismam rs12979860, kas iepriekš tika analizēts arī Latvijas populācijai (*Tolmane, 2012*) un tāpēc netika iekļauts pētījumā. Šajā pētījumā tika aplūkota P-glikoproteīna kodējošā gēnā *MDR1* esošo divu funkcionālo polimorfismu rs1045642 un rs2032582 saistība ar HVHC attīstības risku un terapijas efektivitāti.

MDR1 gēna polimorfismi ir saistīti ar vairāku slimību attīstību (*Li, 2006*), bet šobrīd literatūrā nav datu par *MDR1* gēna polimorfismu saistību ar HVHC attīstības risku. Ir zināms, ka dažādi polimorfismi *MDR1* gēnā ir saistīti ar HCC un tiek uzskatīti par riska faktoru HCC attīstībā (*Gao, 2013*). Pēc šī pētījuma datiem *MDR1* gēna rs1045642 un rs2032582 polimorfismi nav saistīti ar HVHC attīstības risku ($p > 0,05$).

Timucin ar kolēģiem veiktajā pētījumā, kurā tika iekļauti 19 pacienti ar efektīvu un 21 pacients ar neefektīvu terapiju no Turcijas populācijas, pārbaudīja *MDR1* gēna rs1045642 polimorfisma saistību ar terapijas efektivitāti pacientiem ar 1. HCV genotipu (*Timucin, 2013*). Pētījumā tika atklāts, ka TT genotips un T alēle statistiski ticami saistīta ar neefektīvu terapiju. Par otra polimorfisma rs2032582 saistību ar SVR sasniegšanas biežumu literatūrā trūkst datu. Mūsu pētījumā, iekļaujot 89 pacientus ar 1. genotipu: 48 pacientus ar efektīvu un 41 ar neefektīvu terapiju, polimorfisms rs1045642 nebija saistīts ar antivirālas terapijas efektivitāti. Savukārt polimorfisma rs2032582 G alēle, kas atbild par neizmainītu P-glikoproteīna funkciju, dominantajā iedzimšanas modelī ir statistiski ticami saistīta ar pozitīvu terapijas iznākumu. Analizējot 80 pacientus ar efektīvu un 49 pacientus ar neefektīvu terapiju, nedalot grupu pēc vīrusa genotipiem, tika atklāts, ka polimorfisma rs2032582 G alēle homozigotiskajā un heterozigotiskajā stāvoklī bija statistiski ticami saistīta ar efektīvu terapijas iznākumu.

Kā vienu no saimniekorganisma faktoriem, kas saistīts ar negatīvu terapijas iznākumu, uzskata aknu bojājuma pakāpi (*Everson, 2006*). Par aknu bojājumu netieši var spriest pēc asins seruma bioķīmisko izmeklējumu datiem: ALAT, ASAT, GGT, citohroms C (*EASL-ALEH, 2015; Lum, 1972; Viksna, 2009*). Šajā pētījumā tika atklāta GGT paaugstināta līmeņa asins serumā saistība ar polimorfisma rs2032582 G alēli heterozigotiskajā stāvoklī, bet šī saistība ir vāja un tiek zaudēta homozigotiskajā stāvoklī, tāpēc ir nepieciešami turpmāki pētījumi šīs saistības apstiprināšanai. *MDR1* gēna polimorfismu saistība ar citiem aknu bojājuma bioķīmiskiem marķieriem netika atklāta.

Par pētījuma galveno ierobežojošo faktoru var minēt gadījuma un kontroles grupas dzimuma sadalījuma neatbilstību. Ir zināms, ka HCHV attīstības risks ir lielāks vīriešiem (*Micallef, 2006*), tāpēc tas var ietekmēt iegūtos rezultātus, tomēr analizētie polimorfismi atrodas autosomā un statistiski ticami nebija saistīti ar kādu no dzimumiem.

Rezultātus var ietekmēt arī tas, ka kontroles grupas indivīdiem nebija noteikts HCV infekcijas statuss, tomēr ar HCV Latvijas populācijā inficējas salīdzinoši maz indivīdu – 2,4% (*Tolmane, 2011*).

Secinājumi

1. Pētījumā netika pierādīta *MDR1* gēna polimorfismu rs1045642 un rs2032582 saistība ar HVHC attīstības risku.
2. rs2032582 G alēle dominantā iedzimšanas modelī statistiski ticami saistīta ar SVR sasniegšanu pacientiem ar 1. HCV genotipu.
3. rs2032582 G alēle homozigotiskajā un heterozigotiskajā stāvoklī ir statistiski ticami saistīta ar SVR sasniegšanu.
4. GGT paaugstinātais līmenis asins serumā ir statistiski ticami saistīts ar polimorfisma rs2032582 G alēli heterozigotiskajā stāvoklī.

Pateicība

Izsakām pateicību Rīgas Stradiņa universitātei par pētījuma finansiālo atbalstu, Rīgas Austrumu klīniskajai universitātes slimnīcai un Latvijas Infektoloģijas centram par sadarbību pētījuma procesā un pacientiem par piedalīšanos pētījumā.



**MDR1 Gene Polymorphism rs2032582 and rs1045642
Association with Risk of Developing Chronic
Virushepatitis C and Course of Disease**

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infection is one of the leading causes of chronic liver disease. Standard treatment of HCV infection consists of pegylated interferon and ribavirin. The effectiveness of the standard therapy for 1st virus genotype is about 50%. The therapy is influenced by viral and host factors. Polymorphisms in the endo- and xenobiotic metabolism involved enzymes (e.g. P-glycoprotein) coding genes have impact on the chronic virushepatitis C (CVHC) development and treatment effectiveness. *MDR1* gene encodes P-glycoprotein. Polymorphisms rs2032582 and rs1045642 decrease activity of P-gp, and it could lead to altered metabolism in various cells.

The study was conducted on 228 patients' blood with diagnosed CVHC and 191 volunteer individual blood as a control group. The polymorphisms were genotyped using PCR-RFLP assay.

None of the observed polymorphisms were statistically significantly associated with the increased risk of developing CVHC.

Polymorphism rs2032582 G allele in homozygous as well as in heterozygous states was statistically significantly associated with a better response to standard therapy ($p < 0.05$). Also G allele in heterozygous state was statistically significantly associated with the increased level of GGT in patient's serum.

Conclusions:

1. We did not find *MDR1* gene polymorphisms rs2032582 and rs1045642 association with the increased risk of developing CVHC in our study.
2. rs2032582 G allele in dominant model of inheritance statistically was significant associated with the response to the standard therapy for patients with 1st virus genotype.
3. rs2032582 G allele in homozygous and in heterozygous states was statistically significantly associated with the response to the standard therapy.
4. rs2032582 G allele in heterozygous state was statistically significantly associated with the increased level of GGT in patient's serum, but the association was weak and the significance was lost in homozygous state.

Keywords: *MDR1* gene, polymorphisms, chronic virushepatitis C.

Literatūra

1. Piekuse L. *Endobiotiķu un ksenobiotiķu metabolismā iesaistīto enzīmu kodējošo gēnu polimorfismi hroniska C-virushepatīta un akūta toksiska hepatīta gadījumā*. Rīga: Rīgas Stradiņa universitāte, 2014, 24. lpp.
2. Alter M. J. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology*, 1997; 26 (3 Suppl 1): 62S–65S.
3. Ambudkar S. V., Kimchi-Sarfaty C., Sauna Z. E., et al. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, 2003; 22 (47): 7468–7485.
4. Ayaz G., Batar B., Kanigur G., et al. The association of *MDR1* C3435T and G2677T/A polymorphisms with plasma platelet-activating factor levels and coronary artery disease risk in Turkish population. *Gene*, 2013; 527 (1): 301–305.
5. Blachier M., Leleu H., Peck-Radosavljevic M., et al. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*, 2013; 58 (3): 593–608.
6. Chinn L. W., Kroetz D. L. ABCB1 pharmacogenetics: progress, pitfalls, and promise. *Clin Pharmacol Ther*, 2007; 81 (2): 265–269.
7. Duggal P., Thio C. L., Wojcik G. L., et al. Genome-wide association study of spontaneous resolution of hepatitis C virus infection: data from multiple cohorts. *Ann Intern Med*, 2013; 158 (4): 235–245.
8. EASL-ALEH. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol*, 2015; 63 (1): 237–264.
9. EASL. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C. *J Hepatol*, 2015; 63 (1): 199–236.

10. Everson G. T., Hoefs J. C., Seeff L. B., et al. Impact of disease severity on outcome of antiviral therapy for chronic hepatitis C: Lessons from the HALT-C trial. *Hepatology*, 2006; 44 (6): 1675–1684.
11. Gao J. Association of MDR1 gene polymorphisms with the risk of hepatocellular carcinoma in the Chinese Han population. *Braz J Med Biol Res*, 2013; 46 (3): 311–317.
12. Gjessing H. K., Lie R. T. Case-parent triads: estimating single- and double-dose effects of fetal and maternal disease gene haplotypes. *Ann Hum Genet*, 2006; 70 (Pt 3): 382–396.
13. Hussain Z. *Genomic Heterogeneity of Hepatitis Viruses (A-E): Role in Clinical Implications and Treatment*. Rijeka: InTech, 2013. Pp. 19–56.
14. Kong F., Pan Y., Chi X. M., et al. Factors Associated with Spontaneous Clearance of Hepatitis C Virus in Chinese Population. *Biomed Research International*, 2014.
15. Lawitz E., Mangia A., Wyles D., et al. Sofosbuvir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Infection. *New England Journal of Medicine*, 2013; 368 (20): 1878–1887.
16. Leal-Ugarte E., Gutierrez-Angulo M., Macias-Gomez N. M., et al. MDR1 C3435T polymorphism in Mexican children with acute lymphoblastic leukemia and in healthy individuals. *Hum Biol*, 2008; 80 (4): 449–455.
17. Lee C. G., Ramachandra M., Jeang K. T., et al. Effect of ABC transporters on HIV-1 infection: inhibition of virus production by the MDR1 transporter. *FASEB J*, 2000; 14 (3): 516–522.
18. Li Y. H., Wang Y. H., Li Y., et al. MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance. *Yi Chuan Xue Bao*, 2006; 33 (2): 93–104.
19. Lum G., Gambino S. R. Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity as an indicator of disease of liver, pancreas, or bone. *Clin Chem*, 1972; 18 (4): 358–362.
20. Manns M. P., McHutchison J. G., Gordon S. C., et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*, 2001; 358 (9286): 958–965.
21. Micaleff J. M., Kaldor J. M., Dore G. J. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat*, 2006; 13 (1): 34–41.
22. Muhlberger N., Schwarzer R., Lettmeier B., et al. HCV-related burden of disease in Europe: a systematic assessment of incidence, prevalence, morbidity, and mortality. *BMC Public Health*, 2009; 9: 34.
23. Muir A. J. Hepatitis C drug telaprevir approved by US FDA. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2011; 9 (7): 764–764.
24. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*, 2007; 81 (3): 559–575.
25. Raviv Y., Puri A., Blumenthal R. P-glycoprotein-overexpressing multidrug-resistant cells are resistant to infection by enveloped viruses that enter via the plasma membrane. *FASEB J*, 2000; 14 (3): 511–515.
26. Sambrook J., Russell D. W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc*, 2006; (1).
27. Stattermayer A. F., Scherzer T., Beinhardt S., et al. Review article: genetic factors that modify the outcome of viral hepatitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2014; 39 (10): 1059–1070.
28. Suppiah V., Gaudieri S., Armstrong N. J., et al. IL28B, HLA-C, and KIR variants additively predict response to therapy in chronic hepatitis C virus infection in a European Cohort: a cross-sectional study. *PLoS Med*, 2011; 8 (9): e1001092.
29. Timucin M., Alagozlu H., Ozdemir S., et al. Association Between ABCB1 (MDR1) Gene Polymorphism and Unresponsiveness Combined Therapy in Chronic Hepatitis C virus. *Hepat Mon*, 2013; 13(4): e7522.
30. Tolmane I., Rozentale B., Keiss J., et al. The prevalence of viral hepatitis C in Latvia: a population-based study. *Medicina (Kaunas)*, 2011; 47 (10): 532–535.
31. Tolmane I., Rozentale B., Keiss J., et al. Interleukin 28B Gene Polymorphism and Association with Chronic Hepatitis C Therapy Results in Latvia. *Hepat Res Treat*, 2012; 2012: 324090.
32. van der Meer A. J., Veldt B. J., Feld J. J., et al. Association Between Sustained Virological Response and All-Cause Mortality Among Patients With Chronic Hepatitis C and Advanced Hepatic Fibrosis. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2012; 308 (24): 2584–2593.
33. Viksna L., Keišs J., Sočņevs A., et al. Novel laboratory tests in assessment of liver function in acute and chronic liver diseases. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences*, 2009; 63(4–5): 228–233.
34. Weiss J., Becker J. P., Haefeli W. E. Telaprevir is a substrate and moderate inhibitor of P-glycoprotein, a strong inducer of ABCG2, but not an activator of PXR in vitro. *Int J Antimicrob Agents*, 2014; 43 (2): 184–188.
35. WHO. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection. *Bulletin of the World Health Organization*, 2014; 92 (5).
36. Zatonski W. A., Sulkowska U., Manczuk M., et al. Liver Cirrhosis Mortality in Europe, with Special Attention to Central and Eastern Europe. *European Addiction Research*, 2010; 16 (4): 193–201.