

© Лядова Т.І., 2018
 УДК 616.98:578.825:612.017:575.22
 DOI 10.11603/1681-2727.2018.1.8670

Т.І. Лядова

ПОШИРЕНІСТЬ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА TLR 9 ТИПУ У ХВОРИХ З ХРОНІЧНИМИ ФОРМАМИ ВЕБ-ІНФЕКЦІЇ

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна

Досліджено поширеність поліморфізму -1486 Т/С гена TLR-9 у хворих з хронічними формами Епштейна-Барр вірусної інфекції (ХВЕБІ). На підставі отриманих результатів виявлено три основних генотипи -1486 Т/С гена TLR-9 – ТТ, ТС, СС. Дослідження частоти окремих генотипів виявило домінування генотипу ТС, порівняно з гомозиготними генотипами ТТ та СС. Вивчення розподілу частот поліморфізму -1486 Т/С гена TLR-9 для різних генотипів продемонструвало специфічність змін для генотипу ТС у хворих з ХВЕБІ та відсутність таких для генотипів ТТ та СС.

Мета дослідження – встановлення частоти поліморфізму -1486 Т/С гена TLR-9 у пацієнтів з ХВЕБІ.

Матеріали та методи. Дослідження для визначення поліморфізму -1486 Т/С гена TLR-9 було проведено у 44 пацієнтів з хронічними формами ВЕБ-інфекції. Контрольна група для вивчення поширеності поліморфізму -1486 Т/С гена TLR-9 становила 40 здорових донорів. Для виявлення ДНК ВЕБ методом ПЛР зі зворотною транскрипцією з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією продуктів ампліфікації використовували набори реагентів «Амплісенс» (Росія). Виділення ДНК із зразків проводили за допомогою набору фірми «Минипреп» (Силекс М, Росія), використовуючи методику сорбції ДНК на сорбенті. Поліморфний регіон -1486 Т/С, rs187084 гена TLR9 вивчався шляхом ампліфікації ПЛР в реальному часі шляхом визначення довжини фрагментів рестрикції ПЛР, за допомогою рестрикційного ензиму NcoI та олігонуклеотидних праймерів.

Результати. Аналіз отриманих результатів поліморфізму -1486 Т/С гена TLR-9 дозволив виділити три основних генотипи – ТТ, ТС, СС. Дослідження частоти окремих генотипів виявило домінування генотипу ТС, порівняно з гомозиготними генотипами ТТ та СС. Вивчення розподілу частот поліморфізму -1486 Т/С гена TLR-9 для різних генотипів продемонструвало специфічність змін для генотипу ТС у хворих з ХВЕБІ та відсутність таких для генотипів ТТ та СС.

Дослідження щодо визначення поліморфізму -1486 Т/С TLR-9, який асоційований з хронічними формами ВЕБ-інфекції, підтверджує важливу роль TLR-опосередкованої сигналізації у патогенезі даного захворювання, що є необхідним для визначення генетичного фону, пов'язаного з перебігом хвороби та можливими наслідками ХВЕБІ. Саме ці аспекти в подальшому дозволять визначати групи ризику серед таких хворих і провести своєчасну терапію.

Ключові слова: вірус Епштейна-Барр, Толл-подібні рецептори, поліморфізм, поширеність.

На сьогодні науковцями доведено, що імунна відповідь на наявність інфекційного агента в організмі людини залежить від факторів вродженого імунітету, який є спадково закріпленою системою захисту від патогенів [1-3]. Толл-подібні рецептори (*Toll-like receptors, TLR*) є основними сигнальними рецепторами, які експресуються внутрішньоклітинно і на поверхні клітин: нейтрофілах, макрофагах, дендритних клітинах, ендотеліальних і епітеліальних клітинах, а також натуральних кілерів (НК) [3, 4].

У ссавців описано 11 TLR, з них у людини наявні 10. Ефекторні клітини вродженого імунітету експресують всі 10 типів TLR, кожен з яких зв'язується зі специфічним лігандом [3]. Численні експериментальні дослідження, а також накопичені результати з клінічної практики переконливо свідчать про ключову роль Толл-подібних рецепторів у патогенезі імунопатологічних захворювань [4-6].

Розпізнавання бактерійних структур (ліпополісахаридів, ліпопротеїну, флагеліну та ін.) відбувається через активацію TLR-1, 2, 4, 5 і 6 [3]. Чотири TLR рецептори здатні розпізнавати нуклеїнові кислоти – це TLR-3, 7, 8 і 9; TLR-7 і TLR-8 розпізнають власну і вірусну одноланцюгову РНК, а TLR-9 пов'язує неметильовану ДНК бактерій. TLR-3 здатний розпізнавати дволанцюгову РНК вірусів, тому даний рецептор відіграє ключову роль у противірусній імунній відповіді [3, 7].

Сучасні дослідження дозволили встановити, що однією з основних причин, яка може впливати на імунну

відповідь TLR при інфекційній патології, вважається поліморфізм генів, що їх кодують. Накопичується все більше даних, які засвідчують, що поліморфізм одиничних нуклеотидів (*single-nucleotide polymorphism*, SNP) за рахунок формування специфічних алелей генів вносить важливий вклад у фенотипові відмінності між людьми, у тому числі в індивідуальні особливості розвитку захисних реакцій, а також сприйнятливості до цілого ряду захворювань [7-9].

Відмінності в генах, які контролюють захисні реакції організму, можуть визначати різний характер перебігу запальної відповіді та специфічних імунологічних реакцій при контакті з чужорідними структурами. У першу чергу, це стосується генів регуляторних молекул, які забезпечують початкові етапи розвитку запальної реакції: розпізнавання патогена, проведення внутрішньоклітинного активаційного сигналу та синтез медіаторів запальної реакції [7, 9, 10].

Поліморфізм генів передбачає, що з одного і того ж гена може бути скопійовано декілька варіантів, які структурно відрізняються від копії одного і того ж білка, з них частина скопійованих варіантів або не активна, або ж може мати протилежну функцію [1, 2]. Стосовно TLR-поліморфізму встановлено, що він може призводити до порушень розпізнавання інфекційних агентів і дисбалансу функціонування системи природженого імунітету та проявлятися підвищенням чутливості до інфекцій і розвитком хронічних запальних процесів. Інші дослідження доводять, що поліморфізм генів TLR за рахунок виражених порушень імунної відповіді може обумовлювати тяжкість перебігу інфекційного процесу, який набуває характеру системної запальної відповіді, а також розвиток танатогенезу [2, 3].

Усі гени підроддини TLR-9 кодуються двома екзонами. Амінокислотні послідовності TLR-7 і TLR-8 мають 72,7 % схожість, а кодують їх гени, ідентичні на 42,3 % і локалізовані на X-хромосомі (Xp22). Ген TLR-9 є на короткому плечі 3 хромосоми (3p21.3) і зчеплений з такими генами, як MyD88 і CAMP, які знаходяться в регіоні, що містить гени пухлинного росту [2]. Білкові продукти всіх перерахованих вище генів відіграють велику роль як в реакціях вродженого імунітету при безпосередньому захисті (LL-37), так і в передачі сигналу в клітині (MyD88, NF-κB).

Останнім часом з'явилися роботи по асоціації поліморфізму генів TLR-2 і TLR-9 з інфекційними захворюваннями. Відомо, що такий поліморфізм гена TLR-2 як Arg753Gln, T597C асоційований з інфекцією, спричиненою *Candida albicans*, *M. tuberculosis*, цитомегаловірусом (ЦМВ), вірусом простого герпесу 1-го та 2-го типу, (ВПГ-1 та ВПГ-2) та іншими патогенами [8-12]. Поліморфізми гена TLR-9 G1174A, G1635A, A2848G асоційова-

ні з системним червоним вовчаком, розвитком інфекції, викликаной ВІЛ-1, та іншими захворюваннями [8]. Перераховані вище поліморфізми розташовуються як в LRR-домени TLRs, що розпізнає патоген, так і в TIR-домени, що бере участь у проведенні сигналу в клітину.

Ряд досліджень продемонстрували роль TLR у патогенезі хвороби Лайма. Ліпопротеїни борелій, зокрема OspA, є потенційними активаторами запальної реакції за рахунок зв'язування з CD14 і TLR-2 на макрофагах. В результаті цього відбувається індукція секреції макрофагопосередкованих прозапальних цитокінів рецепторами TLR-2, TLR-6, TLR-1/2, TLR-5, TLR-9. Димери рецепторів TLR-2/TLR-6, TLR-2/TLR-1 через розпізнавання триацилірованих ліпопротеїнів, таких як *Borrelia burgdorferi* OspA, флагеліну, пептидогліканів і зімозана, беруть участь в активації ядерного транскрипційного фактора NF-κB [2, 3, 8, 9].

Досліджено поліморфізм генів (-1237T/C, rs5743836; -1486T/C, rs187084, 1174G/A, rs352139; та 2848C/T, rs352140) серед 72 дітей з ЦМВ-інфекцією [13]. Авторами встановлено підвищену частоту гетерозиготних генотипів TLR-9 -1486 T/C і 2848 C/T у немовлят з ЦМВ-інфекцією порівняно з неінфікованими випадками. Гетерозиготні варіанти цих двох SNP підвищували ризик захворювання на ЦМВ у дітей і можуть бути генетичним фактором ризику [14].

Однак дослідження щодо розповсюдженості різних типів поліморфізму генів TLR у хворих з ВЕБ-інфекцією у сучасній науковій літературі проведено у недостатньому обсязі.

Мета дослідження – дослідити частоту поліморфізму -1486 T/C гена TLR-9 у хворих з хронічними формами ВЕБ-інфекції.

Матеріали і методи

Робота виконана на кафедрі загальної і клінічної імунології та алергології медичного факультету Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна та клінічних базах кафедри Обласної клінічної інфекційної лікарні м. Харкова у 2009-2016 рр. в рамках науково-дослідної теми: «Вивчення ролі імунних, автоімунних та метаболічних порушень в патогенезі та наслідках інфекційного процесу, викликаного герпесвірусами», № державної реєстрації 0112U005911.

Усім хворим проводили загальноприйнятні та спеціальні біохімічні дослідження: клінічний аналіз крові, сечі, біохімічні дослідження у динаміці захворювання.

Матеріалом для дослідження була сироватка хворих на ВЕБ-інфекцію, яка була отримана в період розпалу захворювання. Кров для досліджень забирали натще з ліктьової вени у кількості 10 мл у стерильну пробірку типу «Епендорф».

Специфічні противірусні антитіла (VCA-IgM, EA-IgM і EBNA-IgG) у сироватці крові визначали методом твердофазного імуоферментного аналізу (тІФА) наборами виробництва «IBL» (Німеччина) і «Вектор-Бест» (РФ) згідно з наведеними інструкціями. У частини пацієнтів для диференціальної діагностики проводили серологічні обстеження на ВПГ-1, ВПГ-2, ЦМВ, токсоплазму, віруси гепатитів А, В і С, ВІЛ-інфекцію. Для цього використовували такі тест-системи для тІФА: анти-ВГА-IgM, анти-ЦМВ-IgM, анти-Токсо-IgM, HBsAg, анти-НСV-total і анти-ВІЛ-1+2-total, виробництва «Вектор-Бест» (РФ), «IBL» (Німеччина).

Для виявлення ДНК ВЕБ методом ПЛР із зворотною транскрипцією з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією продуктів ампліфікації використовували набори реагентів «Амплісенс» (Росія). Виділення ДНК із зразків проводили за допомогою відповідного набору для виділення ДНК фірми «Минипреп» (Силекс М, Росія), використовуючи методику сорбції ДНК на сорбенті по Boom R. та співавт., 1990. Ампліфікацію ДНК проводили з використанням відповідного набору Силекс-М (Москва) на ампліфікаторі БІС.

Геному ДНК виділяли за допомогою «Комплекту для виділення ДНК/РНК із сироватки або плазми крові» (ЛитТех, Росія).

Поліморфну ділянку -1486 T/C, rs187084 гена TLR9 визначали за допомогою ампліфікації методом ПЛР в режимі реального часу шляхом визначення довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ)-ПЛР з використанням NcoI рестриктази та наступних олігонуклеотидних праймерів:

5'-GAGGACAACGAAATCCTGTTGGGCA-3',
5'-GTCGACGGTGGAGATACTGCTGAGG-3'.

ДНК праймери до генів-мішеней були підібрані з використанням програми GeneRunner v.3.0 і синтезовані фірмою «ЛитТех» (Росія).

Електрофоретичне розділення ампліконів проводили методом горизонтального електрофорезу в направленні від катода (-) до анода (+) в 3 % агарозному гелі при напрузі 10-15 V на 1 см гелю. Для електрофорезу використовували 1x трис-ацетатний (ТАЕ) буфер, що готували з 50x ТАЕ буфера (0,04M трис-ацетат, 0,002M ЕДТА, рН=8,3). Гелі фарбували 1 % розчином етидіуму броміду. Фрагменти ДНК, що аналізувалися, проявлялися у вигляді червоних смуг при опроміненні УФ-світлом із довжиною хвилі 310 нм.

Результати досліджень опрацьовано методом варіаційної та кореляційної статистики з використанням програми «Statistica 10.0 for Windows». Для кожного варіаційного ряду розраховували середню арифметичну (M), середнє квадратичне відхилення (σ), середню помилку середньої арифметичної (m). Також використовувалися методи параметричної й непараметричної статистики. Кількісний і якісний аналіз внутрішньосистемних і міжсистемних кореляційних зв'язків проводився з використанням методу кореляційних структур та послідовного аналізу Вальда.

Розподіл генотипів визначали, застосовуючи закон Харді-Вайнберга – закон популяційної генетики, який дозволяє оцінити популяційний ризик генетично-детермінованих захворювань, оскільки кожна популяція має свій набір алелів фонду та, відповідно, різну частоту несприятливих алелей.

Розподіл досліджуваних поліморфних генотипів перевіряли на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга за допомогою критерію χ^2 .

Порівняння частот алелей та генотипів між групами, які досліджувалися, проводили шляхом аналізу таблиць спряження 3x2 за допомогою точного тесту Фішера. Для порівняння частот варіантів у нез'язаних групах вираховували відношення шансів (OR) із визначенням 95 % довірчого інтервалу (CI). Відносний ризик розвитку захворювання та ускладнення оцінювали за допомогою показника OR. Значення OR та 95 % довірчого інтервалу вираховували за допомогою програми Odds ratio calculator (http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php). Показник OR=1 розглядали як відсутність асоціації; OR>1 – як позитивну асоціацію («схильність»), OR<1 – як негативну асоціацію алеля або генотипу із захворюванням.

Результати досліджень та їх обговорення

Встановлення діагнозу ХВЕБІ проводилося на підставі клінічних проявів, скарг і результатів лабораторних досліджень. Бралися до уваги клінічні ознаки, що свідчать про активність вірусної інфекції: лихоманка, лімфаденопатія, наявність хронічних запальних вогнищ у ротоглотці та носоглотці, симптоми астенизації. Крім того, оцінювали виразність і особливості мононуклеозоподібного синдрому, враховували наявність проявів супутньої патології.

Під час дослідження дотримувалися положень Гельсінської Декларації Всесвітньої Медичної Асоціації, етичного кодексу лікаря України, інформування хворого про характер дослідження. Відповідно до Міжнародної статистичної класифікації хвороб Десятого перегляду (версія 2007 р.), клінічний діагноз у хворих, що увійшли в дослідження, визначався як В27. У пацієнтів старших 18 років верифікація клінічного діагнозу ІМ проводилася відповідно до рекомендацій Ж.І. Возіанової і співавт. (2001).

Критеріями відбору пацієнтів у групу ХВЕБІ була наявність скарг: швидка стомлюваність, загальна слабкість, емоційна лабільність, депресивні стани, безсоння, біль голови, озноб, дискомфорт у горлі, болі в м'язах. При клінічному обстеженні звертали увагу на збільшення лімфатичних вузлів, субфебрильну лихоманку, гіперемію ротоглотки. В окремих пацієнтів відзначалася гепатоспленомегалія (табл. 1).

Як етіотропну терапію використовували валацикловір по 1000 мг 3 рази на добу у різних групах та імуномодулятор алокін-альфа по 1,0 мл підшкірно 1 раз у два дні

(курс 6 ін'єкцій). Ефективність проведеної терапії у хворих на ВЕБ-інфекцію оцінювали на підставі клінічних даних, досягнення біохімічної, лабораторної та вірусологічної ремісії (зникнення ДНК ВЕБ або зниження рівня віремії).

Характеристика основних клінічних форм у хворих на ХВЕБІ представлена у таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристика основних клінічних форм у хворих ХВЕБІ

Клінічні симптоми	Абсолютна кількість (n=183)	%
Астеновегетативний синдром	183	100,0
Ураження лімфоїдної тканини глотки	132	72,0
Периферична лімфаденопатія	121	66,1
Артралгія, міалгія, невралгія	91	49,7
Тривалий субфебрилітет	90	49,1
Гепатолієнальний синдром	18	9,8

Аналіз даних, представлених у таблиці, дозволив встановити, що серед хворих на ХВЕБІ найбільш частим клінічним синдромом був астеновегетативний, який проявлявся загальною слабкістю (69 %), швидкою стомлюваністю (73 %), болем голови (85 %), порушенням сну (45 %), ураженням дихальних шляхів у вигляді тонзиліту і фарингіту більше 3 разів на рік (72 %).

Синдром лімфаденопатії спостерігався у 121 хворого на ХВЕБІ. Лімфаденопатія характеризувалася

переважно збільшенням передньошийних і задньошийних лімфатичних вузлів.

Артралгії, міалгії, невралгії і менінгеальні симптоми мали 49,7 % хворих на ХВЕБІ. Синдром тривалого субфебрилітету характеризувався коливаннями температури тіла протягом дня від 37,2 до 37,5 °С і спостерігався у 90 пацієнтів на ХВЕБІ. І майже у 10 % випадків було підтверджено гепатолієнальний синдром у даної категорії хворих.

У більшості хворих дані клінічного обстеження свідчили про поліморфність і неспецифічний характер клінічних проявів, проте вони характеризувалися стійкістю і тривалістю.

Показники клінічного аналізу крові характеризувалися нормальним вмістом лейкоцитів, кількість яких складала в середньому $(5,7 \pm 1,9) \times 10^9/\text{л}$. У 2/3 хворих на ХВЕБІ відзначався лімфоцитоз (64,7 %) і моноцитоз (62,4 %). Відсотковий вміст лімфоцитів у середньому склав $(39,5 \pm 2,1) \%$, а моноцитів – $(11,3 \pm 0,9) \%$ відповідно.

Дослідження по визначенню поліморфізму -1486 Т/С гена TLR-9 було проведено 44 хворим на ХВЕБІ. Серед них жінок – 25 (56,8 %), чоловіків – 19 (43,2 %) віком від 18 до 44 років. Контрольну групу для вивчення поширеності поліморфізму -1486 Т/С гена TLR-9 склали 40 здорових осіб донорів. Середній вік складав $(24,2 \pm 2,4)$ роки, при діапазоні від 18 до 44 років.

Розподіл хворих і здорових за віком та статтю представлено у таблиці 2.

Таблиця 2

Розподіл обстежених за віком і статтю (абс. число, %)

Вік, роки	Хворі на ХВЕБІ (n=44)				Контроль (n=40)			
	чоловіки		жінки		чоловіки		жінки	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
18-24	4	21,1	7	28,0	10	45,4	9	50,0
25-34	10	52,6	10	40,0	6	27,3	5	27,8
35-44	5	26,3	8	32,0	6	27,3	4	22,2
Всього	19	43,2	25	56,8	22	55,0	18	45,0

У результаті молекулярно-генетичного обстеження 44 хворих на ХВЕБІ та пацієнтів контрольної групи отримано такі генотипи -1486 Т/С гена TLR-9 – ТТ, ТС, СС.

Частота розподілу виявлених генотипів -1486 Т/С SNP гена TLR-9 у пацієнтів з ХВЕБІ була такою: генотип ТТ – 11 % (5 хворих), ТС – 73 % (32) та СС – 16 % (7). У контрольній групі дикий тип генотипу ТТ виявлено у 40,0 % (16 пацієнтів), гетерозиготний генотип ТС – у

45,7 % (18), тоді як гомозиготний генотип СС – у 14,3 % (6 пацієнтів) (мал. 1).

Слід зазначити, що гомозиготний генотип СС був верифікований майже з однаковою частотою серед груп досліджуваних пацієнтів – 16 та 15 % відповідно, тоді як гомозиготний генотип ТТ, навпаки, частіше реєструвався серед контрольної групи пацієнтів – 40 % проти 11 %. Верифікація гетерозиготного генотипу ТС значно частіше верифікувалася в групі пацієнтів з ХВЕБІ – 73 проти 45 %.



Мал. 1. Частота окремих генотипів -1486 T/C гена TLR-9 у хворих з ХВЕБІ (зліва) та контрольної групи (справа).

Частота генотипів -1486 T/C гена TLR-9 – TT, TC, CC у відсотках (P) ± стандартне відхилення відсотка (SdP – для біномного розподілу) і результати t-тесту Ст'юдента наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Частота генотипів -1486 T/C гена TLR-9 – TT, TC, CC, (P±m)%

TLR-9 rs187084 C/T	Хворі з ХВЕБІ (n=44)	Контроль (n=40)
TT	11,00±0,32 ¹	40,00±0,49
TC	73,00±0,45 ¹	45,00±0,50
CC	16,00±0,37	15,00±0,36

Примітка. ¹ – достовірна вірогідність від контрольної групи на рівні p<0,05.

Як видно з таблиці, частота генотипу TT -1486 T/C гена TLR-9 відрізнялася статистичною вірогідністю порівняно з даними контрольної групи і становила 11,00±0,32 проти 40,00±0,49 (p<0,05). Також досліджуваний показник відрізнявся статистично значущо від показників контрольної групи для генотипу TC і становив 73,00±0,45 проти 45,00±0,50 (p<0,05). Суттєво не відрізнялися частота генотипу CC -1486 T/C гена TLR-9 від показників контрольної групи – 16,00±0,37 проти 15,00±0,36 (p>0,05).

Розподіл частот генотипів для хворих з ХВЕБІ та пацієнтів контрольної групи за результатами статистичного аналізу наведено у таблиці 4.

При аналізі розподілу частот генотипів -1486 T/C гена TLR-9 у хворих на ІМ були встановлені статистично значимі відмінності на рівні p<0,05 для генотипів TT та TC у групі хворих з ХВЕБІ і контрольній групі. Так, для гомо-

зиготного генотипу TT цей показник склав 11 проти 40 % (p<0,05), для генотипу TC – 73 проти 45 % (p<0,05), тоді як для генотипу CC розподіл частот не мав статистично значущої відмінності порівняно з показниками контрольної групи і з однаковою частотою виявлявся у досліджуваних групах хворих – 16 проти 15 % (p>0,1).

Згідно з розрахованим показником відношення шансів, присутність у геномі хворих з ХВЕБІ гетерозиготного генотипу TC (CI:1,3-8,1 і OR=3,26, відповідно) є специфічним для хворих з ХВЕБІ, що дозволяє оцінювати його як позитивну асоціацію, порівняно з отриманими показниками для гомозиготних типів TT (CI:0,06-0,59 і OR=0,19) та генотипу CC (CI:0,33-3,5 і OR=1,07, відповідно), які оцінюються як негативна асоціація генотипів з хронічними формами ВЕБ-інфекції.

Аналіз отриманих результатів поліморфізму -1486 T/C гена TLR-9 дозволив виявити три основних генотипи – TT, TC, CC. Дослідження частоти окремих генотипів виявило домінування генотипу TC, порівняно з гомозиготними генотипами TT та CC. Вивчення розподілу частот поліморфізму -1486 T/C гена TLR-9 для різних генотипів продемонструвало специфічність змін для генотипу TC у хворих з ХВЕБІ та відсутність таких для генотипів TT та CC.

Наше дослідження щодо визначення поліморфізму -1486 T/C TLR-9, який асоційований з хронічними формами ВЕБ-інфекції, підтверджує важливу роль TLR-опосередкованої сигналізації у патогенезі даного захворювання, що є необхідним для визначення генетичного фону, пов'язаного з перебігом хвороби та можливими наслідками ХВЕБІ. Саме ці аспекти в подальшому дозволять визначати групи ризику серед таких хворих і провести своєчасну терапію.

Таблиця 4

Розподіл частот генотипів -1486 T/C гена TLR-9 у хворих з ХВЕБІ

TLR-9 rs187084 C/T	Хворі з ХВЕБІ (n=44)	Контроль (n=40)	Критерій Фішера	OR (odds ratio)	95 % CI
TT	5 (11 %)	16 (40 %)	p<0,05	0,19	0,06-0,59
TC	32 (73 %)	18 (45 %)	p<0,05	3,26	1,3-8,1
CC	7 (16 %)	6 (15 %)	p>0,1	1,07	0,33-3,5

Висновки

1. У хворих з ХВЕБІ статистично достовірно частіше, ніж у контрольній групі, виявляється поліморфізм -1486 Т/С гена TLR-9.

2. Розподіл частот поліморфізму -1486 Т/С гена TLR-9 дозволив встановити асоціацію генотипу ТС з хронічними формами ВЕБ-інфекції.

Література

1. Друцкая М.С. Врожденное распознавание вирусов / М.С. Друцкая, П.В. Белоусов, С.А. Недоспасов // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 25, № 3. – С. 7-19.
2. Barton G.M. Viral recognition by Toll-like receptors / G. M. Barton // *Seminars in Immunology*. – 2007. – Vol. 19, N 1. – P. 33-40.
3. Kawai T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors / T. Kawai, S. Akira // *Nature Immunology*. – 2010. – Vol. 11, N 5. – P. 373-384.
4. Differential expression of toll-like receptors in dendritic cells of patients with dengue during early and late acute phases of the disease / S. Torres, J. C. Hernández, D. Giraldo [et al.] // *PLoS Neglected Tropical Diseases*. – 2013. – Vol. 7, N 2. – P. e2060.
5. Gibson J. Expression and functions of innate pattern recognition receptors in T and B Cells / J. Gibson, N. Gow, S. Y. C. Wong // *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*. – 2010. – Vol. 10, N 1. – P. 11-20.
6. Toll-like receptor agonists synergistically increase proliferation and activation of B cells by Epstein-Barr virus / S. Iskra, M. Kalla, H.-J. Delecluse [et al.] // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84, N 7. – P. 3612-3623.
7. Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection / P.-Y. Bochud, M. Hersberger, P. Taffé [et al.] // *AIDS*. – 2007. – Vol. 21, N 4. – P. 441-446.
8. A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis / N. T. T. Thuong, T. R. Hawn,

- G. E. Thwaites [et al.] // *Genes and Immunity*. – 2007. – Vol. 8, N 5. – P. 422-428.
9. The rs5743836 polymorphism in TLR9 confers a population-based increased risk of non-Hodgkin lymphoma / A. Carvalho, C. Cunha, A. J. Almeida [et al.] // *Genes and Immunity*. – 2011. – Vol. 13, N 2. – P. 197-201.
10. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation / S. Kijpittayarit, A. J. Eid, R. A. Brown [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 44, N 10. – P. 1315-1320.
11. Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2 / E. Gaudreault, S. Fiola, M. Olivier, J. Gosselin // *J. Virology*. – 2007. – Vol. 81, N 15. – P. 8016-8024.
12. EBV Latent Membrane Protein 1 is a Negative Regulator of TLR9 / I. Fathallah, P. Parroche, H. Gruffat [et al.] // *J. Immunology*. – 2010. – Vol. 185, N 11. – P. 6439-6447.
13. TLR9 -1486T/C and 2848C/T SNPs Are Associated with Human Cytomegalovirus Infection in Infants / E. Paradowska, A. Jabłońska, M. Studzińska, K. Skowrońska // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11, N 4. – P. e0154100.
14. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells / S. Fiola, D. Gosselin, K. Takada, J. Gosselin // *J. Immunology*. – 2010. – Vol. 185, N 6. – P. 3620-3631.

References

1. Drutskaya, M.S., Belousov, P.V., & Nedospasov, S.A. (2011). Vrozhdennoye raspoznavaniye virusov [Congenital virus detection]. *Molekulyarnaya biologiya*, 25(3), 7-19 [in Russian].
2. Barton, G.M. (2007). Viral recognition by Toll-like receptors. *Seminars in Immunology*, 19(1), 33-40.
3. Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373-384.
4. Torres, S., Hernández, J.C., Giraldo, D., Arboleda, M., Rojas, M., Smit, J.M., & Urcuqui-Inchima, S. (2013). Differential expression of Toll-like receptors in dendritic cells of patients with dengue during early and late acute phases of the disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7 (2), e2060.
5. Gibson, J., Gow, N., & Wong, S.Y.C. (2010). Expression and functions of innate pattern recognition receptors in T and B cells. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*, 10(1), 11-20.
6. Iskra, S., Kalla, M., Delecluse, H.-J., Hammerschmidt, W., & Moosmann, A. (2010). Toll-like receptor agonists synergistically increase proliferation and activation of B cells by Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*, 84 (7), 3612-3623.

7. Bochud, P.-Y., Hersberger, M., Taffé, P., Bochud, M., Stein, C. M., Rodrigues, S. D., ... Aderem, A. (2007). Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS*, 21 (4), 441-446.
8. Thuong, N.T., Hawn, T.R., Thwaites, G.E., Chau, T.T. H., Lan, N.T., Quy, H.T., ... & Dunstan, S.J. (2007). A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. *Genes and Immunity*, 8 (5), 422-428.
9. Carvalho, A., Cunha, C., Almeida, A.J., Osório, N.S., Saraiva, M., Teixeira-Coelho, M., ... & Rodrigues, F. (2011). The rs5743836 polymorphism in TLR9 confers a population-based increased risk of non-Hodgkin lymphoma. *Genes and Immunity*, 13 (2), 197-201.
10. Kijpittayarit, S., Eid, A.J., Brown, R.A., Paya, C.V., & Razonable, R.R. (2007). Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin. Infect. Dis.*, 44 (10), 1315-1320.
11. Gaudreault, E., Fiola, S., Olivier, M., & Gosselin, J. (2007). Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *J. Virology*, 81(15), 8016-8024.
12. Fathallah, I., Parroche, P., Gruffat, H., Zannetti, C., Johansson, H., Yue, H., ... Hasan, U.A. (2010). EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. *J. Immunology*, 185(11), 6439-6447.

13. Paradowska, E., Jabłońska, A., Studzińska, M., & Skowrońska, K. (2016). TLR9 -1486T/C and 2848C/T SNPs are associated with human cytomegalovirus infection in infants. *PLOS ONE*, 11(4), e0154100.

14. Fiola, S., Gosselin, D., Takada, K., & Gosselin, J. (2010). TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunology*, 185(6), 3620-3631.

PREVALENCE OF POLYMORPHISM OF THE TLR 9 TYPE GENE IN PATIENTS WITH CHRONIC FORMS OF INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

T.I. Liadova

V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

SUMMARY. The prevalence of polymorphism -1486 T/C of TLR-9 gene in 44 patients with chronic forms (CEBV) caused by Epstein-Barr virus was studied. Based on the results obtained, three main genotypes -1486 T/C of the gene TLR-9-TT, TC, CC, were identified. The analysis of the results of the -1486 T/C polymorphism of the TLR-9 gene revealed three main genotypes – TT, TC, CC. Investigation of the frequency of occurrence of individual genotypes revealed the dominance of the genotype TC, compared with the homozygous genotypes of TT and CC. The study of frequency distribution of the TLR-9 -1486 T/C gene polymorphism for different genotypes demonstrated the specificity of changes in the TC genotype in patients with CEBV and the absence of such for the genotypes of TT and CC.

The aim of the study. To determine the TLR-914 T/C gene polymorphism in patients with CVEB caused by Epstein-Barr virus.

Materials and methods. Research for the determination of polymorphism -1486 T/C TLR-9 gene was performed in 44 patients with chronic forms of the VEB infection. A control group to study the prevalence of polymorphism -1486 T/C TLR-9 gene were 40 healthy donors. For detecting the DNA of the VEB by PCR with reverse transcription with hybridization and fluorescence detection of amplification products, the Amplisents reagent sets (Russia) were used. DNA isolation from the specimens was performed using a kit for DNA extraction by the Miniprep Company (Siles M, Russia), using the sorption assay technique of the sorbent. Polymorphic region -1486 T/C, rs187084 of the TLR9 gene was studied by real-time PCR amplification by determining the length of the restriction fragment-PCR using restriction enzymes NcoI and oligonucleotide primers.

Results. The analysis of the results of the -1486 T/C polymorphism of the TLR-9 gene revealed three main genotypes – TT, TC, CC. Investigation of the frequency

of occurrence of individual genotypes revealed the dominance of the genotype TC, compared with the homozygous genotypes of TT and CC. The study of frequency distribution of the TLR -1486 T/C gene polymorphism for different genotypes demonstrated the specificity of changes in the TC genotype in patients with HEBV and the absence of such for the genotypes of TT and CC.

The TLR -1486 T/C TLR-9 polymorphism assay, which is associated with chronic forms of the EBV-infection, confirms the important role of the TLR-mediated signaling in the pathogenesis of the disease, which is necessary to determine the genetic background associated with the course of the disease and its possible consequences. It is these aspects that will further enable the identification of risk groups among such patients and provide timely therapy

Conclusions

Analysis of the results allowed establishing the following:

1. It has been shown that in patients with CVEB, the TLR-9 gene is -1486 T/C genetically more commonly detected in the control group than in the control group.
2. The frequency distribution of the polymorphism -1486 T/C polymorphism of the TLR-9 gene allowed the establishment of the association of the genotype TC with chronic forms of the VEB infection.

Key words: chronic Epstein-Barr virus, Toll-like receptors, polymorphism, prevalence.

Відомості про автора

Лядова Тетяна Іванівна – к.мед.н., доцент кафедри загальної та клінічної імунології та алергології Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна; t.lyadova@karazin.ua

Information about author

Liadova T. – PhD, Associate Professor of General and Clinical Immunology and Allergology Department of V.N. Karazin Kharkiv National University; t.lyadova@karazin

Конфлікту інтересів немає.

Author has no conflict of interest to declare.

Отримано 27.11.2017 р.