

УДК 575.191

НАЯВНІСТЬ ПОЛІМОРФНОЇ АЛЕЛІ 896G ГЕНУ TLR4 (RS4986790) ВИЗНАЧАЄ ЗНИЖЕНУ ПРОДУКЦІЮ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ ІЛ-6 ТА ФНП- α *ІЗМАЙЛОВА О. В., ШЛИКОВА О. А., КАЙДАШЕВ І. П.*

Науково-дослідний інститут генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія»

За останні роки відмічається значний прорив знань у розумінні механізмів функціонування вродженого імунітету на молекулярному рівні. Рецептори клітин системи вродженого імунітету відіграють виключно важливу роль у захисті від патогенів, що стало більш очевидно, коли були відкриті образрозпізнавальні рецептори (OPR), що розглядаються як носії еволюційної пам'яті багатоклітинних організмів про розпізнавання «чужого» і сигналізації про небезпеку для організму з наступною мобілізацією певних ефекторних ланок адаптивного імунітету [1, 2]. Ключову роль у вродженому імунітеті, патогенезі імунітопосередкованих захворювань, розвитку запалення та патогенній ідентифікації відіграють Toll-подібні рецептори (TLR) – найдавніші представники сигнальних OPR, які розпізнають чужорідні для організму еволюційно консервативні молекулярні структури мікробного походження – патогенасоційовані молекулярні патерни (ПАМП), що властиві великим групам мікроорганізмів, є для них критичними при реплікації та/чи для виживання, не зустрічаються у багатоклітинних еукаріот і які не піддаються серйозним мутаційним змінам, що можуть стати летальними для мікроба [3, 4]. На відміну від інших рецепторів, вони здатні забезпечити активацію клітин після взаємодії майже з будь-якими типами мікроорганізмів і є ланкою, що зв'язує реакції вродженого та набутого імунітету [5].

Нині відомі та досить добре вивчені ліганди для більшості TLR. Важливим є те, що TLR можуть розпізнавати як екзогенні, так і ендогенні ліганди, які з'являються в результаті розвитку запалення та/або пошкодження тканин [6]. Ліганди TLR модулюють декілька фізіологічно важливих функцій клітин: продукцію розчинних медіаторів (прозапальних цитокінів – ФНП, ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12 ін.), експресію поверхневих маркерів, які безпосередньо відповідають за зв'язування лігандів, адгезивних, костимуляторних молекул тощо. Кількість та спектр вивільнених цитокінів залежить від типу стимульованого TLR та ліганда [7, 8].

Враховуючи важливу роль TLR у реалізації вродженої імунної відповіді, логічно припустити, що дефекти на рівні самих рецепторів, на рівні різних компонентів, що приймають участь у пе-

редачі сигналу, а також факторів, які регулюють їх функцію, можуть призводити до розвитку цілої низки інфекційних та запальних захворювань [9]. Саме тому значна кількість зарубіжних наукових досліджень останніх років була спрямована на розкриття ролі функціонального поліморфізму в генах, що кодують TLR, які пов'язані з підвищеною чи зниженою сприйнятливістю до різноманітних інфекційних захворювань [1].

Метою нашої роботи було вивчення синтезу прозапальних цитокінів (інтерлейкіну-6 (ІЛ-6), фактору некрозу пухлин- (ФНП-)) та проти-запального цитокіну – ІЛ-10 мононуклеарними клітинами периферичної крові (МНПК) у осіб із різними поліморфними варіантами 896A/G гену TLR4 (rs4986790) під дією лігандів TLR (ЛПС та зимозан).

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Враховуючи те, що генетична варіабельність TLR відіграє важливу роль у розпізнаванні ПАМП і може змінювати імунну відповідь на інфекцію, нами проведено дослідження впливу на функціональний стан МНПК присутності поліморфних варіантів 896A/G гену TLR4 (rs4986790). Для цього із бази даних генетичних зразків було відібрано 10 осіб із гетерозиготним генотипом AG та 10 осіб із гомозиготним генотипом AA гену TLR4 (rs4986790) (контрольна група). Із-за низької розповсюженості генотипу GG гену TLR4 (rs4986790) не було достатньої кількості генетичних зразків для формування відповідної групи.

Виділення геномної ДНК із крові проводили з використанням системи пробопідготовки «ДНК-експрес» відповідно до рекомендацій фірми-виробника (НПФ «Литех», Росія).

Від усіх пацієнтів була отримана добровільна письмова згода на участь у науковому дослідженні, яке проводилось із дозволу комісії з біоетики ВДНЗУ «УМСА».

Визначення алелей поліморфної ділянки 896A/G гену TLR4 (rs4986790) проводили методом ампліфікації з наступним рестрикційним аналізом продуктів ПЛР на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технологія», Росія). Продукти розщеплення поліморфних ділянок генів виявляли за допомогою електрофорезу в 3% агарозному

гелі, який забарвлювали етидіумом бромідом із подальшою візуалізацією результатів в УФ-світлі.

Для вивчення спонтанного та індукованого синтезу цитокінів (ІЛ-6, ФНП- α , ІЛ-10) МНПК в асептичних умовах виділяли на градієнті густини фікол-верографіну за методикою Beuym [10]. Для цього забір крові з кубітальної вени проводили натщесерце у вакутайнери з розчином гепарину (Greiner Bio-one, Австрія) (25 ОД/мл крові). Кров розведена двічі фосфатно-сольовим буфером (ФСБ) (рН 7,2) центрифугували при 1500 об./хв протягом 20 хв. у градієнті щільності фікол-верографіну (ТОВ НВЛ «Гранум», Україна, густина 1,077 г/мл). МНПК, які утворили інтерфазне кільце, збирали піпеткою та двічі відмивали у ФСБ.

Для подальшого дослідження лімфоцити у кінцевій робочій концентрації 1×10^6 /мл культивували у середовищі RPMI-1640, що містить 2 ммоль L-глутаміну (Sigma, США), 10% інактивованої телячої сироватки (Sigma, США), 100 мкг/мл гентаміцину сульфату (ГНЦЛС, Україна) впродовж 24 годин при 37°C в атмосфері з 5% CO₂ зі стимулюючим агентом або стерильним ізотонічним розчином.

Для вивчення спонтанного та індукованого синтезу цитокінів у культуральне середовище до МНПК вносили ліганди TLR. У якості лігандів TLR використовували стимулятор ЛПС (*Escherichia coli* O127:B8, Sigma, США), який додавали до інкубаційного середовища, у кінцевій концентрації 0,1 мкг/мл; зимозан (*Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, США) у кінцевій концентрації 10,0 мкг/мл. Оптимальні дози були вибрані на основі даних літератури [11, 12]. Контролем слугували МНПК, які культивували тільки у повному середовищі RPMI-1640 без додавання стимуляторів. Після закінчення інкубації МНПК осаджували центрифугуванням при 1500 об./хв впродовж 15 хв. Отримані супернатанти зберігали при температурі -70°C.

Концентрацію ІЛ-6, ФНП- α , ІЛ-10 визначали в супернатантах методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням комерційних тест-систем «ИФА-ІЛ-6», «ИФА-ІЛ-10», «ИФА-TNF-alpha» (ООО «Цитокин», Росія) згідно рекомендованих методик. Для виявлення змін концентрацію цитокінів визначали в контрольній пробі (зібраний супернатант через 24 години інкубації МНПК у поживному середовищі у присутності стерильного ізотонічного розчину – контроль для виявлення спонтанного синтезу цитокінів) та в дослідних пробах (зібраний супернатант через 24 години інкубації МНПК в поживному середовищі в присутності ЛПС чи зимозану – індукований синтез цитокінів).

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням програми «STATISTICA

for Windows 6.0» (StatSoft Inc, США). Для оцінки достовірності відмінностей застосовували критерії базової статистики (t-тест для незалежних вибірок). Для усіх видів аналізу статистично значимими вважали відмінності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

TLR4 є ключовим рецептором імунної відповіді на грамнегативні бактерії, основним структурним компонентом зовнішньої стінки яких є бактеріальний ЛПС. У гені TLR4 ідентифіковано декілька однонуклеотидних поліморфізмів, що знаходяться у третьому екзоні, який кодує екстрацелюлярний LRR-домен і відповідає за зв'язування лігандів, а також обумовлює зниження відповіді на ЛПС, призводячи до вибіркового порушення захисних реакцій організму проти грамнегативних бактерій [13-15]. Першим серед всіх описаних однонуклеотидних поліморфізмів у генах і найбільш вивченим є поліморфізм 896A/G гену TLR4 (rs4986790). Наявність алелі 896G асоціюється з гіпорективністю на ЛПС, а також підвищеною сприйнятливістю до грамнегативних інфекцій [16-18].

Функціональний поліморфізм генів TLR, пов'язаний із заміною одиничних нуклеотидів, викликає кількісні зміни функціонування відповідних генів, що призводить до зниження здатності розпізнавати відповідні ліганди, а також зниження ефективності проведення сигнальних імпульсів, у результаті чого виникає порушення активації клітин імунної системи при конфронтації з патогеном [2].

При дослідженні реагування МНПК осіб із гетерозиготним варіантом AG гену TLR4 (rs4986790) на відповідні ліганди (ЛПС та зимозан) було встановлено зниження спонтанної продукції ІЛ-6 ($600,98 \pm 85,67$ пг/мл), ФНП- α ($61,32 \pm 13,48$ пг/мл) та ІЛ-10 ($12,53 \pm 0,88$ пг/мл) у порівнянні з контрольною групою осіб, у яких була відсутня алель G ($742,85 \pm 38,44$ пг/мл; $74,49 \pm 9,86$ пг/мл та $11,82 \pm 0,59$ пг/мл, відповідно) ($p = 0,0002$; $0,023$ та $0,048$, відповідно).

Для оцінки здатності МНПК продукувати цитокіни у відповідь на дію ЛПС визначали концентрацію ІЛ-6, ФНП- α та ІЛ-10 у зразках досліджуваних груп. Було встановлено достовірне зниження рівня ІЛ-6 та ФНП- α у групі осіб із поліморфним варіантом 896A/G гену TLR4 (rs4986790) ($663,71 \pm 58,86$ пг/мл та $176,53 \pm 9,08$ пг/мл, відповідно) у порівнянні з контрольною групою ($701,71 \pm 19,97$ пг/мл та $184,24 \pm 5,52$ пг/мл, відповідно) ($p = 0,069$ та $p = 0,034$, відповідно). Рівень ІЛ-10 був дещо вищим у групі з гетерозиготним варіантом AG гену TLR4 (rs4986790) ($77,93 \pm 10,02$ пг/мл), ніж у групі контролю ($70,26 \pm 12,03$ пг/мл) і достовірно не відрізнявся ($p = 0,139$).

Схожі результати були отримані при дослідженні впливу зимозану на синтез МНПК досліджува-

них цитокінів. Ми відмічали достовірне зниження продукції ІЛ-6 та ФНП-α у групі осіб із генотипом AG гену TLR4 (rs4986790) (700,86 ± 37,36 пг/мл та 172,91 ± 6,81 пг/мл, відповідно) у порівнянні з групою контролю (743,57 ± 21,31 пг/мл та 181,01

± 8,52 пг/мл, відповідно) (p = 0,006 та p = 0,030, відповідно). Достовірно не відрізнялись результати за рівнем ІЛ-10 у групах із генотипом AG гену TLR4 (14,13 ± 2,14 пг/мл) та контролю (14,95 ± 1,57 пг/мл) (p = 0,139) (табл.).

Таблиця

Відмінності продукції ІЛ-6, ФНП-α та ІЛ-10 у осіб із генотипами AA і AG гену TLR4 (rs4986790)

	ІЛ-6			TNF-α			ІЛ-10		
	відсутність алелі G, M ± SD	наявність алелі G, M ± SD	p	відсутність алелі G, M ± SD	наявність алелі G, M ± SD	p	відсутність алелі G, M ± SD	наявність алелі G, M ± SD	p
Спонтанна продукція, пг/мл	742,85 ± 38,44	600,98 ± 85,67	0,0002	74,49 ± 9,86	61,32 ± 13,48	0,023	11,82 ± 0,59	12,53 ± 0,88	0,048
Стимуляція ЛПС, пг/мл	701,71 ± 19,97	663,71 ± 58,86	0,069	184,24 ± 5,52	176,53 ± 9,08	0,034	70,26 ± 12,03	77,93 ± 10,02	0,139
Стимуляція зимозаном, пг/мл	743,57 ± 21,31	00,86 ± 37,36	0,006	181,01 ± 8,52	172,91 ± 6,81	0,030	14,95 ± 1,57	14,13 ± 2,14	0,341

Раніше нами був встановлений зв'язок між інфікуванням уrogenітальними інфекціями та наявністю поліморфної алелі 896G гену TLR4 (rs4986790) [9]. Із огляду на отримані результати, це може бути пов'язано з недостатньою продукцією прозапальних цитокінів, а саме ІЛ-6 та ФНП-α.

Таким чином, знижена здатність продукувати прозапальні цитокіни (ІЛ-6 та ФНП-α) у відповідь на дію ЛПС та зимозану в пацієнтів із наявною алеллю 896G гену TLR4 (rs4986790) може обумовлювати схильність до інфікування грамнегативними (зокрема уrogenітальними) збудниками та викликати імунодефіцитний стан, що носить спадковий характер, пов'язаний, щонайменше, із функціональним поліморфізмом TLR4 (rs4986790).

ЛІТЕРАТУРА

1. Хаитов Р. М. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете / Р. М. Хаитов, М. В. Пашенков, Б. В. Пинегин // Иммунология. – 2009. – № 1. – С. 66–76.
2. Роль Toll-подобных рецепторов в регуляции иммунного ответа в норме и при патологии / Н. Я. Спивак, И. М. Богданова, Н. И. Мартиросова [и др.] // Физиологический журнал. – Т. 54, № 6. – С. 87–99.
3. Nasu K. Pattern recognition via Toll-like receptor system in the human female reproductive tract / K. Nasu, H. Nahara // Mediators of Inflammation. – 2010. – ID 976024. – p. 112.
4. Плехова Н. Г. Современное представление о роли клеток врожденного иммунитета при

инфекционных болезнях / Н. Г. Плехова, Л. М. Сомова // Бюллетень СО РАМН. – 2011. – Т. 31, № 4. – С. 5–12.

5. Механизмы противоинфекционной функции врожденного иммунитета при трансплантации: роль Toll-подобных рецепторов / С. И. Сусков, М. В. Глебова, В. С. Сускова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2012. – Т. XIV, № 2. – С. 116–123.
6. Толл-подобные рецепторы (TLR) и их значение в опухолевой прогрессии / Д.В. Щербяков, Д. Ю. Логунов, А. И. Тухватулин [и др.] // Acta naturae. – 2010. – Т. 2, № 3 (6). – С. 28–37.
7. The expression and roles of Toll-like receptor in the biology of the human neutrophil / L. Parker, M. K. B. Whyte, S. K. Dower [et all.] // J. Leukocyte Biology. – 2005. – Vol. 77. – P. 886–892.
8. Опосредованные через Toll-подобные рецепторы выработка цитокинов и экспрессия поверхностных маркеров лейкоцитами человека / М. В. Хорева, Л. В. Ковальчук, А. С. Варивода [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2006. – Т. 7, № 2. – С. 199–206.
9. Зв'язок поліморфізмів генів TLR2 та TLR4 зі схильністю до окремих уrogenітальних інфекцій / О. В. Ізмайлова, О. А. Шликова, Н. О. Боброва [та ін.] // Цитология и генетика. – 2011. – № 4. – С. 29–35.
10. Beyum A. Separation of lymphocytes from blood and bone marrow / A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol. 21. (Suppl.). – P. 97–98.

11. *Hayashi F.* Toll-like receptors stimulate human neutrophil function / F. Hayashi, T. K. Means, A. Luster // *Blood.* – 2003. – Vol. 102. – P. 2660–2669.
12. *Deering R.* Development of a clinical assay to evaluate Toll-like receptor function / R. Deering, J. S. Orange // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2006. – Vol. 13 (1). – P. 68–76.
13. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms / B. Ferwerda, M. McCall, K. Verheijen [et all.] // *Mol. Med.* – 2008. – Vol. 14. – P. 346–352.
14. Симбирцев А. С. Толл-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета / А. С. Симбирцев // *Иммунология.* – 2005. – № 6. – P. 368–377.
15. Полиморфизм рецепторов врожденного иммунитета / А. М. Иванов, А. В. Апчел, Т. А. Камилова [и др.] // *Вестник российской военно-медицинской академии.* – 2009. – Т. 1, № 25. – С. 172–184.
16. *Schnare M.* Toll-like receptor: sentinels of host defence against bacterial infection / M. Schnare, M. Rollinghoff, S. Qureshi // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2006. – Vol. 139, N 1. – P. 75–85.
17. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections / D. Agnese, J. Calvano, S. Hahm [et all.] // *J. Infect. Diseases.* – 2002. – Vol. 186, N 10. – P. 1522–1525.
18. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in the patients with Gram-negative septic shock / E. Lorenz, J. Mira, K. Frees [et all.] // *Arch. Intern. Med.* – 2002. – Vol. 162, N 9. – P. 1028–1032.

РЕЗЮМЕ

НАЛИЧИЕ ПОЛИМОРФНОЙ АЛЛЕЛИ 896G ГЕНА TLR4 (RS4986790) ОПРЕДЕЛЯЕТ СНИЖЕННУЮ ПРОДУКЦИЮ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ИЛ-6 И ФНО- α

Измайлова О.В., Шлыкova О. А., Кайдашев И.П.

Изучен синтез провоспалительных цитокинов (интерлейкина-6, фактора некроза опухоли- α) и противовоспалительного цитокина – интерлейкина-10 мононуклеарными клетками периферической крови у 10 лиц с генотипом AG и 10 лиц с генотипом AA гена TLR4 (rs4986790) под действием лигандов TLR (липолисахарид и зимозан).

Установлена статистически значимая сниженная способность мононуклеарных клеток периферической крови синтезировать провоспалительные цитокины интерлейкин-6 и фактор некроза опухоли- α в ответ на действие липополисахарида и зимозана у пациентов с наличием аллели G гена TLR4 (rs4986790).

Наличие данной аллели в генотипе является одним из факторов, который может вызывать иммунодефицитное состояние, носящее наследственный характер, и обуславливать восприимчивость к инфицированию грамотрицательными инфекциями.

SUMMARY

THE PRESENCE OF POLYMORPHIC 896G ALLELE OF TLR4 GENE (RS4986790) DETERMINES THE REDUCED PRODUCTION OF PROINFLAMMATORY IL-6 AND TNF- α CYTOKINES I.P.

Izmailova O.V., Shlykova O.A., Kaidashev I.P.

Research Institute for Genetics and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics, Higher State Educational Establishment of Ukraine “Ukrainian Medical Stomatological Academy”, Poltava

The synthesis of proinflammatory cytokines (interleukine-6, tumor necrosis factor- α) and anti-inflammatory cytokines (interleukine-10) by mononuclear cells of peripheral blood in 10 individuals with AG genotype and 10 individuals with AA genotype of TLR4 gene (rs4986790) under the action of TLR ligands (lipopolysaccharide and zymozan) has been studied.

The statistically significant reduction in the ability of peripheral blood mononuclear cells to synthesize the proinflammatory cytokines (interleukin-6 and tumor necrosis factor- α) in response to LPS and zymozan in patients with G allele of TLR4 gene (rs4986790) has been detected.

The presence of this allele in the genotype is one of the factors that can cause immune deficiency condition, bearing the hereditary nature and stipulating the susceptibility to contamination with gram-negative infections.