

АНАЛІЗ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКУ ПОЛІМОРФІЗМУ ПЕРШОГО ЕКЗОНА ГЕНА МАНАН- ЗВ'ЯЗУЮЧОГО ПРОТЕЇНА І ПОКАЗНИКІВ ФАГОЦИТОЗУ У ХВОРИХ НА УРОГЕНІТАЛЬНУ ПАТОЛОГІЮ

О.А. Сокол, О.П. Білозоров, О.Й. Мілютіна,
Т.В. Частій, С.В. Унучко

ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України»

Резюме. Метою роботи є аналіз взаємозв'язку поліморфізму першого екзона гена манан-зв'язуючого протеїна і показників фагоцитозу у хворих на урогенітальну патологію. Проведено визначення фагоцитарної активності нейтрофілів, фагоцитарного числа, фагоцитарного індексу та опсонізуючої активності сироватки. Виявлено, що у хворих з генотипами А0 та 00 знижені деякі показники фагоцитозу, що може призводити до зниження імунної відповіді організму.

Ключові слова: фагоцитоз, манан-зв'язуючий протеїн, генотипування

ВСТУП

Інфекції, що передаються статевим шляхом (ІПСШ), становлять в Україні і в світі важливу соціальну і медичну проблему. Перебіг пов'язаного з ІПСШ патологічного процесу, з однієї сторони, значною мірою залежить від особливостей інфекційного агента, його патогенності та вірулентності, а з іншої – від реактивності макроорганізму, стану імунної системи, наявності факторів, що сприяють більшої або меншої схильності до виникнення захворювання. Дослідження цих двох сторін перебігу інфекційного процесу в останні роки набуло нового змісту у зв'язку з розробкою і впровадженням в практику методів генотипування, які засто-

совуються як для характеристики генетично обумовлених властивостей мікроорганізму, так і макроорганізму.

Вроджений імунітет є першою лінією захисту, який захищає організм хазяїна від патогенних агентів шляхом розпізнавання останніх та їх елімінації. Впізнавання патоген-асоційованих молекулярних патернів (ПАМП) це основа розпізнавання у системі вродженого імунітету. Ефектори включають як клітини вродженої імунної системи, так і вроджені імунні розчинні фактори. Одним з білків, що циркулюють в крові, є лектин, який зв'язує манан, або манан-зв'язуючий протеїн (МЗП) [10,12]. МЗП, через свій домен розпізнавання вуглеводів, розпізнає молекулярні патерни, які присутні в бага-

тьох патогенах, або експоновані неоепітопи на апоптозних і пошкоджених клітинах [10,12]. Дефіцит МЗП є первинним імунodefіцитом, який впливає з генетичних дефектів, які відбуваються в 5-30 % населення, в залежності від етнічної приналежності [5]. Дефекти гену МЗП людини можуть бути викликані одиничними нуклеотидними поліморфізмами (SNP) в промоторній області і області екзону 1 [5]. Комбінації цих SNPs можуть приводити до зниження концентрації в крові і / або дисфункції МЗП [5,9]. Вважають, що дефіцит МЗП асоційований з підвищеною сприйнятливістю до багатьох патогенів [9,10]. Встановлено, що МЗП-опосередкований механізм захисту від інфекції включає функцію опсоніну, активацію лектинового шляху комплементу і регуляцію запалення. Вважають, що дефіцит МЗП може бути фактором ризику для розвитку ускладнень при інфекційних захворюваннях [5,9,10,12].

Ген МЗП (*MBL*) людини розташований на хромосомі 10 (q21-24), в екзоні 1 були визначені функціональні поліморфізми [7]. Кодон 54 (алельний варіант 0) є одним з трьох сайтів найбільш загального МЗП поліморфізму в європеїдних популяціях [4,5,9]. Частота алельних варіантів гену МЗП розрізняється у різних етнічних групах. Поліморфізми можуть приводити до продукції нестабільного МЗП, який швидко деградує, в результаті чого значно знижується концентрація МЗП в крові [4,5]. Так, наприклад, встановлено, що варіант алеля 0 гену МЗП асоційований з рецидивуючими інфекціями дихальних шляхів [8]. Крім того, у дослідженнях показано, що ступінь опосередкованого *S.pneumoniae* пошкодження при ішемічній хворобі серця або астмі варіюється залежно від генотипу МЗП [6,11]. Наявність варіанту генотипу, який корелює зі зниженням концентрації МЗП, пов'язано з більш важким перебігом захворювання.

Метою роботи є аналіз взаємозв'язку поліморфізму першого екзона гену мананзв'язуючого протеїна і показників фагоцитозу у хворих на урогенітальну патологію.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Клінічні зразки були отримані від 25 хворих, які зверталися в поліклініку ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України» або лікувалися в ньому, з діагнозами уретрит, простатит, ендocerвіцит та інші. Етіологічним фактором найчастіше була трихомонадна та хламідійна інфекція.

Фагоцитоз часток пекарських дріжджів визначали за методом Когана А.Х. та ін. [3]. Визначали фагоцитарну активність нейтрофілів (відсоток активних нейтрофілів), фагоцитарне число (середня кількість мікроорганізмів, які були фагоцитовані одним нейтрофілом), фагоцитарний індекс (відношення загальної кількості фагоцитованих мікроорганізмів до загального числа підрахованих нейтрофілів), опсонізуючу активність сироватки (відношення загальної кількості фагоцитованих мікроорганізмів нейтрофілами в аутологічній сироватці, розчиненої у 20 разів, до такого ж показника, отриманого у середовищі без сироватки). Аналіз поліморфізму першого екзона гену мананзв'язуючого протеїна (МЗП) з визначенням алелів А, 0 проводили за Madsen Н.О. зі співавт. [5] методом ПДРФ. На першому етапі ампліфікували фрагмент першого екзона гену МЗП з використанням праймерів: F 573 5'-TCACGCAGTGTCAACAAGGAA-3' та B 1354 5'-AGTTGTTGTT-CTCCTGTCCAG-3'. Утворені при ампліфікації фрагменти піддавали дії рестриктаз *BanI* та *MboII* («Thermo Scientific»). Детекцію результатів рестрикції проводили електрофорезом в 2 % агарозному гелі на трансільюмінаторі («Биоком», РФ) при довжині хвилі 310 нм. Використовували маркер молекулярної маси SM1191 (діапазон 700-25 н.п.) виробництва «Thermo Scientific».

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням двохвибіркового F-тесту для дисперсії, двохвибіркового t-тесту с однаковими або різними дисперсіями, визначення критичного значення вибіркового коефіцієнта кореляції r_a [1,2].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Враховуючи дані літератури про участь МЗП в лектиновому шляху активації системи комплементу, а також зміну його активності у носіїв деяких поліморфізмів гену *MBL*, було проведено визначення фагоцитарної активності нейтрофілів, фагоцитарного числа, фагоцитарного індексу та опсонізу-

ючої активності сироватки. Отримані дані свідчать про значні індивідуальні розбіжності досліджених показників у окремих хворих, при цьому було виявлено зв'язок деяких показників фагоцитозу з генотипами МЗП. Результати дослідження показників фагоцитозу і генотипів МЗП у хворих на урогенітальну патологію представлені в таблицях 1, 2.

Таблиця 1

Результати визначення фагоцитарної активності нейтрофілів, фагоцитарного числа, фагоцитарного індексу та опсонізуючої активності сироватки у хворих на урогенітальну патологію ($M \pm m$)

Кількість хворих	Фагоцитарна активність нейтрофілів периферичної крові, %	Фагоцитарне число	Фагоцитарний індекс	Опсонізуюча активність сироватки
Всього хворих - 25	80,48±2,47	3,1±0,12	2,45±0,15	3,02±0,4
Серед них: чоловіки - 19	80,53±2,78	3,06±0,14	2,45±0,16	3,33±0,51
жінки - 6	80,33±5,83	3,22±0,28	2,45±0,4	2,03±0,22

Не було визначено суттєвих відмінностей показників фагоцитозу в залежності від статі хворих.

Таблиця 2

Результати визначення фагоцитарної активності нейтрофілів, фагоцитарного числа, фагоцитарного індексу та опсонізуючої активності сироватки в залежності від генотипу МЗП у хворих на урогенітальну патологію ($M \pm m$)

Генотип	AA (13 хворих)	A0 (3 хворих)	00 (4 хворих)
Фагоцитарна активність нейтрофілів, %	82,08±3,66	79,33±6,36	80,25±7,81
Фагоцитарне число	3,21±0,18	2,63±0,17	3,35±0,39
Фагоцитарний індекс	2,53±0,23 $p \leq 0,05$	2,1±0,06	2,77±0,55
Опсонізуюча активність сироватки	3,68±0,7 $P \leq 0,05$	3,2±0,82	2,02±0,36

Примітка: p дано відносно різниці значень між показниками фагоцитарного індексу між групами AA і A0; P дано відносно різниці значень між показниками опсонізуючої активності сироватки між групами AA і 00.

Порівняння показників фагоцитозу груп хворих з генотипами AA, A0, 00 дає підстави стверджувати, що між групами AA і A0 є відмінності у значеннях фагоцитарного індексу, а між групами AA і 00 є відмінності у значеннях опсонізуючої активності сироватки, які характеризуються більш високими показниками фагоцитарного індексу і опсонізуючої активності сироватки у носіїв генотипу AA. Ці результати відображають більш високу активність МЗП у хворих з генотипом AA, в той час як у носіїв генотипів A0 та 00 структура МЗП змінена таким чином, що його здатність утворювати комплекси з мананом знижена.

Одночасно треба відзначити існування кореляційних зв'язків між окремими показниками, що характеризують фагоцитарну функцію. Виявлена позитивна кореляція між показниками фагоцитарної активності і фагоцитарного індексу ($r=0,725$), позитивна кореляція між показниками фагоцитарного числа і фагоцитарного індексу ($r=0,793$).

ЛІТЕРАТУРА

1. Боровиков В.П. STATISTICA® – Статистический анализ и обработка данных в среде Windows® [Текст]. Издание 2-е стереотипное / В.П. Боровиков, И.П. Боровиков. – М.: Информационно-издательский дом «Филинь», 1998. – 608 с.
2. Лапач С.Н. Статистика в науке и бизнесе [Текст] / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: Морион, 2002. – 640 с.
3. Пат. 2143693 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/52. Способ определения фагоцитарной активности лейкоцитов [Текст] / Коган А.Х., Стремоухов А.А., Болевич С., Гадаев И.Ю., Лаптева О.Н.; заявитель и патентообладатель Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Коган А.Х., Стремоухов А.А., Болевич С. – № 99107424/14; заявл. 06.04.1999; опубл. 27.12.1999, Бюл. № 36.

Цікаво відзначити також позитивну кореляцію між фагоцитарним індексом і захворюваністю на безпліддя ($r=0,477$), що може бути наслідком хронічного запального процесу, який стимулює функції нейтрофілів. Встановлено, що в загальній групі обстежених хворих 72 % складали хворі на урогенітальну патологію з генотипом AA, 28 % хворих мали генотипи A0 і 00. Кількість хворих з генотипами A0 і 00 була дещо більшою у хворих на безпліддя. Можливо з цим можна пов'язати виявлену кореляцію між значенням фагоцитарного індексу і захворюваністю на безпліддя.

Таким чином, виявлено залежність фагоцитарного індексу та опсонізуючої активності сироватки від поліморфізму МЗП, яка може впливати на особливість розвитку патологічного процесу. Генотипування по цьому локусу дозволяє виявити групу підвищеного ризику по захворюваності на урогенітальну патологію. Можливо, подальші дослідження у цьому напрямку допоможуть деталізувати виявлений зв'язок.

REFERENCES

1. Borovikov, V. P., Borovikov, I. P. (1998). STATISTICA® – Statisticheskii analys i obrabotka danih v srede Windows®. Izdanie 2-e stereotipnoe [STATISTICA® – Statistical analysis and data processing in a Windows®. Edition 2nd stereotypical]. Moscow, Russia: Information and Publishing House "Filin", 608.
2. Lapach, S. N., Chubenko, A. V., Babich, P. N. (2002). Statistika v nauke i biznese [Statistics in science and business]. Kiev, Ukraine: Morion, 640.
3. Kogan, A. K., Stremoukhov, A. A., Bolevich, S., Gadaev, I. Y., Laptev, O. N. (1999). A method of determining the phagocytic activity of leukocytes. Patent of Russian Federation for invention. G01N33/52. № 2143693; declared 06.04.1999; published 27.12.1999, № 36.

4. Babovic-Vuksanovic D. Mannose-binding lectin (MBL) deficiency. Variant alleles in a Midwestern population of the United States [Text] / D. Babovic-Vuksanovic, K. Snow, R.M. Ten // *Ann. Allergy. Asthma Immunol.* – 1999. – Vol. 82. – P. 134-143.
5. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America [Text] / H.O. Madsen, M.L. Satz, B. Hogh [et al.] // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161. – P. 3169-3175.
6. Infection-susceptibility alleles of mannose-binding lectin are associated with increased carotid plaque area [Text] / R.A. Hegele, M.R. Ban, C.M. Anderson, J.D. Spence // *J. Invest. Med.* – 2000. – Vol. 48. – P. 198-202.
7. Mannose-binding deficiency – revisited [Text] / P. Garred, F. Larsen, H.O. Madsen, C. Koch // *Mol. Immunol.* – 2003. – Vol. 40. – P. 73-84.
8. Mannose-binding lectin gene polymorphism is a modulating factor in repeated respiratory infections [Text] / K. Gomi, Y. Tokue, T. Kobayashi [et al.] // *Chest* – 2004. – Vol. 126. – P. 95-99.
9. Takahashi K. Mannose-binding lectin and the balance between immune protection and complication [Text] / K. Takahashi // *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* – 2011. – No. 9 (12). – P. 1179-1190. doi:10.1586/eri.11.136
10. Takahashi K. The role of the mannose-binding lectin in innate immunity / K. Takahashi, R.A. Ezekowitz [Text] // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 41, Suppl. 7. – S. 440-444.
11. The development of asthma in children infected with *Chlamydia pneumoniae* is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin [Text] / A. Nagy, G.T. Kozma, M. Keszei [et al.] // *Allergy Clin. Immunol.* – 2003. – Vol. 112. – P. 729-734.
12. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule [Text] / K. Takahashi, W.E. Ip, I.C. Michelow, R.A. Ezekowitz // *Curr. Opin. Immunol.* – 2006. – No. 18 (1). – P. 16-23.
4. Babovic-Vuksanovic, D., Snow, K., Ten, R.M. (1999). Mannose-binding lectin (MBL) deficiency. Variant alleles in a Midwestern population of the United States. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 82, 134-143.
5. Madsen, H.O., Satz, M.L., Hogh, B., Svejgaard, A., Garred, P. (1998). Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America. *Journal of Immunology*, 161 (6), 3169-3175.
6. Hegele, R.A., Ban, M.R., Anderson, C.M., Spence, J.D. (2000). Infection-susceptibility alleles of mannose-binding lectin are associated with increased carotid plaque area. *Journal of Investigative Medicine*, 48, 198-202.
7. Garred, P., Larsen, F., Madsen, H.O., Koch, C. (2003). Mannose-binding deficiency – revisited. *Molecular Immunology*, 40, 73-84.
8. Gomi, K., Tokue, Y., Kobayashi, T., Takahashi, H., Watanabe, A., Fujita, T., Nukiwa, T. (2004). Mannose-binding lectin gene polymorphism is a modulating factor in repeated respiratory infections. *Chest*, 126 (1), 95-99.
9. Takahashi, K. (2011). Mannose-binding lectin and the balance between immune protection and complication. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 9 (12), 1179-1190. doi:10.1586/eri.11.136
10. Takahashi, K., Ezekowitz, R.A. (2005). The role of the mannose-binding lectin in innate immunity. *Clinical Infectious Diseases*, 41 (7), 440-444.
11. Nagy, A., Kozma, G.T., Keszei, M. (2003). The development of asthma in children infected with *Chlamydia pneumoniae* is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112, 729-734.
12. Takahashi, K., Ip, W.E., Michelow, I.C., Ezekowitz, R.A. (2006). The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. *Current Opinion in Immunology*, 18 (1), 16-23.

**АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ
ПОЛИМОРФИЗМА
ПЕРВОГО ЭКЗОНА
ГЕНА МАННАН-
СВЯЗЫВАЮЩЕГО
БЕЛКА И ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ФАГОЦИТОЗА
У БОЛЬНЫХ С
УРОГЕНИТАЛЬНОЙ
ПАТОЛОГИЕЙ**

**Сокол О.А.,
Белозоров А.П.,
Милютин Е.И.,
Частий Т.В.,
Унучко С.В.**

*ГУ «Институт дерматологии
и венерологии НАМН Украины»*

Резюме. Целью работы является анализ взаимосвязи полиморфизма первого экзона гена маннан-связывающего белка и показателей фагоцитоза у больных с урогенитальной патологией. Проведено определение фагоцитарной активности нейтрофилов, фагоцитарного числа, фагоцитарного индекса и опсонизирующей активности сыворотки. Выявлено, что у больных с генотипами A0 и 00 снижены некоторые показатели фагоцитоза, что может приводить к снижению иммунного ответа организма.

Ключевые слова: фагоцитоз, маннан-связывающий белок, генотипирование

**ANALYSIS OF THE
RELATIONSHIP OF
THE FIRST EXON
GENE POLYMORPHISM
MANNOSE-BINDING
PROTEIN AND INDICATORS
OF PHAGOCYTOSIS
IN PATIENTS WITH
UROGENITAL PATHOLOGY**

**Sokol O.A.,
Bilozorov O.P.,
Milutina O.I.,
Chastii T.V.,
Unuchko S.V.**

*SE "Institute of Dermatology and
Venereology of NAMS of Ukraine"*

Abstract. The aim is to analyze the relationship of the first exon gene polymorphism of mannose-binding protein and phagocytosis in patients with urogenital pathology. Determination of the phagocytic activity of neutrophils, phagocytic number, phagocytic index and serum opsonizing activity was provided. It was revealed that in patients with genotypes A0 and 00 reduced some phagocytosis indicators that may reduce the immune response.

Key words: phagocytosis, mannose-binding protein, genotyping

Про авторів:

Сокол Оксана Анатоліївна – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії імунології, патоморфології та молекулярної генетики ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України», oksanasokol@yahoo.co.uk

Білозоров Олексій Павлович – доктор медичних наук, завідувач лабораторії імунології, патоморфології та молекулярної генетики ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України»

Мілютіна Олена Йосипівна – молодший науковий співробітник лабораторії імунології, патоморфології та молекулярної генетики ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України»

Частій Тетяна Володимирівна – молодший науковий співробітник лабораторії імунології, патоморфології та молекулярної генетики ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України»

Унучко Сергій Васильович – кандидат медичних наук, науковий співробітник відділу інфекцій, що передаються статевим шляхом ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України»