УДК:612.017.1:616.921.5

Малежик Л.П., Карпова Н.И., Малежик М.С., Нимаева Д.Ц.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ TOLL-4 (Asp299Gly) и TOLL-6 (Ser249Pro) РЕЦЕПТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ У ДЕТЕЙ, ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г.Чита

Резюме. *В статье анализируется роль полиморфизма генов Toll-4 (Asp299Gly) и Toll-6 (Ser249Pro) рецепторов в развитии низкой противовирусной защиты у детей, часто болеющих острыми респираторными инфекциями. Показано, что в крови больных детей с полиморфизмом гена Toll-4 рецептора уменьшается синтез цитокинов ИЛ-1-β, ФНО-α и увеличивается содержание ИЛ-1RA по сравнению с группой больных детей без аномальных нарушений в сигнальных рецепторах. При полиморфизме в генах Toll-6 рецептора уменьшается концентрация цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-8, ФНО-α и ИЛ-10. Концентрация ИЛ-1RA увеличивается у генотипов Pro/Pro и Gly/Gly по сравнению с группой пациентов без полиморфных изменений в соответствующих рецепторах. Генетические нарушения в синтезе цитокинов при полиморфизме генов Toll-4 (Asp299Gly) и Toll-6 (Ser249Pro) рецепторов являются одной из причин несостоятельности противовирусной защиты у детей, часто болеющих ОРВИ.*

Ключевые слова: *ОРВИ, TLR, полиморфизм, цитокины.*

L.P.Malezhik, N.I. Karpova, M.S.Malezhik, D.T. Nimaeva

EFFECT OF GENE POLYMORPHISM TOLL-4 (ASP 299 GLY) AND TOLL-6 (SER 249 PRO) RECEPTORS ON CYTOKINE PRODUCTION OF CHILDREN WITH FREQUENT EPISODES OF ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS

Summery*. In the article is examined the roly polymorfisms of genes Toll-4 and Toll-6 receptors in the development of low antiviral defense of chickly children. It is shown that in the blood of children with polymorphism in genes Too-4 (Asp299Gly) receptor increased synthesis of sytokines IL-1β, TNF-α and decreased IL-1RA. With polymorphism in the gene for Toll-6 receptors it is reduced concentration of cytokines IL-1β, IL-8, TNF-α and IL-10. The concentration IL-1RA decreased with genotypes Pro/Pro and Gly/Gly compared to patients with ill children without abnormal disturbances in the signaling receptors. With polymorphism of genes Toll-4 and Toll-6 receptor synthesis of cytokines is reduced, it is regarded as one of the reasons for the low antiviral defense of the immune system of children defects in the signaling receptors.*

Keywords*: Acute respiratory viral infection, TLR, polymorphism, cytokines*

Введение. Часто болеющие дети (ЧБД) – это термин, обозначающий группу детей с более высоким, чем у сверстников, уровнем заболеваемости острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ). Максимальная заболеваемость ОРЗ среди детей отмечается в возрасте от 6 месяцев, до 6 лет и составляет более 6 эпизодов в году [3, 8]. Согласно современным представлениям основной причиной высокой восприимчивости детей к вирусной инфекции является незрелость иммунной системы [1, 2, 9] и наследственная предрасположенность к инфекционным заболеваниям [4, 5]. Генетические изменения в системе иммунитета могут быть на разных этапах иммунного ответа. В первую очередь это касается рецепторов, контактирующих с патогеном. Главную роль в распознавании патогена играют Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR). Они входят в состав клеточных мембран всех иммунокомпетентных клеток [6]. Полиморфизм генов Toll-рецепторов ассоциирован с рядом заболеваний. Из данных литературы известно, что SNP (Asp299Gly) гена Toll-4 ассоциирован с септическим шоком [11], с развитием атеросклероза и ишемической болезни сердца [10], сахарным диабетом [7]. SNP Ser249Pro в гене Toll-6 рецептора отмечено у больных бронхиальной астмой [12]. В более ранних работах [4] нами было установлено, что в группе часто болеющих ОРВИ детей 55,6% имеют генетические мутации в Toll-4 (Asp299Gly) и 75% в гене (Ser249Pro) Toll-6 рецептора.

Лигандами для Toll-4 рецепторов является двуспиральная ДНК вирусов, а для Toll-6 рецепторов – ЛПС грамотрицательных бактерий. Контакт патогенраспознающих рецепторов с лигандом запускает синтез цитокинов, которые регулируют степень иммунных реакций.

Мы полагаем, что генетические нарушения в Toll-рецепторах сказываются на уровне внутриклеточной сигнализации и количестве продуцируемых цитокинов.

Цель исследования – изучить влияние полиморфизма генов Toll-4 (Asp299Gly) и Toll-6 (Ser249Pro) рецепторов на продукцию цитокинов у детей, часто болеющих острой респираторной вирусной инфекцией.

Материалы и методы исследования

Клиническую группу составили 190 детей обоего пола в возрасте от 1 года до 3 лет, часто болеющих острыми респираторными вирусными инфекциями. Из числа обследуемых детей в 49% был грипп, в 26% - парагрипп, в 5% - аденовирусная инфекция, в 4% синцитиальный вирус. Критериями включения в исследования были: в анамнезе не менее 6 эпизодов ОРВИ, возраст пациентов от 1 до 3 лет, первые 3 дня заболевания.

В исследование не включали детей с хроническими бронхолёгочными заболеваниями (бронхиальная астма, рецидивирующий бронхит, пороки развития дыхательной системы, аллергические заболевания). Работа проводились на базе НИИ медицинской экологии. Исследуемым материалом являлась венозная кровь.

В качестве популяционного контроля использовали выборку из 76 условно здоровых детей (30 мальчиков и 46 девочек) в возрасте от 1 года до 10 лет. Выделение ДНК осуществлялось при помощи наборов «ДНК-экспресс кровь» (НПФ «Литехс», Россия, Москва). Синтез использованных в работе олигонуклеотидных праймеров выполнен НПФ «Литехс», Москва. Выявление мутаций проводилось методом ПЦР. Концентрацию цитокинов определяли методом твёрдофазного ИФА с использованием реагентов ТОО «Вектор-Бест» г. Новосибирск.

Исследования проводили на 90 больных ОРВИ детей с полиморфизмом генов Toll-4 (Asp299Gly) и 100 больных носителей полиморфизма Toll-6 (Ser249Pro) рецепторов. Все обследуемые были поделены на 7 групп: 1 группа – здоровые дети, контроль (n=76); 2 группа – больные ОРВИ дети, имеющие генотип Asp/Asp (n=40); 3 группа – больные дети, имеющие генотип Asp/Gly (n=18); 4 группа – больные дети, имеющие генотип Gly/Gly (n=32); 5 группа – больные дети с генотипом Ser/Ser (n=25); 6 группа – дети, имеющие генотип Ser/Pro (n=50); 7 группа – дети с генотипом Pro/Pro (n=25).

Статистическая обработка материала проведена методом вариационной статистики с помощью пакетов программ Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6,0. Перед началом анализа вариационные ряды тестировались на нормальность с использованием критерия Шапиро-Уилка W. При нормальном распределении использовался критерий Стъюдента (t-тест). Показатели представлены в виде средних величин со стандартным отклонением (M±SD). При ненормальном распределении признака применялся критерий Манна-Уитни (U-тест). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Наши исследования показали, что при полиморфизме генов (Asp299Gly) Toll-4 рецепторов синтез IL-1ß снижен по сравнению с группой больных генотипа Asp/Asp, у которых нет полиморфных изменений (Табл.1).

Синтез второго противовоспалительного цитокина ФНО-α при полиморфизме гена Toll-4 рецептора у часто болеющих детей увеличен по сравнению с контролем, но в случае генотипа Asp/Gly в меньшей степени (9,9 пкг/мл), чем при генотипе Gly/Gly (12,34 пкг/мл).

Концентрация хемокина IL-8 при ОРВИ высока независимо от наличия или отсутствия мутаций в гене.

Синтез противовоспалительного цитокина IL-4 в первые дни заболевания не меняется и полиморфные варианты гена Toll-4 на него не влияют.

Концентрация IL-10 увеличивается у больных ОРВИ - носителях всех изучаемых генотипов.

Уровень IL-1RA значительно повышен в крови больных детей-носителей генотипа Gly/Gly. Концентрация IL-1RA у них очень высока и составляет (1984,3 пкг/мл).

Пытаясь связать генетические аномалии Toll-4 с синтезом медиаторов воспаления, мы смогли отметить однонаправленное уменьшение в концентрации IL-1β в генотипах Asp/Gly и Gly/Gly по сравнению с генотипом Asp/Asp.

Таблица 1

Содержание цитокинов у пациентов носителей полиморфных аллелей Asp299Gly в гене Toll-4 рецепторов (медиана, 25-75 перцентили) (пкг/мл)

Цитокины	Здоровые дети (n=76) (1)	Asp/Asp (n=40) (2)	Asp/Gly (n=18) (3)	Gly/Gly (n=32) (4)
ИЛ-1β	5,4 [3,6-6,5]	17,6* [12,9-22,1]	14,6* [9,9-20,5]	13,9* [11,2-17,5]
ИЛ-8	7,9 [6,9-9,1]	21,8* [12,3-22,2]	20,3* [13,1-21,9]	27,7* [11-29,2]
ФНОα	2,3 [1,5-2,5]	11,3* [8,25-14,3]	9,9*# [8,0-12,1]	12,4* [11,4-15,4]
ИЛ-4	1,9 [1,2-2,5]	1,5 [0,85-2,02]	1,4 [0,9-2,09]	1,7 [1,3-2,09]
ИЛ-10	1,2 [0,7-1,8]	2,6* [1,7-3,9]	2,9* [1,5-2,8]	2,4* [1,9-4,2]
ИЛ-1RA	342,9 [263,8-465,4]	1571* [1179-1649]	1139,2*# [1050-1578]	1984,3*# [1214-2033]

Примечание: U – критерий Манна Уитни; * – значимость различий по сравнению с контролем; # – значимость различий по сравнению с группой носителей гомозиготного Asp/Asp генотипа.

Более четкие результаты получены при анализе цитокиновых реакций у больных – носителей полиморфизма гена Toll-6 рецептора.

У больных при всех полиморфных вариантах в гене Toll-6 уровень провоспалительного цитокина IL-1ß в сравнении с контрольной группой оказался значительно повышен. У носителей нормального гомозиготного генотипа Ser/Ser наблюдались самые высокие цифры цитокина, по сравнению с остальными группами (таблица 2).

Концентрация ФНОα в группе больных, имеющих генотип Pro/Pro, повышалась – 11,7 пкг/мл в сравнении с группой контроля (2,3 пкг/мл), но была ниже, чем у носителей нормального генотипа Ser/Ser - 14,3 пкг/мл. При оценке уровня IL-8 обнаружено, что у детей с генотипом Pro/Pro концентрация хемокина оказалась самой низкой (16,8 пкг/мл). У носителей генотипа Ser/Ser 22,6 пкг/мл, у носителей генотипа Ser/Pro – 17,7 пкг/мл.

Таблица 2

Содержание цитокинов у больных ОРВИ - носителей полиморфных аллелей Ser249Pro в гене Toll-6 рецепторов (медиана, 25-75 перцентили) (пкг/мл)

Цитокины	Здоровые дети (n=76) (1)	Ser/Ser (n=25) (5)	Ser/Pro (n=50) (6)	Pro/Pro (n=25) (7)
ИЛ-1β	5,4 [3,6-6,5]	21,9* [20,6-23,3]	18,2*# [13,4-25,2]	15,4*# [10,3-21,9]
ИЛ-8	7,9 [6,9-9,1]	22,6* [19,5-27,2]	17,7*# [12,9-19,8]	16,8*# [14,4-19,9]
ФНОα	2,3 [1,5-2,5]	14,3* [11,9-16,5]	12,3*# [8,8-14,5]	11,7*# [10-14,7]
ИЛ-4	1,9 [1,2-2,5]	1,2 [0,8-1,6]	1,6 [1,4-1,9]	1,3 [0,9-1,7]
ИЛ-10	1,2 [0,7-1,8]	3,7* [2,4-4,7]	3,2*# [2,1-4,1]	2,2*# [1,1-4]
ИЛ-1RA	342,9 [263,8-465,4]	1391* [1207-1536]	1249,2*# [1053-1577]	1404,3*# [1193-1817]

Примечание: U – критерий Манна Уитни; * – значимость различий по сравнению с контролем. # – значимость различий по сравнению с группой носителей гомозиготного Ser/Ser генотипа.

IL-4 не имел отчетливых различий в зависимости от полиморфных вариантов. У детей-носителей гомозиготного генотипа Pro/Pro концентрация IL-4 составила 1,3 пкг/мл, у детей имеющих генотип Ser/Ser – 1,2 пкг/мл, в группе контроля – 1,9 пкг/мл.

Содержание ИЛ-10 оказалось самым высоким у детей обладающих нормальным гомозиготным генотипом Ser/Ser - 3,7 пкг/мл, у гетерозигот несколько меньше – 3,2 пкг/мл. При замене аллелей (генотип Pro/Pro) концентрация IL-10 уменьшилась до 2,2 пкг/мл.

Концентрация IL-1RA очень высока во всех полиморфных вариантах гена Toll-6 и особенно у носителей генотипа Pro/Pro- 1404 пкг/мл).

Заключение. Таким образом, наши исследования показали, что у детей, часто болеющих острой респираторной вирусной инфекцией, носителей полиморфизма генов (Asp299Gly) Toll-4 и (Ser249Pro) Toll-6 функциональная несостоятельность противовирусной защиты возникает на уровне синтеза цитокинов, которые являются регуляторами воспалительных реакций. Хотя общее количество про- и противовоспалительных цитокинов в первые дни инфицирования увеличивается, оно не достигает значений больных детей без аномальных нарушений в сигнальных рецепторах.

Дефект сигнальных реакций усугубляется высоким содержанием антагониста рецептора к IL-1 (IL-1RA), который ингибирует Th-1 клеточный путь иммунитета. Кроме того, IL-10 и IL-1RA являются факторами супрессии. Их высокая концентрация ограничивает развитие защитных противовирусных реакций, что осложняет течение воспалительного процесса.

Выводы.

1. При ОРВИ динамика цитокинов имеет свои вариации в зависимости от наличия или отсутствия генетических дефектов в Toll-рецепторах, воспринимающих действие патогена.
2. Точечный полиморфизм в генах Toll-4 и Toll-6 рецепторов является одной из причин несостоятельности противовирусной инфекции у детей, часто болеющих ОРВИ.
3. Наличие полиморфизма генов сигнальных рецепторов позволит выделить особую группу диспансерных больных для организации персональной профилактики очередных рецидивов ОРВИ.

Литература:

1. Борисова В.Н. Состояние системы иммунитета у часто болеющих детей / В.Н. Борисова, В.А. Булгакова // Иммуномодуляторы и вакцинация. – М.: 4 Мпресс, 2013. – 272 с.
2. Железникова Г.Ф. Цитокины как предикторы течения и исходы инфекций / Г.Ф. Железникова // Цитокины и воспаление. – 2009. – № 8 (1). – С. 10-17.
3. Казюкова Т.В. Часто болеющие дети: современные возможности снижения респираторной заболеваемости /Т.В.Казюкова, Г.С.Коваль, Г.А.Самсыгина // Педиатрия. – 2012. – 91(5). – С.42-48.
4. Карпова Н.И. Генетические основы низкой противоинфекционной защиты у часто болеющих детей в Забайкалье / Н.И.Карпова, Л.П.Малежик, М.С.Малежик // IY Межд. Конф. «Медицинские и психо-педагогические аспекты». – Славянск. – 2012. – С.135-139.
5. Самсыгина Г.А. Проблемы диагностики и лечения часто болеющих детей на современном этапе / Г.А.Самсыгина, Г.С.Коваль // Педиатрия. – 2009. – № 2. – С. 137-145.
6. Симбирцев А.С. Toll-белки : специфические рецепторы неспецифического иммунитета / А.С.Симбирцев // Иммунология. – 2005. – № 6. – Р. 368-377.
7. Сульская Ю.В. Генетический полиморфизм toll-kike рецепторов 4 типа у больных сахарным диабетом 2 типа / Ю.В. Сульская // Таврический медико-биологический вестник. – 2009. – №3(47). – С.72-74.
8. Учайкин В.Ф. Эволюция патогенеза инфекционных болезней / В.Ф.Учайкин // Детские инфекции. – 2012. – 11(4). – С.4-8
9. Ярцев М.Н. Иммунная недостаточность, часто болеющие дети и иммунокоррекция / М.Н.Ярцев, К.П.Яковлева // Вопросы современной педиатрии. – 2005. – Т.4. – С.72-74.
10. Kiechl S. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis /E.Lorens [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2002. – Vol.347. – P.185-192.

11. Lorens E. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock / E. Lorens, J. Mira // Arch. Intern. Med. – 2002. – Vol.162. – P.1028-1032.
12. Tantisira K. Toll-like receptor 6 gene (TLR6): singlenukleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of astma / K.Tantisira, W. Klimecki, R. Lazarus //Genes Immun. – 2004. – Vol.5. – P. 343-346.