

УДК[616.36-002:616.98]- 085.281

**Кириченко Т.С., Коваль Т.І.**

## **ВПЛИВ ПОЛІМОРФІЗМУ TLR-4 НА КЛІНІЧНИЙ ПЕРЕБІГ ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ**

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м.Полтава

*Toll-like receptor (TLR) – це рецептори вродженої імунної системи, що розпізнають патогенно пов'язані молекулярні патерни і відіграють важливу роль у вродженій імунній відповіді організму. Відомо, що функціональний поліморфізм генів TLR впливає на характер перебігу захисних реакцій і схильність до різних інфекцій. У статті досліджено поширеність поліморфізму Asp299Gly гена TLR-4 серед 79 ВІЛ-інфікованих осіб та з'ясовано клінічний перебіг ВІЛ-інфекції залежно від варіантів генотипу TLR-4. У ВІЛ-інфікованих осіб з TLR4 Asp299Gly поліморфізмом виявлено підвищений ризик розвитку хронічного гепатиту С, хронічної активної Епіштейна-Барр вірусної інфекції, оперізуючого лишая, простого герпесу, туберкульозу, пневмонії.*

**Ключові слова:** ВІЛ, опортуністичні інфекції, toll-подібний рецептор 4, поліморфізм Asp299Gly.

Робота є фрагментом НДР академії «Визначення ролі поліморфізму Toll-подібних рецепторів у механізмах розвитку імунно-опосередкованих захворювань» № державної реєстрації 0109U001629.

### **Вступ**

ВІЛ-інфекція характеризується поступовою дисфункцією клітинного та гуморального імунітету, що призводить до виснаження CD-4 лімфоцитів, зростання рівня вірусного навантаження ВІЛ та розвитку опортуністичних інфекцій [1]. В основі патогенезу ВІЛ-інфекції та її прогресування до СНІДу важливе значення набуває стан хронічного імунного запалення [2]. В теперішній час активно вивчається роль вродженого імунітету у регуляції імунної відповіді при ВІЛ-інфекції та можливості розвитку опортуністичних інфекцій [3,4].

Toll-like receptors (TLRs) – це рецептори вродженої імунної системи, що розпізнають патогени і, активуючись, збільшують локальний синтез прозапальних цитокинів, простагландинів, хемокінів, що запускають механізм реалізації запальної відповіді[4-8]. TLR-4 є одним з найбільш досліджених серед інших TLR, який розпізнає ліпополісахариди грам-негативних бактерій, грибові патогени, ліганди мікобактерій туберкульозу, а також внутрішні ліганди такі, як фібронектин, ліпопротеїни низької щільності, білки теплового шоку [9-11].

Поліморфізм генів TLR позначається на індивідуальних особливостях імунітету. Відомо, що функціональний поліморфізм генів, відповідальних за розпізнавання патогена і реалізацію початкових етапів запалення, впливає на характер перебігу захисних реакцій і обумовлює схильність до ряду захворювань[12].

Дослідження останніх років висвітлюють роль поліморфізму окремих TLR у патогенезі ВІЛ-інфекції. Так, поліморфізм TLR-9 пов'язують з швидким зниженням CD-4 клітин, високим вірусним навантаженням ВІЛ та швидшою клінічною прогресією ВІЛ [13-15]. Вища сприйнятливість до туберкульозу відмічена у ВІЛ-інфікованих з генотипом TLR-4 Asp 299 Gly [16,17]. Існує взаємозв'язок між поліморфізмом TLR-4 та розвитком тяжких опортуністичних інфекцій у ВІЛ-інфікованих осіб з кількістю CD-4 клітин нижче 100 [18]. Однак перебіг ВІЛ-інфекції у хворих з поліморфізмом TLR-4 залишається недостатньо з'ясованим і потребує подальшого дослідження.

### **Мета роботи**

Мета роботи – дослідити поширеність поліморфізму Asp299Gly гена TLR-4 серед ВІЛ-інфікованих Полтавської області та проаналізувати клінічний перебіг ВІЛ-інфекції залежно від варіантів генотипу TLR-4.

### **Матеріали та методи дослідження**

З метою визначення поширеності поліморфізму Asp299Gly гена TLR-4 обстежили 79 ВІЛ-інфікованих та 65 здорових. В залежності від генотипу TLR-4 ВІЛ-інфіковані були поділені на 2 групи: перша (з генотипом AA) – 52 особи (чоловіків – 27, жінок – 25 ) віком від 25 до 53 років та друга (з генотипом AG) – 9 осіб (чоловіків – 5 , жінок – 4) віком від 30 до 49 років. Враховуючи те, що серед хворих 2-ї групи мінімальний рівень CD-4 визначався більше, ніж 100 кл/мм<sup>3</sup>, у дослідження не включали пацієнтів з генотипом AA з кількістю CD-4 меншою за 100 кл/мм<sup>3</sup>.

За віковим, статевим складом, клінічними стадіями ВІЛ-інфекції групи були рівноцінними. При поглибленому аналізі амбулаторних карт та анамнезу встановлено, що в переважній більшості обстежених обох груп тривалість інфікування ВІЛ не перевищувала 8 років.

Діагноз ВІЛ встановлювали згідно міжнародної класифікації хвороб 10-го перегляду (МКХ-10) та верифікували виявленням специфічних серологічних та молекулярно-біологічних маркерів ВІЛ. Антитіла до ВІЛ виявлялися в крові методом ІФА (тест-системи Labsistem, Нідерланди). Вірусне навантаження ВІЛ визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) (Real Time HIV-1 фірми Abbott). Для оцінки клітинної ланки імунітету визначали загальну кількість лейкоцитів, відносний вміст лімфоцитів та їх кількість CD4+, на проточному цитофлюориметрі FACSCalibur за допомогою програми MultiSET V1.1.2 Software. Генотипування поліморфної ділянки TLR-4 Asp299Gly проводили методом ПЛР з використанням олігонуклеотидних праймерів. Ампліфікацію здійснювали на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технологія», Росія). Для статистичної обробки результатів використовували параметричні та непараметричні методи варіа-

ційної статистики. Для пояснення закономірностей змін параметрів та доведення їх зв'язаності застосовували кореляційний аналіз. Відмінності вважали достовірними при  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та обговорення**

Результати аналізу розподілу частоти генотипів TLR-4 у групах здорових та ВІЛ-інфікованих наведено у табл.1.

Таблиця 1.

Частота генотипів поліморфізму гена TLR4 Asp 299 Gly серед здорових та ВІЛ-інфікованих, % (n).

Ген TLR4	Здорові (n=65)	ВІЛ-інфіковані (n=79)	$\chi^2$
Asp299 Asp (AA)	95,3% (62)	88,6% (70)	1,3
Asp299 Gly (AG)	4,7% (3)	11,4% (9)	

Як видно з даних, наведених у табл.1, в групі ВІЛ-інфікованих гетерозиготний генотип (AG) виявлявся у 11,4% осіб, що достовірно не відрізнялося від групи здорових – 4,7% ( $\chi^2=1,3$ ;  $p > 0,05$ ).

Поглиблений аналіз клінічних характеристик ВІЛ-інфікованих показав, що в групі осіб із генотипом AG достовірно частіше зустрічались опортуністичні інфекції, особливо вірусної етіології (табл. 2). Так, хронічний гепатит С діагностували у всіх 9 (100%) осіб із гетерозиготним генотипом, в той час як в групі пацієнтів із генотипом AA –

лише у 50%. Майже стовідсотково, з високим ступенем достовірності у ВІЛ-інфікованих осіб з генотипом AG виявлялися хронічна активна Епштейна-Барр вірусна інфекція (ХАЕБВІ) (n=6, 66,7%), оперізуючий (n=6, 66,7%) та простий (n=5, 55,6%) герпес, що значно перевищує дані хворих з генотипом AA – 14 (26,9%), 13 (25%) та 9 (17,3%) відповідно. Встановлено також статистично достовірне зростання частоти мутантного генотипу з розвитком туберкульозу та пневмонії ( $\chi^2=4,41$ ;  $p < 0,05$ ).

Таблиця 2.

Частота виявлення опортуністичних інфекцій в залежності від генотипів TLR-4, n (%)

Опортуністичні інфекції (ОІ)	Генотип		$\chi^2$
	AA (n=52)	AG (n=9)	
Хронічний гепатит С	26(50%)	9(100%)	5,93*
Хронічна активна ЕБВ-інфекція	14(26,9%)	6(66,7%)	3,84*
Оперізуючий герпес	13 (25%)	6(66,7%)	4,41*
Простий герпес	9(17,3%)	5(55,6%)	4,36*
Туберкульоз	13 (25%)	6 (66,6%)	4,41*
Пневмонія	13 (25%)	6(66,7%)	4,41*
Втрата ваги	8 (15,5%)	3(33,3%)	0,67
Орофарингеальний кандидоз	27 (51,9%)	5(55,6%)	0,02
Рецидивуючі бактеріальні інфекції верхніх дихальних шляхів	9(17,3%)	3(33,3%)	0,44

Примітка. \* – при  $p < 0,05$  – різниця статистично вірогідна

З метою дослідження кількісного зв'язку між частотою опортуністичних захворювань та показниками вмісту CD4 лімфоцитів у ВІЛ-інфікованих пацієнтів було проведено кореляційний аналіз цих показників. Встановлено, що у пацієнтів з генотипом AA між показниками вмісту CD4 лімфоцитів та частотою опортуністичних захворювань існує достовірний зворотний зв'язок ( $r = - 1$ ;  $p < 0,05$ ), тобто зниження кількості

CD4 лімфоцитів пов'язане зі зростанням опортуністичних захворювань, що співпадає із загальновизнаними даними [13-15]. Привертало увагу, що у пацієнтів з генотипом AG достовірного кореляційного зв'язку між частотою виявлення опортуністичних інфекцій та рівню CD4 клітин не виявлено ( $r = -0,8$ ;  $p > 0,05$ ), що обумовлює необхідність проведення індивідуального аналізу, результати якого відображені на рис.1.

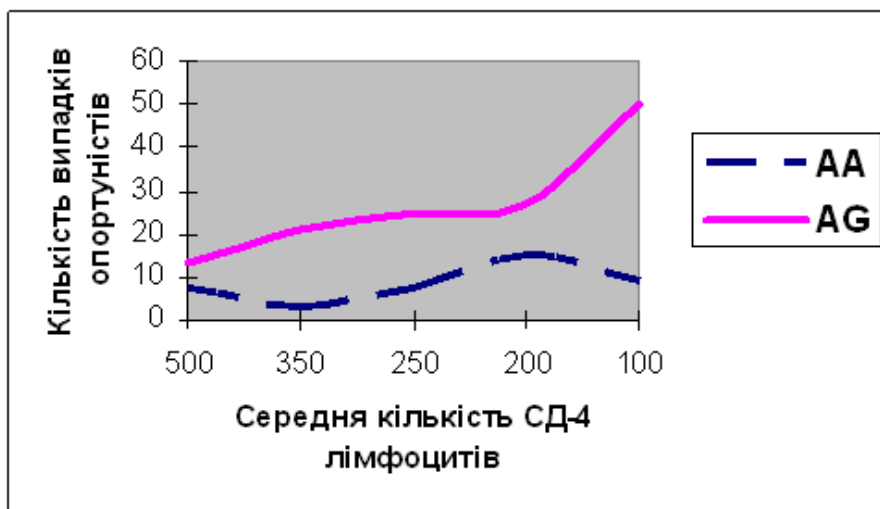


Рис. 1. Частота опортуністичних інфекцій у хворих в залежності від показників СД-4 клітин (кл/мм<sup>3</sup>)

Як видно з даних, представлених на рис.1, у пацієнтів з поліморфізмом TLR-4 розвиток опортуністичних інфекцій відбувається при більш високих показниках СД-4 лімфоцитів, ніж в групі з генотипом AA.

### Висновки

1. У ВІЛ-інфікованих осіб гетерозиготний генотип (AG) TLR-4 асоціюється з підвищеним ризиком розвитку хронічного гепатиту С, хронічної активної Епштейна-Барр вірусної інфекції, оперізуючого лишая, простого герпесу, туберкульозу, пневмонії.

2. Розвиток опортуністичних інфекцій у ВІЛ-інфікованих з генотипом AG відбувається при вищих показниках СД-4 клітин.

### Література

1. Cohen D.E. Human immunodeficiency virus pathogenesis and prospects for immune control in patients with established infection / D.E. Cohen, B.D. Walker // Clin Infect Dis. – 2001. – №32. – P. 1756–1768.
2. Sodora D.L. Immune activation and AIDS pathogenesis / D.L. Sodora, G. Silvestri // AIDS. – 2008. – №22. – P. 439–446.
3. Noursadeghi M. HIV-1 infection of mononuclear phagocytic cells: the case for bacterial innate immune deficiency in AIDS / M. Noursadeghi, D.R. Katz, R.F. Miller // Lancet Infect Dis. – 2006. – №6. – P. 794–804.
4. Barton G.M. Toll-like receptor signaling pathways / G.M. Barton, R. Medzhitov // Science. – 2003. – №300. – P. 1524–1525.
5. Sanders C.M. Toll-like receptors, cytokines and HIV-1 / C.M. Sanders, J.M. Cruse, R.E. Lewis // Exp Mol Pathol. – 2008. – №84. – P. 31–36.
6. Takeda K. Toll-like receptors in innate immunity / K. Takeda, S. Akira // Int Immunol. – 2005. – №17. – P. 1–14.

7. Akira S. Pathogen recognition and innate immunity / S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi // Cell. – 2006. – №124. – P. 783–801.
8. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling / B. Beutler // Nature. – 2004. – №430. – P. 257–263.
9. Kawai T. TLR signaling / T. Kawai, S. Akira // Cell Death Differ. – 2006. – №13. – P. 816–825.
10. Netea M.G. The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis / M.G. Netea, C.A. Van Der Graaf, A.G. Vonk [et al.] // J Infect Dis – 2002. – №185. – P.1482–1489.
11. Ferwerda B. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans / B. Ferwerda, M.B. McCall, S. Alonso [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A 2007. – №104. – P. 16645–16650.
12. Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления / А.С. Симбирцев, А. Ю. Громова // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т.4, №1. – С.3–10.
13. Soriano-Sarabia N. Influence of the Toll-like receptor 9 1635A/G polymorphism on the CD4 count, HIV viral load, and clinical progression / N. Soriano-Sarabia, A. Vallejo, Rami rez-Lorca [et al.] // J Acquir Immune Defic Syndr – 2008. – №49. – P. 128–135.
14. Bochud P.Y. Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection / P.Y. Bochud, M. Hersberger, P. Taffe [et al.] // AIDS. – 2007. – №21. – P. 441–446.
15. Pine S. Polymorphisms in toll-like receptor 4 and toll-like receptor 9 influence viral load in a seroincident cohort of HIV-1-infected individuals / S. Pine, M. McElrath, P. Bochud [et al.] // AIDS. – 2009. – V.23, №18. – P.2387–2395.
16. Ferwerda B. The Toll-like receptor 4 Asp299Gly variant and tuberculosis susceptibility in HIV-infected patients in Tanzania / B. Ferwerda, G.S. Kibiki, M.G. Netea [et al.] // AIDS. – 2007. – №21. – P.1375–1377.
17. Pulido I. The TLR4 ASP299GLY polymorphism is a risk factor for active tuberculosis in Caucasian HIV-infected patients / I. Pulido, M. Leal, M. Genebat [et al.] // Curr. HIV Res. – 2010. – V.8, №3. – P.253–258.
18. Papadopoulos A. Association of toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with increased infection risk in patients with advanced HIV-1 infection / A. Papadopoulos, B. Ferwerda, A. Antoniadou [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2010. – V.51, №2. – P. 242–247.

### Реферат

#### ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА TLR-4 НА КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Кириченко Т.С., Коваль Т.И.

Ключевые слова: ВИЧ, опортуністические инфекции, toll- подобный рецептор 4, полиморфизм Asp299Gly.

Toll-like receptor (TLR) – это рецепторы врожденной иммунной системы, которые распознают патоген- ассоциированные молекулярные паттерны и играют важную роль во врожденном иммунном ответе организма. Известно, что функциональный полиморфизм генов TLR влияет на характер течения защитных реакций и предрасположенность к разным инфекциям. В статье исследовано распространение полиморфизма Asp299Gly гена TLR-4 у 79 ВИЧ- инфицированных пациентов и выяснено клиническое течение ВИЧ-инфекции в зависимости от вариантов генотипа TLR-4. У ВИЧ-инфицированных пациентов с TLR4 Asp299Gly полиморфизмом выявлено повышенный риск развития хронического гепатита С, хронической активной Епштейн-Барр вирусной инфекции, опоясывающего лишая, простого герпеса, туберкулеза, пневмонии.

### Summary

#### INFLUENCE OF TLR 4 POLYMORPHISM ON CLINICAL COURSE OF HIV-INFECTION

Kyrychenko T.S., Koval T.I.

Key words: HIV-infection, opportunistic infections, toll-like receptor 4, Asp299Gly polymorphism .

Toll-like receptors (TLRs) recognize pathogen-associated molecular patterns and play a crucial role in the host's innate immune response. Genetic variations in TLR genes may influence host-viral interactions and might impact upon the risk of occurrence of various infections. The presence of TLR4 Asp299Gly single nucleotide polymorphisms (SNPs) was determined in a cohort of 79 HIV-infected patients and evaluated in relation to the occurrence of opportunistic infections. This study suggests a greater risk in developing of chronic hepatitis C, active Epstein-Barr virus infection, herpes zoster and herpes simplex infections, active tuberculosis and pneumonia in patients with the Asp299Gly TLR4 polymorphism.