ВИЗНАЧЕННЯ РОЛІ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ ARG753GLN TLR-2, LEU412PHE TLR-3, ASP299GLY TLR-4 ПРИ ГРИПІ

Прийменко Н. О.
кандидат медичних наук,
асистент кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією
Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава, Україна

Найбільша кількість летальних випадків при грипі пов'язана не безпосередньо з цим захворюванням, а з ускладненнями, що розвиваються переважно у пацієнтів з груп ризику [1, с. 55]. Проте за даними ВООЗ, у 30 % пацієнтів, які раніше вважалися здоровими, також можливий тяжкий і ускладнений перебіг грипу, що обумовлює необхідність подальшого вивчення факторів, які впливають на перебіг та наслідки хвороби [2, с. 1].

В даний час активно вивчається роль вродженого імунітету в регуляції імунної відповіді при інфекційній патології, зокрема рецепторів Toll-like (TLR), які забезпечують молекулярну ідентифікацію патогенів. Особливий інтерес з точки зору вивчення патогенезу грипу та його ускладнень представляють TLR-2 і TLR-4, що розпізнають вірусні структурні білки і ліганди грампозитивних і грамнегативних бактерій, а також TLR-3, який взаємодіє з длРНК – продуктом реплікації та транскрипції РНК- і ДНК-геномних вірусів [3, с. 9; 4, с. 377].

Відомо, що поліморфізм генів TLR призводить до порушення розпізнавання патогенів і дисбалансу функціонування системи вродженого імунітету й обумовлює можливість тяжкого та ускладненого перебігу захворювань [5, с. 98; 6, с. 23219; 7, с. 254]. Проте роль однонуклеотидних поліморфізмів у генах TLR-2, TLR-3, TLR-4 при грипі дотепер залишається не визначеною.

Мета дослідження – дослідити поширеність та оцінити вплив поліморфізму генів Arg753Gln TLR-2, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4 на перебіг грипу та грип-асоційованої пневмонії.

Матеріали та методи. Для досягнення поставленої мети обстежено 112 хворих на грип, з них 63 з неускладненим перебігом захворювання і 49 з грип-асоційованою пневмонією, які перебували на лікуванні в Полтавській обласній

клінічній інфекційній лікарні в епідсезон 2009-2014 рр. Серед них жінок − 55 (49,1%), чоловіків − 57 (50,9%), вік від 17 до 61 року (середній - 34,4 ± 1,38). Більшість обстежених (76,8%) − люди молодого та середнього віку. Пацієнти з грип-асоційованою пневмонією не мали загальновизнаних факторів ризику розвитку ускладнень при грипі.

Групу популяційного контролю для вивчення поширеності поліморфізму Arg753Gln гена TLR-2 і Asp299Gly TLR-4 склали 90, для Leu412Phe TLR-3 80 практично здорових мешканців Полтавської області.

Грип діагностували на підставі характерних клініко-епідеміологічних даних і підтверджували результатами лабораторних досліджень (серологічного і молекулярно-біологічного). Вірус грипу A/H1N1 виділено − у 39,3%, A/H3N2 − 35,7%, A/H2N2 − 0,9%, B − 21,4%. Мікст-форми були представлені поєднанням антигенних варіантів вірусів грипу A (H1N1 + H3N2) (1,8%), вірусів A/H1N1 і B (0,9%), які реєструвалися лише у хворих з грип-асоційованою пневмонією.

Діагноз пневмонії верифікували згідно рекомендацій Європейського респіраторного товариства (ERS, 2011) і Наказу МОЗ України № 128 від 19.03.2007 р. «Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Пульмонологія».

Визначення поліморфізму генів Arg753Gln TLR-2, Asp299Gly TLR4 Leu412Phe TLR-3 проводилось методом ПЛР. Ампліфікацію специфічної ділянки ДНК здійснювали з використанням олігонуклеотидних праймерів із наступним рестрикційним аналізом.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили методом варіаційної статистики з використанням комп’ютерних програм Microsoft Office Excel 2010 і «STATISTICA 7.0». Для порівняння частот алелей та генотипів між групами, використовували точний тест Фішера. Відносний ризик розвитку захворювання та ускладнень оцінювали за допомогою показника відношення шансів OR із визначенням 95% довірливого інтервалу (CI). Статистична значимість

відмінностей для кількісних ознак оцінювалась із використанням t-критерію Стьюдента, для якісних – точного тесту Фішера.

Результати дослідження. Проведені дослідження показали, що поширеність мутантного алелю 299Gly TLR-4 у хворих із неускладненим перебігом грипу та грип-асоційованими пневмоніями в 3,8-4,3 разу (6,35% і 7,14% відповідно) перевищує показники популяційного контролю (1,66%, $p<0,05$). Мутантний алель 412Phe TLR-3 достовірно частіше зустрічався у хворих на грип-асоційовану пневмонію (42,86%), у порівнянні з неускладненим перебігом грипу (24,60%, $p<0,01$) та здоровими (30,0%, $p<0,05$). Комбінації мутантних генотипів TLR-2, TLR-3, TLR-4 реєструвалися лише у хворих на грип (11,1 %, $p<0,01$) та грип-асоційовану пневмонію (14,3 %, $p<0,003$) і не визначалися у здорових.

З'ясувалося, що ризик розвитку грипу в 4,2 разу вище в осіб з генотипом Asp/Gly TLR-4 (OR=4,22; 95% CI 1,07-16,59), у 15,0 разів – з комбінаціями мутантних генотипів TLR-2, TLR-3, TLR-4 (OR=15,0; 95% CI 1,83-286,93); грип-асоційованої пневмонії в 4,5 разу – у хворих на грип із мутантним генотипом Phe/Phe TLR-3 (OR=4,5; 95% CI 1,15-17,65), у порівнянні з носіями нормального розподілу алелей TLR.

За результатами клініко-лабораторного обстеження з'ясувалося, що перебіг грипу в осіб із мутантними генотипами TLR-3 та комбінаціями мутацій в генах TLR-2, TLR-3, TLR-4 мав особливості, в порівнянні з хворими із нормальним розподілом алелей TLR: вірогідно довше тривають основні клінічні симптоми (температура, головний біль, ломота в тілі, біль у горлі, загальна слабкість), переважає середньотяжкий (54,4% і 42,9% відповідно) та тяжкий (36,4%, $p<0,04$ і 57,1%, $p<0,02$ відповідно) перебіг з високою частотою розвитку грип-асоційованої пневмонії (54,2%, $p<0,03$ і 50,0% $p<0,05$ відповідно).

Встановлено, що в осіб без загальновизнаних факторів ризику ускладненого перебігу грипу первинна вірусна пневмонія розвивається винятково у носіїв поліморфнозмінених генотипів TLR-3 (Leu/Phe – 44,4 %,

OR=18,91, Phe/Phe – 100,0 %, OR=49,3) та їхніх комбінацій з Asp/Gly TLR-4 та Arg/Gln TLR-2 (42,8 %, OR=22,55) і характеризується: раннім розвитком (на 1-3 добу), переважанням двобічного (63,1 %), багаточасткового (47,4 %) ураження легень, тяжким перебігом (63,1 %) з тривалою кисневою залежністю, розвитком гострого респіраторного дистрес-синдрому (36,8 %) та поліорганної недостатності (42,1 %), високою летальністю (21,0 %). Тяжкий перебіг вторинної вірусно-бактеріальної пневмонії вірогідно частіше мав місце в осіб із генотипом Leu/Phe TLR-3 (55,6%) та комбінаціями поліморфнозмінених генотипів TLR-2, TLR-3, TLR-4 (50,0%), у порівнянні з пацієнтами із нормальним розподілом алелей генів (10,0%, $p<0,05$).

Летальність серед пацієнтів із тяжким перебігом грип-асоційованої пневмонії склала 23,8 % (5 пацієнтів). Найвищим показник реєструвався при первинній вірусній пневмонії – 21,0 % (при вторинній вірусно-бактеріальній та бактеріальній – 3,4 %, $p<0,05$). Серед померлих у 4 із 5 виявлено поліморфнозмінені генотипи TLR-3, які у 2-х поєднувалися з поліморфізмом генів Asp299Gly TLR-4 та Arg753Gln TLR-2.

Висновки. Показано, що серед хворих на грип і грип-асоційовану пневмонію достовірно частіше виявляється мутантний алель 299Gly TLR-4 та комбінації поліморфізмів Arg753Gln TLR-2, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4. Частота мутантного алелю 412Phe TLR-3 вище серед хворих на грип-асоційовану пневмонію.

Встановлено, що грип у пацієнтів із поліморфізмом генів Arg573Gln TLR-2, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4 при типовій клінічній картині відрізняється більшою тривалістю основних клінічних симптомів, переважанням середньотяжкого та тяжкого перебігу, високою частотою розвитку грип-асоційованої пневмонії.

Доведено, що в хворих на грип із поліморфізмом генів TLR-2, TLR-3, TLR-4 при відсутності загальновизнаних факторів ризику розвитку ускладнень первинна вірусна пневмонія розвивається винятково в носіїв поліморфнозмінених генотипів TLR-3 та їхніх комбінацій з Asp/Gly TLR-4 та

Arg/Gln TLR-2. Установлено, що вторинна вірусно-бактеріальна грип-асоційована пневмонія в осіб із генотипом Leu/Phe TLR-3 та комбінаціями поліморфнозмінених генотипів TLR-2, TLR-3, TLR-4 характеризується переважно тяжким перебігом.

Література:

1. Абросимов В. Н. Клинические особенности грипп-ассоциированной внебольничной пневмонии тяжелого течения / В. Н. Абросимов, Е. В. Алмазова // Российский медико-биологический вестник. – 2010. – № 3. – С. 55–60.
2. WHO: Influenza (H1N1) 2009 Key issues for case management. – 2011. – http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/132937/H1N1_Case-manag-summary-110120-RU-VVE-CORRECTED.pdf
3. Друцкая М. С. Врожденное распознавание вирусов / М. С. Друцкая, П. В. Белоусов, С. А. Недоспасов // Молекулярная биология. – 2011. – Т 45, № 1. – С. 7–19.
4. Kawai T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors / T. Kawai, S. Akira // Nat. Immunol. – 2010. – Vol. 11, № 5. – P. 373–384.
5. Полиморфизм Asp299Gly гена TLR4 и тяжелое течение атопической бронхиальной астмы у детей / Ю. А. Вовк, О. Я. Ткаченко, О. В. Измайлова [и др.] // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2013. – № 2. – С. 98–99.
6. Role for Toll-like Receptor 3 Variants in Host Susceptibility to Enteroviral Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy / C. Gorbea, K. A. Makar, M. Pauschinger [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2010. – Vol. 285. – P. 23208–23223.
7. Thomas E. Common human Toll-like receptor 4 polymorphisms: role in susceptibility to respiratory syncytial virus infection and functional immunological relevance / E. Thomas, S. E. Turvey // Clin. Immunol. – 2007. – Vol. 123. – P. 252–257.