

doi : 10.52485/19986173_2021_1_17

УДК: 575.174.015.3: 616-092.11

Емельянов А.С., Чупрова Г.А., Емельянова А.Н., Витковский Ю.А.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА-3 У БОЛЬНЫХ ГРИППОМ А(Н3N2) И ГРИППОМ В

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Читинская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения Российской Федерации, 672000, г. Чита, ул. Горького, 39а

Цель исследования: изучить генетический полиморфизм TLR3 (Leu412Phe) у больных гриппом А(Н3N2) и гриппом В.

Материалы и методы. В исследование методом сплошной выборки были включены больные гриппом А(Н3N2) (89 человек) и гриппом В (80 человек) в возрасте от 15 до 82 лет (средний возраст $49,0 \pm 14,0$ лет). Контрольную группу составили 96 практически здоровых доноров. Генотипирование для выявления полиморфизма проводилось методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией.

Результаты. Показано, что частота аллели -412Leu гена TLR3 у больных гриппом выше, чем у здоровых респондентов (частота встречаемости у больных гриппом А(Н3N2) – 0,433, гриппом В – 0,325, среди здоровых – 0,249; $p < 0,05$), с возрастанием относительного риска развития данной патологии равно: для гриппа А(Н3N2) у носителей генотипа Leu412Leu гена TLR3 – $OR = 2,39$ [CI95%: 1,04-3,61], для гриппа В – у лиц-носителей гетерозиготного варианта Leu412Phe гена TLR3 – $OR = 2,41$ [CI95%: 1,29-4,43].

Заключение. Аллель -412Leu гена Toll-подобного рецептора-3 предрасполагает к развитию гриппа А(Н3N2) и В.

Ключевые слова: грипп, SNP, Toll-подобные рецепторы, генетический полиморфизм, TLR3 (Leu412Phe).

Emelyanov A.S., Chuprova G.A., Emelyanova A.N., Vitkovsky Yu.A.

TOLL-LIKE RECEPTOR-3 GENETIC POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH INFLUENZA A(H3N2) AND INFLUENZA B

Chita State Medical Academy, 39a, Gorky's street, Chita, Russia, 672000

Aim was to study the genetic TLR3 (Leu412Phe) polymorphism in patients with influenza A(H3N2) and influenza B.

Methods. The study was performed in 89 patients with influenza A(H3N2) and 80 patients with influenza B aged 15 to 82 years (the average age was 49.0 ± 14.0 years) and 96 healthy residents. The TLR3 gene polymorphism was detected by PCR method.

Results. It was shown that the frequency of the allele -412Leu of the TLR3 gene was significantly higher than among healthy respondents (frequency in patients with influenza A(H3N2) - 0.433, influenza B - 0.325, among healthy people - 0.249; $p < 0.05$) an increase in the relative risk of the development of this pathology equal to: in patient with influenza A(H3N2) in carriers of the Leu412Leu gene TLR3 – $OR = 2,39$ [CI95%: 1,04-3,61], in patient with influenza B in carriers of the Leu412Phe gene TLR3 – $OR = 2,41$ [CI95%: 1,29-4,43].

Conclusion. The -412Leu allele of the Toll-like receptor-3 gene predisposes to the development of influenza A (H3N2) and B.

Key words. Influenza, SNP, Toll-like receptors, genetic polymorphism, TLR3 (Leu412Phe).

Среди всех циркулирующих у людей инфекций только ОРВИ и грипп вызывают массовые вспышки заболеваний, которые почти ежегодно принимают характер эпидемий. Генетическая изменчивость вируса гриппа обуславливает появление новых штаммов, по отношению к которым имеющийся популяционный иммунитет оказывается несостоятельным [1, 2].

Дыхательная система является мишенью для целого ряда бактериальных и вирусных патогенов. Первоначальной мишенью вируса гриппа, равно как и других респираторных вирусов, является эпителий респираторного тракта [1, 3]. В идентификации молекулярных

образов патогена (PRR) принимают участие Toll-подобные рецепторы (TLR) [1, 3-5]. Среди них TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 распознают двухцепочечную и одноцепочечную РНК, CpG-содержащую ДНК, обеспечивая, таким образом, распознавание всех видов вирусов и последующую индукцию экспрессии провоспалительных цитокинов и интерферонов [1, 3, 4].

Имеются сведения об участии TLR3 в распознавании двухцепочечных молекул вирусной РНК реовирусов, репликативных форм двухцепочечной РНК пикорнавирусов и вируса гриппа А [1, 3, 4].

Учитывая тот факт, что генетический фон и изменения иммунологического статуса играют существенную роль в прогрессировании воспаления, определение генетических маркеров, ассоциированных с развитием гриппа и его осложнений, является актуальной научно-практической задачей.

Целью исследования явилось изучение генетического полиморфизма *TLR3* (*Leu412Phe*) у больных гриппом А(Н3N2) и гриппом В.

Материалы и методы. В исследование методом сплошной выборки были включены больные гриппом А(Н3N2) (89 человек) и гриппом В (80 человек) в возрасте от 15 до 82 лет (средний возраст $49,0 \pm 14,0$ лет) эпидемических сезонов 2016-2017 гг. и 2017-2018 гг.

Диагноз установлен на основании клинико-anamnestических и лабораторных данных (мазок из носо- и ротоглотки методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)).

Доминирующими симптомами гриппа А(Н3N2) и В являлись лихорадка, интоксикация и катаральный синдром. При этом в оба эпидемических сезона начальные проявления и при гриппе А(Н3N2), и при гриппе В характеризовались преимущественно острым началом заболевания (повышение температуры тела, головные боли, умеренно выраженные катаральные проявления у большинства пациентов). Однако с большей частотой по сравнению с гриппом А(Н3N2) катаральные проявления как первый симптом заболевания обнаруживались при гриппе В. В оба сезона при том и другом гриппе отмечалось развитие трахеита или ларинготрахеита, при этом выраженные проявления трахеита с более упорным и продолжительным кашлем регистрировались при гриппе В. Установлено, что в эпидемические сезоны 2016-2017 гг. и 2017-2018 гг. и при гриппе А(Н3N2), и при гриппе В преобладали среднетяжелые формы заболевания. Осложнения гриппа в оба сезона проявлялись развитием отита, бронхита или пневмонии. При этом частота пневмоний и в сезон 2016-2017 гг., и в сезон 2017-2018 гг. была выше при гриппе А(Н3N2) по сравнению с гриппом В.

Контрольную группу составили 96 практически здоровых доноров, не имеющих острых и хронических инфекционных и аутоиммунных заболеваний, аллергических реакций. Группы сопоставимы по полу и возрасту. Все обследованные – представители европеоидной расы, родившиеся и проживающие на территории Забайкальского края. Критерии исключения – наличие тяжелой сопутствующей патологии, наличие любого иного инфекционного заболевания, наличие в анамнезе системного заболевания, отказ пациента от участия в исследовании.

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki) (1964, 2013 – поправки) и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными Приказом Минздрава РФ (от 19.06.2003 г., № 266).

Определение SNP генов осуществлялось методом ПЦР с использованием стандартных наборов НПФ «Литех» (Москва). Амплификацию фрагментов гена *TLR3* проводили в термоциклере (модель «Бис»-M111, ООО «Бис-Н», Новосибирск). Анализу подвергалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь», затем проводилась реакция амплификации. Детекцию продукта амплификации проводили в 3% агарозном геле.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 10. При сравнении частот аллелей и генотипов по качественному бинарному признаку пользовались критерием χ^2 . Степень риска развития событий оценивали

по величине отношения шансов (oddratio (OR)) с расчетом для него 95% доверительного интервала (CI95%).

Результаты и обсуждение. В ходе молекулярно-генетического исследования обнаружены все искомые мутации в гомо- и гетерозиготном состоянии с частотным подчинением эквилибриуму Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

Выявлено, что среди больных гриппом встречаемость полиморфных вариантов *TLR3* (*Leu412Phe*) существенно отличались от контрольной группы. Среди больных гриппом А(Н3N2) в 1,7 раза чаще регистрировалась аллель *-412Leu* (с частотой 0,433), среди больных гриппом В – в 1,3 раза чаще (с частотой 0,325), тогда как среди здоровых ее встречаемость оказалась 0,249 ($p < 0,05$) (табл.1). У пациентов с гриппом А(Н3N2) в 1,3 раза реже выявлялась аллель *-412Phe* с частотой 0,567 ($\chi^2 = 9,45$; $p = 0,009$), среди пациентов с гриппом В – 1,1 раза реже (с частотой 0,675; $\chi^2 = 10,87$; $p = 0,004$) по сравнению с группой здоровых лиц (0,751; $p < 0,05$) (табл. 1).

Таблица 1

Встречаемость SNP *TLR3* (*Leu412Phe*) у здоровых лиц
и больных гриппом А(Н3N2) и гриппом В

Генотипы (%) Аллели (P)	Группы			χ^2 (p) ¹	χ^2 (p) ²	χ^2 (p) ³
	Здоровые (n=96)	Больные гриппом A(H3N2) ¹ (n=89)	Больные гриппом B ² (n=80)			
TLR3 (Leu412Phe)						
Leu412Leu	9,4%	22,5%	7,5%	11,68 p=0,003	13,44 p=0,03	10,57 p=0,005
Leu412Phe	31,3%	41,6%	50,0%			
Phe412Phe	59,3%	35,9%	42,5%			
-412Leu	0,249	0,433	0,325	9,45	10,87	7,98
-412Phe	0,751	0,567	0,675	p=0,009	p=0,004	p=0,03

Примечание: p¹, p² – значимость различий по сравнению со здоровыми; p³ – значимость различий распределения частот генотипов и аллелей групп больных гриппом А(Н3N2) и гриппом В.

Распределение генотипов среди пациентов также значительно отличалось от здоровых лиц. Установлено, что среди больных гриппом А(Н3N2) и гриппом В преобладали гетерозиготные варианты *Leu412Phe* в 41,6% и 50,0% случаев соответственно. При этом в группе пациентов с гриппом А(Н3N2) в 3 раза чаще регистрировались гомозиготные варианты *Leu412Leu* ($\chi^2 = 10,57$; $p = 0,005$). Распределение генотипов среди здоровых резидентов оказалось следующим: *Leu412Leu* – 9,4%, *Leu412Phe* – 31,3%, *Phe412Phe* – 59,3% (табл. 1).

Исходя из полученных данных о распределении частот, шанс развития вирусного заболевания повышается у носителей аллели *-412Leu* гена *TLR3*: для гриппа А(Н3N2) в 2,61 раза [CI95%: 1,44-4,72], для гриппа В – в 1,98 раза [CI95%: 4,18-19,54]. Вероятность развития гриппа А(Н3N2) выше у обладателей гомозиготного варианта *Leu412Leu* гена *TLR3* (OR=2,39 [CI95%: 1,04-3,61]), а гриппа В – у лиц-носителей гетерозиготного варианта *Leu412Phe* гена *TLR3* (OR=2,41 [CI95%: 1,29-4,43]).

Наличие однонуклеотидной замены в гене Toll-like рецепторов обуславливает аминокислотную замену транслируемого белка, вовлеченного в иммунный ответ.

В дыхательных путях человека присутствует целый ряд факторов защиты от патогенов [1, 3]. При этом ключевая роль в их распознавании и элиминации отводится эпителию респираторного тракта, который после заражения или стимуляции лигандами Toll-подобных рецепторов (TLR) увеличивает продукцию противомикробных пептидов [1, 3]. Адаптерные молекулы MyD88, TIRAP, TRIF, TIRP принимают участие в TLR-ассоциированной передаче сигнала, обуславливая дифференцированную активацию внутриклеточных сигнальных каскадов [1, 3-5].

После фиксации вируса гриппа на цитоплазматической мембране происходит его инвагинация, завершающаяся процессом эндоцитоза вируса с последующим формированием

эндосомы [1]. В эндосоме происходит переваривание оболочки вириона, высвобождая ssRNA (односпиральную РНК) и активируя RdRp (РНК-зависимая РНК-полимераза), с помощью которой ssRNA строит позитивную цепь, превращаясь в dsRNA (двуспиральная РНК), которая высвобождается в цитоплазму и мигрирует в ядро [1]. Двуспиральная RNA активирует IRF и NF-κB, передающие сигналы в ядро клетки: IRF вызывает экспрессию генов и синтез IFN-α/β, NF-κB инициирует продукцию провоспалительных цитокинов [1, 6].

Так, например, по мнению ряда авторов, передача сигналов TLR3 через адаптерный белок TRIF обеспечивает наиболее эффективные внутренние противовирусные защитные реакции клетки-хозяина в ответ на внедрение вируса SARS-CoV, в то время как удаление любой ветви передачи сигналов TLR вызывает летальный исход [7].

При этом функциональный полиморфизм генов TLR снижает способность к распознаванию соответствующих лигандов, либо к проведению внутриклеточных сигналов, изменяя развитие защитных противовирусных реакций [6, 8].

В работах китайских авторов показано, что наследование рецессивных генетических вариантов SNP генов *IFITM3*, *TLR3* ассоциированы с более высоким риском смерти у пациентов с гриппом H7N9 / H1N1pdm09 [9].

Показано, что полиморфизм *TLR3 rs5743313* ассоциирован с пандемическим вирусом гриппа A/H1N1/2009, а его гетерозиготный вариант *CT* – с повышенным риском пневмонии [10].

По результатам исследований Приimenко Н.О. и соавт. установлена взаимосвязь полиморфных вариантов гена *TLR3* с увеличением риска развития вирусных заболеваний респираторного тракта [11].

Вышеприведенные примеры отражают роль отдельных SNP гена *TLR3* в развитии иммунологической защиты при вирусных инфекциях. Следовательно, можно предположить, что дефекты на уровне рецепторов, а также факторов, регулирующих их функцию, определяют разное сродство с антигеном вируса, что сказывается на результатах активации клеток [1, 3, 4].

Таким образом, полиморфизм гена *TLR3* определяет как чувствительность к вирусу, так и эффекторные функции иммунокомпетентных клеток в процессе реализации иммунного ответа и воспалительного процесса при гриппе.

Выводы.

1. Аллель *-412Leu* гена Toll-подобного рецептора-3 предрасполагает к развитию гриппа А (H3N2) и В.
2. Гомозиготный вариант *Leu412Leu* гена TLR3 увеличивает вероятность развития гриппа А (H3N2), гетерозиготный вариант *Leu412Phe* – вероятность развития гриппа В.

Список литературы:

1. Смирнов В.С., Петленко С.В. Грипп и острые респираторные вирусные инфекции (характеристика, патогенез, профилактика и лечение). Санкт-Петербург : Гиппократ, 2019. 248.
2. Чупрова Г.А., Емельянова А.Н., Емельянов А.С. и соавт. Клинико-лабораторная характеристика гриппа в Забайкальском крае на современном этапе. Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2018. 3. 104-110.
3. Никонова А.А., Хаитов М.Р., Хаитов Р.М. Перспективы использования агонистов и антагонистов Toll-подобных рецепторов для профилактики и лечения вирусных инфекций. Медицинская иммунология. 2019. 3(21). 397-406. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-397-406.
4. Заморина С.А., Раев М.Б. Toll-подобные рецепторы – подъем по тревоге. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. 2. 1-16. URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/SAZ-2016-2.pdf>. (дата обращения 2.12.2020).
5. Емельянов А.С., Емельянова А.Н., Витковский Ю.А. Генетический полиморфизм Toll-подобного рецептора-4 у больных рожей. Молекулярная медицина. 2017. 5(15). 54-57.

6. Коровкина Е.С., Кажарова С.В. Роль toll-подобных рецепторов в патогенезе воспалительных заболеваний бронхолегочной системы. Инфекция и иммунитет. 2016. 2(6). 109-116.
7. L Totura A., Whitmore A., Agnihothram S. et al. Toll-Like Receptor 3 Signaling via TRIF Contributes to a Protective Innate Immune Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. mBio. 2015. 6(3):e00638-15. DOI: 10.1128/mBio.00638-15.
8. Molteni, M. The role of toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation / M. Molteni, S. Gemma, C. Rossetti // Mediators of Inflammation. – 2016. – P. 6978936
9. Lee N., Cao B., Ke C. et al. IFITM3, TLR3, and CD55 Gene SNPs and Cumulative Genetic Risks for Severe Outcomes in Chinese Patients With H7N9/H1N1pdm09 Influenza. J Infect Dis. 2017. 216(1). 97-104. DOI: 10.1093/infdis/jix235.
10. Esposito S., Molteni C.G., Giliani S. et al. Toll-like receptor 3 gene polymorphisms and severity of pandemic A/H1N1/2009 influenza in otherwise healthy children. Virol J. 2012. 9. 270. DOI: 10.1186/1743-422X-9-270.
11. Pryimenko N.O., Kotelevska T.M., Dubynska H.M. et al. Single nucleotide polymorphisms of TLR-2, TLR-3, TLR-4 and susceptibility to inflammatory diseases of the respiratory tract. Запорожский медицинский журнал. 2018. 5(110). 640-645.

References:

1. Smirnov V.S., Petlenko S.V. Influenza and acute respiratory viral infections (characteristics, pathogenesis, prevention and treatment). St. Petersburg : Gippokrat, 2019. 248. in Russian.
2. Chuprova G.A., Emelyanova A.N., Emelyanov A.S. et al. Clinical and laboratory characteristics of influenza in the Trans-Baikal Territory at the present stage. Vestnik Smolenskoj gosudarstvennyj medicinskij. 2018. 3. 104-110. in Russian.
3. Nikonova A.A., Haitov M.R., Haitov R.M. Prospects for the use of agonists and antagonists of Toll-like receptors for the prevention and treatment of viral infections. Medicinskaya immunologiya. 2019. 3(21). 397-406. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-397-406. in Russian.
4. Zamorina S.A. Raev M.B. Toll-like receptors – alarm rise. Byulleten' Orenburg skogonauchnogo centra UrO RAN. 2016. 2. 1-16. URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/SAZ-2016-2.pdf>. (дата обращения 2.12.2020). in Russian.
5. Emelyanov A.S., Emelyanova A.N., Vitkovsky Yu.A. Toll-like receptor-4 genetic polymorphism in erysipelas patients. Molekulyarnayamedicina. 2017. 5(15). 54-57. in Russian.
6. Korovkina E.S., Kazharova S.V. The toll-like receptors role in inflammatory diseases of the bronchopulmonary system pathogenesis. Infektsiyaiimmunitet. 2016. 2(6). 109-116. in Russian.
7. L Totura A., Whitmore A., Agnihothram S. et al. Toll-Like Receptor 3 Signaling via TRIF Contributes to a Protective Innate Immune Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. mBio. 2015. 6(3):e00638-15. DOI: 10.1128/mBio.00638-15.
8. Molteni, M. The role of toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation / M. Molteni, S. Gemma, C. Rossetti // Mediators of Inflammation. – 2016. – P. 6978936
9. Lee N., Cao B., Ke C. et al. IFITM3, TLR3, and CD55 Gene SNPs and Cumulative Genetic Risks for Severe Outcomes in Chinese Patients With H7N9/H1N1pdm09 Influenza. J Infect Dis. 2017. 216(1). 97-104. DOI: 10.1093/infdis/jix235.
10. Esposito S., Molteni C.G., Giliani S. et al. Toll-like receptor 3 gene polymorphisms and severity of pandemic A/H1N1/2009 influenza in otherwise healthy children. Virol J. 2012. 9. 270. DOI: 10.1186/1743-422X-9-270.
11. Pryimenko N.O., Kotelevska T.M., Dubynska H.M. et al. Single nucleotide polymorphisms of TLR-2, TLR-3, TLR-4 and susceptibility to inflammatory diseases of the respiratory tract. Zaporozhskij medicinskij zhurnal. 2018. 5(110). 640-645.