

Л.П. Малежик, М.С. Малежик, Д.Ц. Нимаева,  
В.Б. Цырендоржиева

## ИЗМЕНЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ У ДЕТЕЙ, ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ВИРУСНЫМИ ИНФЕК- ЦИЯМИ, ПРИ ПОЛИМОРФИЗМЕ ГЕНОВ TOLL-4 (Asp299gly) И TOLL-6 (Ser249Pro) РЕЦЕПТОРОВ

УДК 612.017.1:616.921.5

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 IL-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$  и увеличивается содержание IL-1RA по сравнению с группой больных детей без аномальных нарушений в сигнальных рецепторах. При полиморфизме в генах Toll-6 рецептора уменьшается концентрация цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-8, ФНО- $\alpha$  и IL-10. Концентрация IL-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.

The article analyzes the role of polymorphism of Toll-4 (Asp299Gly) and Toll-6 (Ser249Pro) receptor genes in the development of low antiviral protection in children with frequent episodes of acute respiratory infections. It is shown that the synthesis of cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  decrease in the blood of patients with Toll-4 receptor gene polymorphism and IL-1RA content is increased in comparison with the group of diseased children without abnormal disturbances in signal receptors. Polymorphism in the Toll-6 receptor genes decreases the concentration of cytokines IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  and IL-10. The concentration of IL-1RA is increased in Pro / Pro and Gly / Gly genotypes compared to the group of patients without polymorphic changes in the corresponding receptors. Genetic disorders in the synthesis of cytokines in the polymorphism of the Toll-4 (Asp299Gly) and Toll-6 (Ser249Pro) receptors are one of the reasons for the failure of antiviral protection in children who often have ARI.

**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 ОРВИ среди детей отмечается в возрасте от 6 мес. до 6 лет и составляет более 6 эпизодов в году [3,8]. Согласно современным представлениям основной причиной высокой восприимчивости детей к вирусной инфекции являются 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 вхо-

дят 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 [10], развитием атеросклероза и ишемической болезни сердца [12], сахарным диабетом [7]. SNP Ser249Pro в гене Toll-6 рецептора отмечен у больных бронхиальной астмой [11]. 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 – 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% случаев был грипп, 26 – парагрипп, 5 – аденовирусная инфекция, в 4% – синцитиальный вирус. Критериями включения в исследование 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 бронхолегочными заболеваниями (бронхиальная астма, рецидивирующий бронхит, пороки развития дыхательной системы, аллергические заболевания).

Работа проводилась на базе НИИ медицинской экологии. Исследуемым материалом являлась венозная кровь. Выделение ДНК осуществлялось при помощи наборов «ДНК-экспресс кровь» (НПФ «Литех», Москва). Синтез использованных в работе олигонуклеотидных праймеров выполнен НПФ

Читинская ГМА: МАЛЕЖИК Лидия Павловна – д.м.н., проф., lida.malezhhik@mail.ru, МАЛЕЖИК Маргарита Сергеевна – к.м.н., ассистент кафедры, rita.malezhhik@mail.ru, НИМАЕВА Дулма Цыбеневна – к.м.н., доцент, ЦЫРЕНДОРЖИЕВА Валентина Батомункуевна – к.м.н., доцент.

Таблица 1

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

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

Примечание. В табл. 1 и 2 U – критерий Манна–Уитни; \* – значимость различий по сравнению с контролем. # – значимость различий по сравнению с группой носителей гомозиготного Asp/Asp генотипа.

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<br>(n=76)<br>(1) | Ser/Ser<br>(n=25)<br>(5) | Ser/Pro<br>(n=50)<br>(6) | Pro/Pro<br>IL-1 $\beta$ (n=25)<br>(7) |
|--------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| IL-1 $\beta$ | 5,4<br>[3,6-6,5]               | 21,9*<br>[20,6-23,3]     | 18,2*#<br>[13,4-25,2]    | 15,4*#<br>[10,3-21,9]                 |
| IL-8         | 7,9<br>[6,9-9,1]               | 22,6*<br>[19,5-27,2]     | 17,7*#<br>[12,9-19,8]    | 16,8*#<br>[14,4-19,9]                 |
| ФНО $\alpha$ | 2,3<br>[1,5-2,5]               | 14,3*<br>[11,9-16,5]     | 12,3*#<br>[8,8-14,5]     | 11,7*#<br>[10-14,7]                   |
| IL-4         | 1,9<br>[1,2-2,5]               | 1,2<br>[0,8-1,6]         | 1,6<br>[1,4-1,9]         | 1,3<br>[0,9-1,7]                      |
| IL-10        | 1,2<br>[0,7-1,8]               | 3,7*<br>[2,4-4,7]        | 3,2*#<br>[2,1-4,1]       | 2,2*#<br>[1,1-4]                      |
| IL-1RA       | 342,9<br>[263,8-465,4]         | 1391*<br>[1207-1536]     | 1249,2*#<br>[1053-1577]  | 1404,3*#<br>[1193-1817]               |

«Литех», Москва. Выявление мутаций проводилось методом ПЦР. Концентрацию цитокинов определяли методом твердофазного 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. В качестве популяционного контроля использовали выборку из 76 условно здоровых детей (30 мальчиков и 46 девочек) в возрасте от 1 года до 10 лет. Все обследуемые были поделены на 7 групп: 1-я – здоровые дети, контроль (n=76); 2-я – больные ОРВИ дети, имеющие генотип Asp/Asp (n=40); 3-я – больные дети, имеющие генотип Asp/Gly (n=18); 4-я – больные дети, имеющие генотип Gly/Gly (n=32); 5-я – больные дети с генотипом Ser/Ser (n=25); 6-я – дети, имеющие генотип Ser/Pro (n=50); 7-я – 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. При нормальном распределении использовался критерий Стьюдента (t-тест). Показатели представлены в виде средних величин со стандартным отклонением ( $M \pm SD$ ). При ненормальном распределении признака применялся критерий Манна-Уитни (U-тест).

**Результаты и обсуждение.** Наши исследования показали, что при полиморфизме генов (Asp299Gly) Toll-4 рецепторов синтез IL-1 $\beta$  снижен по сравнению с группой больных с генотипом Asp/Asp, у которых нет полиморфных изменений (табл.1).

Синтез второго противовоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$  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 – носителей всех изучаемых генотипов.

Уровень IL-1RA значительно повышен в крови больных детей-носителей генотипа Gly/Gly (1984,3 пкг/мл).

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

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-1 $\beta$  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 (табл.2).

Концентрация ФНО $\alpha$  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. Обнаружено, что у детей с генотипом Pro/Pro концентрация хемокина IL-8 оказалась самой низкой (16,8 пкг/мл) по сравнению с носителями генотипов Ser/Ser и Ser/Pro – 22,6 и 17,7 пкг/мл соответственно.

IL-4 не имел отчетливых различий

в зависимости от полиморфных вариантов.

Содержание IL-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.  
Borisova V.N. The state of the immunity system in frequently ill children / V.N. Borisova, V.A. Bulgakova // Immunomodulators and vaccination. – M.: 4 Mpress, 2013. – 272 p.
2. Железникова Г.Ф. Цитокины как предикторы течения и исходы инфекций / Г.Ф. Железникова // Цитокины и воспаление. – 2009. – № 8 (1). – С. 10-17.  
Zheleznikova G.F. Cytokines as predictors of the course and outcomes of infections / G.F. Zheleznikova // Cytokines and inflammation. – 2009. – № 8 (1). – P. 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.  
Kazyukova T.V. Children with frequent common cold: modern opportunities to reduce respiratory disease / T.V. Kazyukova, G.S. Koval', G.A. Samsygina // Pediatrics. – 2012. – №91 (5). – P.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 // IV Межд. конф. «Медицинские и психо-педагогические аспекты». – Славянск, 2012. – С.135-139.  
Karpova N.I. Genetic bases of low anti-infectious protection in frequently ill children in Zabaykal'e / N.I. Karpova, L.P. Malezhik, M.S. Malezhik // IV Internat. Conf. «Medical and psycho-pedagogical aspects». – Slavyansk, 2012. – P.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.

Samsygina G.A. Problems of diagnostics and treatment of frequently ill children at the present stage / G.A. Samsygina, G.S. Koval' // Pediatrics. – 2009. – № 2. – P. 137-145.

6. Симбирцев А.С. Toll-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета / А.С. Симбирцев // Иммунология. – 2005. – № 6. – С. 368-377.

Simbirtsev A.S. Toll-proteins: specific receptors of nonspecific immunity / A.S. Simbirtsev // Immunology. – 2005. – № 6. – P. 368-377.

7. Сульская Ю.В. Генетический полиморфизм toll-к-рецепторов 4 типа у больных сахарным диабетом 2 типа / Ю.В. Сульская // Таврический медико-биологический вестник. – 2009. – №3(47). – С.72-74.

Sul'skaya YU.V. Genetic polymorphism of Toll-like type 4 receptors in patients with type 2 diabetes mellitus / Yu.V. Sul'skaya // Tavrichesky medico-biological bulletin. – 2009. – №3 (47). – P.72-74.

8. Учайкин В.Ф. Эволюция патогенеза инфекционных болезней / В.Ф. Учайкин // Детские инфекции. – 2012. №11(4). – С.4-8.

Uchaykin V.F. Evolution of the pathogenesis of infectious diseases / V.F. Uchaykin // Children's infections. – 2012. – №11 (4). – P.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.

Yartsev M.N. Immune deficiency, frequently ill children and immunocorrection / M.N. Yartsev, K.P. Yakovleva // Questions of modern pediatrics. – 2005. – V.4. – P.72-74.

10. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock / E. Lorens, J. Mira [et al.] // Arch. Intern. Med. – 2002. – Vol.162. – P.1028-1032.

11. Tantisira K. Toll-like receptor 6 gene (TLR6): single nucleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of asthma / K. Tantisira, W. Klimecki, R. Lazarus // Genes Immun. – 2004. – Vol.5. – P. 343-346.

12. Kiechl S. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis / S. Kiechl, E. Lorens, V. Reindl [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2002. – Vol.347. – P.185-192.