

## РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ТЕЧЕНИИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ

Гординская Н.А.<sup>1</sup>, Митрофанов В.Н.<sup>1</sup>, Живцов О.П.<sup>1</sup>, Ермолина Е.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: uniclinic@pimunn.ru

В работе проанализировано наличие ассоциаций между полиморфными вариантами генов Toll-подобных рецепторов и частотой рецидивов инфекции у пациентов с хроническим остеомиелитом. Всего обследовано 115 человек, из них 94 пациента и 21 донор. У обследованных проводили определение частоты вариантов полиморфных маркеров Arg753Gln гена TLR2, Phe412Leu гена TLR3 и содержания интерлейкина-6 (ИЛ-6) и частоту рецидивов заболевания. Степень риска развития рецидива инфекционного процесса оценивали по величине отношения шансов (ОШ), рассчитывая 95% доверительный интервал, ОШ>1 трактовали как положительную ассоциацию. Результаты молекулярно-генетических исследований показали, что в обеих группах обнаружены все аллели TLR2 (Arg753Gln) и TLR3 (Phe412Leu) в гомо- или гетерозиготном состоянии, при этом аллель Arg TLR2 и аллель Phe TLR3 встречались достоверно чаще. У пациентов с генотипом Phe/Leu была самая высокая степень риска развития рецидива заболевания, ОШ=2,42 [ДИ 95%: 1,05-5,83], содержание ИЛ-6 у больных данной группы также оставалось высоким (12,32±3,91) до конца лечения. Безрецидивный период у пациентов с гетерозиготным генотипом Phe/Leu был самым коротким. Других статистически значимых результатов определения мажорных и минорных аллелей полиморфизмов генов TLR2 и TLR3 не было выявлено. Полученные результаты свидетельствуют о том, что индивидуальное носительство различных полиморфных вариантов генов Toll-подобных рецепторов может оказывать влияние на характер течения патологического процесса при хроническом остеомиелите и позволяет прогнозировать тяжесть течения заболевания.

Ключевые слова: хронический остеомиелит, врожденный иммунитет, Toll-подобные рецепторы, полиморфизм генов.

## THE ROLE OF POLYMORPHIC GTNTS OF TOLL-LIKE RECEPTORS DURING THE INFECTIONS PROCESS IN CHRONIC OSTEOMYELITIS

Gordinskaya N.A.<sup>1</sup>, Mitrofanov V.N.<sup>1</sup>, Zhivtsov O.P.<sup>1</sup>, Ermolina E.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University», Nizhny Novgorod, e-mail: uniclinic@pimunn.ru

The paper analyzes the presence of associations between polymorphic variants of Toll-like receptor genes and the frequency of infection recurrence in patients with chronic osteomyelitis. A total of 115 people were examined, of which 94 patients and 21 donors. The examined were used to determine the frequency of variants of the polymorphic markers Arg753Gln of the TLR2 gene, Phe412Leu of the TLR3 gene and the content of interleukin-6 (IL-6) and the frequency of relapse of the disease. The degree of risk of developing a relapse of the infectious process was evaluated by the value of the odds ratio (OR), calculating a 95% confidence interval, OR> 1 was interpreted as a positive association. The results of molecular genetic studies showed that in both groups all alleles of TLR2 (Arg753Gln) and TLR3 (Phe412Leu) were found in the homo- or heterozygous state, while the Arg TLR2 allele and the Phe TLR3 allele were found more frequently. Patients with the Phe / Leu genotype had the highest risk of developing recurrence of the disease, OS = 2.42 [CI 95%: 1.05-5.83], the content of IL-6 in patients of this group also remained high (12.32 ± 3.91) until the end of treatment. The relapse-free period in patients with the heterozygous Phe / Leu genotype was the shortest. No other statistically significant results of determination of major and minor alleles of polymorphisms of TLR2 and TLR3 genes were revealed. The results obtained indicate that the individual carriage of various polymorphic variants of Toll-like receptor genes can affect the nature of the pathological process in chronic osteomyelitis and allows us to predict the severity of the disease.

Keywords: chronic osteomyelitis, innate immunity, Toll-like receptors, gene polymorphism.

Молекулярно-генетические исследования, широко проводимые в настоящее время, позволяют выявить дополнительные механизмы в патогенезе различных заболеваний. В

значительной степени это касается работы иммунной системы, одним из основных свойств которой является распознавание и удаление из организма чужеродных и родственных измененных макромолекул путем развития того или иного варианта иммунного ответа. В последние десятилетия параллельно с адаптивным иммунитетом активно изучается система врожденного иммунного ответа [1; 2]. Развитие инфекции является главным фактором, изменяющим экспрессию Toll-подобных рецепторов. В научных исследованиях показано, что в группе больных с хронической инфекцией костной ткани и коротким безрецидивным периодом наблюдается снижение экспрессии TLR2 на моноцитах периферической крови, а также их функциональной активности по сравнению с нормальным функционированием TLR2 у больных с редким обострением остеомиелита [3]. Воспалительный процесс при остеомиелите сопровождается увеличением в крови популяции дендритных клеток с фенотипом незрелых клеток, что отражается на экспрессии Toll-рецепторов [4]. Известно, что Toll-рецепторы запускают иммунный ответ целым рядом сигнальных путей - активацией ядерного фактора, митоген-активируемых протеинкиназ, индуцируя транскрипцию генов провоспалительных цитокинов и интерферонов [5]. Toll-подобные распознающие структуры специфически связывают различные молекулы патогенов. При распознавании Toll-рецептором лиганда включается, как правило, целый комплекс молекул. Так, TLR2 участвует в распознавании пептидогликанов грамположительных бактерий и микоплазм, образуя димеры с TLR6, TLR4 распознает липополисахарид грамотрицательных бактерий вместе с белком MD2 и CD14. В функционировании Toll-рецепторов известно определенное «дублирование», так, двуспиральную РНК связывают TLR3 и TLR8, зимозан дрожжевых клеток «узнают» TLR6 и TLR2 [6-8].

Полиморфизм в генах Toll-рецепторов врожденного иммунитета влияет на эффективность их взаимодействия с лигандом и силу иммунного ответа [9]. Единичные нуклеотидные замены (single nucleotide polymorphism – SNP) могут приводить к нарушению проведения сигнала от активированного рецептора внутрь клетки [10]. В случае с Toll-рецепторами единичные нуклеотидные полиморфизмы могут приводить к инактивации самих TLRs или гиперактивации рецепторов, что в свою очередь приводит к неуправляемому синтезу провоспалительных цитокинов. Генетические факторы в значительной мере влияют на восприимчивость организма человека к различным заболеваниям, в том числе инфекционной природы, определяя различный характер воспалительного ответа и специфических иммунных реакций.

Так, повышенную чувствительность к возбудителю туберкулеза связывают с мутацией в генах TLR4 и TLR6 [11]. Изучение полиморфизма генов регуляторных рецепторов приобретает особую актуальность, так как определение их наличия позволяет не

только прогнозировать тяжесть течения заболевания, но и подбирать персонализированную терапию, включая иммунопрепараты.

Цель исследования: установить наличие ассоциаций между полиморфными вариантами генов Toll-подобных рецепторов и частотой рецидивов инфекции у пациентов с хроническим остеомиелитом.

**Материал и методы исследования.** В исследование включены 94 пациента с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей, проходивших лечение в отделении гнойной остеологии Университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, которые составили основную группу исследования. Критерием включения являлось наличие подтвержденного диагноза. Диагноз хронического остеомиелита костей нижних конечностей устанавливали на основании характерной клинико-рентгенологической картины. Все участники исследования принадлежали к русской этнической группе и проживали в Приволжском федеральном округе России. Обследованные основной и контрольной групп подписывали информированное согласие. Протокол научного исследования утвержден этическим комитетом Университетской клиники медицинского университета. Группу контроля составили 21 донор крови, признанные практически здоровыми лицами.

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из периферической крови пациентов и доноров. Идентификацию полиморфных аллелей генов осуществляли методом аллельспецифической полимеразной цепной реакции с последующей электрофоретической детекцией в агарозном геле. Полиморфный участок ДНК амплифицировали в термоциклере MaxyGene (Axygene, США). Генотипирование промоторных участков проводили со следующими полиморфными маркерами: Arg 753 Gly – для Toll-2 рецептора, Phe 412 Leu – для Toll-3 рецептора, используя коммерческие наборы реагентов производства НПО «Литех» (Россия). Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия для визуализации результатов с последующей ультрафиолетовой детекцией. Содержание интерлейкина-6 (ИЛ-6) в сыворотке крови обследованных пациентов и доноров определяли с помощью коммерческих наборов производства ООО «Вектор-Бест-Волга» на иммуноферментном анализаторе «Мультискан». Диапазон концентрации ИЛ-6 в наборе реагентов составлял 0-300 пкг/мл. Биоптаты и соскобы раневого отделяемого засеивали на колумбийский агар с 5% бараньей крови (Sredoff, СПб). Видовая идентификация микроорганизмов - возбудителей инфекции проводилась на масс-спектрометре Autoflex (Bruker Daltonics, Германия). Статистический анализ результатов молекулярно-генетических исследований включал оценку частоты распределения аллелей генов, генотипов и их комбинаций, анализ таблиц сопряженности. Частоту аллелей генов и генотипов вычисляли

методом прямого подсчета. Для определения вероятности развития рецидива инфекционного процесса рассчитывали показатели отношения шансов (ОШ; Odds ratio) и 95% доверительные интервалы (95% ДИ). Степень риска развития событий оценивали по величине отношения шансов. Отношение шансов, равное 1 (ОШ=1), трактовали как отсутствие ассоциаций, ОШ > 1 – как положительную ассоциацию, ОШ < 1 – как отрицательную ассоциацию генотипа с развитием обострения инфекционного процесса. Математическую обработку всех полученных результатов проводили методом непараметрической статистики на персональном компьютере при помощи программы Statistica 10 и онлайн-калькулятора (<http://gen-exp.ru/calculatoror.php>). Достоверность различий оценивали по критерию Манна-Уитни, принимая статистическую значимость при  $p < 0,05$ .

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Бактериологические исследования по этиологии инфекционного процесса у пациентов основной группы, в обязательном порядке проводимые в клинике для назначения антимикробной терапии, показали, что у большинства пациентов (85,1%) остеомиелитический процесс был вызван стафилококком. В сумме грамположительные микроорганизмы являлись возбудителями инфекции при остеомиелите у 87,3% больных, грамотрицательные – у 12,7%, причем у 9,3% из 12,7% больных грамотрицательные микроорганизмы обнаруживались совместно со стафилококком. Было интересно определить, обусловлена ли частота обострения костной инфекции, вызванной грамположительной микрофлорой, наличием минорных вариантов гена TLR2. В результате молекулярно генетического исследования у обследованных пациентов с остеомиелитом и лиц группы контроля обнаружены все искомые аллели генов TLR2 и TLR3 рецепторов в гомо- и гетерозиготном состоянии. При анализе полиморфного маркера Arg753Gln гена TLR2 обнаружено, что частота генотипа Arg/Arg практически не отличалась у пациентов с хроническим остеомиелитом и доноров. Частотного преобладания какого-либо аллеля в группах сравнения также не выявлено. Встречаемость гомозиготного генотипа Gln/Gln полиморфного варианта Arg753Gln гена TLR2 в контрольной группе была в 2 раза выше по сравнению с его частотой у больных с остеомиелитом, но достоверной связи с обострением инфекционного процесса не было выявлено (отношение шансов равно 0,37) (табл. 1).

При анализе частотного преобладания гетерозиготного генотипа Arg/Gln TLR2 у пациентов с остеомиелитом, в сравнении с показателем в контрольной группе людей, и расчете отношения шансов - связи носительства генотипа с развитием рецидива заболевания не выявлено.

Таблица 1

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного  
маркера Arg753Gln гена TLR2

Аллель/генотип	Основная группа	Контрольная группа	ОШ	95% ДИ	P
Arg	148 (78,7%)	32 (76,1%)	0,85	0,38-3,17	0,67
Gln	40 (21,3%)	10 (23,9)	0,79	0,37-2,56	0,32
Всего	188	42			
Arg/Arg	61 (64,8%)	14 (66,6%)	1,26	0,59-3,9	0,31
Arg/Gln	26 (27,6%)	4 (19,0%)	1,02	0,33-3,2	0,47
Gln/Gln	7 (7,2%)	3 (14,2%)	0,37	0,32-2,1	0,68
Всего	94	21			

Расчетные данные отношения шансов (ОШ=1,26) свидетельствуют в пользу того, что носительство гомозиготного генотипа Arg/Arg полиморфных локусов -753 гена TLR2 (Arg753Gln) ассоциировано с частотой развития обострения хронической инфекции у пациентов с остеомиелитом, но для достоверности, по-видимому, необходимо большее число исследований, особенно в группе контроля.

При анализе полиморфных вариантов гена TLR3 как у больных, так и у здоровых лиц обнаружено частотное преобладание аллеля Phe и генотипа Phe/Phe, соответственно носителей минорного аллеля Leu в обеих группах обследованных было меньше. Общее распределение частоты встречаемости полиморфизма гена TLR3 (Phe412Leu) в группе больных с хроническим остеомиелитом и группе контроля отражено в таблице 2.

Таблица 2

Распределение вариантов полиморфного маркера  
Phe412Leu гена TLR3

Аллель/генотип	Основная группа	Контрольная группа	ОШ	95% ДИ	P
Phe	126 (65,6%)	28 (66,6%)	1,12	0,58-2,21	0,09
Leu	66 (34,4%)	14 (33,4%)	0,87	0,43-1,72	0,62
Всего	188	42			
Phe/Phe	47 (50,0 %)	13 (61,9%)	0,89	0,30-1,7	0,73
Phe/Leu	38 (40,4%)	4 (19,0%)	2,42*	1,05-5,83	0,04
Leu/Leu	11 (11,4%)	4 (19,0%)	0,59	0,12-1,02	0,27

Всего	94	21			
-------	----	----	--	--	--

Примечание:\* - достоверные межгрупповые различия ( $p < 0,05$ ).

Как показали результаты работы, аллель Phe полиморфизма rs 412 гена TLR3 и гетерозиготный генотип (Phe/Leu) у данной группы пациентов с хроническим остеомиелитом статистически значимо ассоциированы с повышенным риском развития рецидива заболевания. Параллельно молекулярно-генетическим исследованиям у пациентов основной группы в соответствии с генотипом рецептора TLR3 проанализировали содержание интерлейкина-6 (ИЛ-6) в периферической крови в период обострения заболевания и в начале ремиссии после курса лечения. Концентрация ИЛ-6 в сыворотке обследованных лиц представлена в таблице 3.

Таблица 3

Содержание интерлейкина-6 в периферической крови  
пациентов с остеомиелитом (пкг/мл)

Наименование группы	Период обострения болезни	Период ремиссии	P
Пациенты с генотипом Phe/Phe гена рецептора TLR3 (Phe412Leu)	21,14±3,06	5,90±2,71*	0,0073
Пациенты с генотипом Phe/Leu гена рецептора TLR3 (Phe412Leu)	28,65±4,19	12,32±3,91	0,067
Пациенты с генотипом Leu /Leu гена рецептора TLR3 (Phe412Leu)	19,4±5,20	6,73±2,44*	0,033
Доноры	4,16±2,72		

Примечание:\* - достоверные различия между показателем в разные периоды болезни ( $p < 0,05$ ).

В период обострения хронического инфекционного процесса у всех обследованных пациентов уровень ИЛ-6 в периферической крови был выше, чем у доноров. К периоду ремиссии только у пациентов с гетерозиготным генотипом (Phe/Leu) гена TLR3 содержание интерлейкина-6 оставалось выше контрольных значений, у остальных пациентов – на уровне контроля.

Гетерозиготный генотип Phe/Leu гена TLR3 (Phe412Leu) в полиморфном локусе -412 обнаруживался у больных в 2,1 раза чаще, чем среди здоровых лиц. При этом как в основной, так и в контрольной группе обследованных чаще встречались обладатели

гомозиготного варианта (Phe/Phe) полиморфизма гена TLR3. Таким образом, можно сделать вывод, что само носительство мутантного аллеля не является предиктором затяжного течения при хронической инфекции у пациентов с остеомиелитом. Других статистически значимых результатов определения минорных аллелей полиморфизмов гена рецептора TLR3 выявлено не было.

### **Заключение**

Трудности лечения хронической инфекции костной ткани диктуют поиск новых путей решения проблемы, включая изучение патогенетических процессов адаптивного и врожденного иммунитета. Toll-рецепторы врожденной иммунной системы и иммунорегуляции, расположенные на мембране клеток и обладающие уникальной способностью узнавать и взаимодействовать с патогенами, включают передачу сигнала внутрь клетки, активируя при этом продукцию специфических белков и ферментов. Уровень экспрессии Toll-рецепторов, их функциональная активность и единичные нуклеотидные полиморфизмы определяют адекватное развитие воспалительной реакции и индукции активации Т-лимфоцитов.

В проведенном исследовании у пациентов с хроническим остеомиелитом обнаружены все аллели TLR2 (Arg753Gln) и TLR3 (Phe412Leu) в гомо- и гетерозиготном состоянии. Большинство пациентов являются носителями гомозиготного варианта Arg/Arg TLR2 и Phe/Phe TLR3. Достоверных данных о влиянии вариантов полиморфных маркеров Arg753Gln гена TLR2 на течение заболевания не было выявлено, несмотря на стафилококковую этиологию инфекции у 94,4% пациентов с остеомиелитом. Вероятно, дополнительное обследование большего числа пациентов с генотипом Arg/Arg Toll-рецептора 2 типа может выявить взаимосвязь с риском развития обострения инфекции.

Результаты исследования показали, что взаимосвязи течения инфекционного процесса и носительства гомозиготного генотипа Phe/Phe или Leu/Leu полиморфного маркера TLR3 не было выявлено, однако аллель Phe полиморфизма rs 412 гена TLR3 и гетерозиготный генотип (Phe/Leu) ассоциированы с повышенным риском развития рецидива заболевания. У пациентов с гетерозиготным генотипом Phe/Leu по сравнению с гомозиготными вариантами определялось высокое содержание ИЛ-6 после курса лечения по купированию инфекции. Таким образом, генетический полиморфизм компонентов TLR-зависимых сигнальных путей ассоциирован с изменением иммунного ответа и осложнением патогенетического течения хронического инфекционного процесса при остеомиелите.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что индивидуальное носительство различных полиморфных вариантов генов Toll-подобных рецепторов может оказывать влияние на характер течения патологического процесса при хроническом остеомиелите,

позволяет прогнозировать тяжесть течения заболевания и выбрать правильную тактику лечения.

### Список литературы

1. Байракова А.П. Роль и биологическое значение ТОЛЛ-подобных рецепторов в антиинфекционной резистентности организма // Вестник Российской АМН. 2008. №1. С.45-54.
2. Lalle J.L., Peres O., Ledair O., Goulon R., Scemama P., Jourdel F., Menager C., Duparc B., Lacassin F. Acute osteomyelitis in children: the pathogenesis revisited? *Orthop. Traumatol.Surg.Res.* 2010. V. 96. P.268-275.
3. Гординская Н.А., Лебедев М.Ю., Алейник Д.Я., Рубцова Ю.П., Митрофанов В.Н., Живцов О.П. Роль TOLL-подобных рецепторов в патогенезе хронического остеомиелита // *Иммунология.* 2018. №1. С.12-15.
4. Талаев В.Ю., Талаева М.В., Лебедев М.Ю., Воронина Е.В., Живцов О.П., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н. Фенотипическая характеристика классических дендритных клеток крови и их субпопуляций в норме и при остеомиелите // *Иммунология.* 2017. Т.38, №4. С.229-234.
5. Лебедева Е.С., Багаев А.В., Гараева А.Я., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. Кооперативное взаимодействие сигнальных путей рецепторов TLR4, TLR9 и NOD2 в макрофагах мыши // *Иммунология.* 2018. Т.39, №1. С.4-11.
6. Меджитов Р., Джановой К. Врожденный иммунитет // *Казанский медицинский журнал.* 2004. Т.85, №3. С.161-167.
7. Wu Y., Tang Y., Liang X., Lin Y., Yang W. The role of increased frequency of treg cells in patients with chronic osteomyelitis. *Orthopedics.* 2011. V. 34(2). P.98. DOI: 10.3928/01477447-20101221-16.
8. Phillip A., Koblansky A., Sankar A. Toll-Like Receptors Recognition and Signaling by Toll-Like Receptors. *Rev. Cell. Dev. Biol.* 2006. P.22-37.
9. Цыган В.Н., Иванов А.М. Генетический полиморфизм иммуногенной сигнальной системы // *Инфектология.* 2011. №2. С.21-27.
10. Montes A.N., Asensi V., Alvarez V. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2006. V.143, №3. P.404-413.
11. Богодухова Е.С., Байке Е.Е. Полиморфизм генов TOLL-подобных рецепторов как возможный фактор предрасположенности к развитию туберкулеза // *Туберкулез и болезни легких.* 2018. Т.96, №9. С.11-16.