

УДК 575.174.015.03: 612.014.3: 616.831-005.1:612.017.12

## НОСИТЕЛЬСТВО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ТОЛЛ-РЕЦЕПТОРОВ И КОНЦЕНТРАЦИЯ ИЛ-1В, ИЛ-6 В ПЛАЗМЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ МОЗГОВЫМ ИНСУЛЬТОМ

**Крохалева Ю.А., Страмбовская Н.Н.**

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России,  
Чита, e-mail: yulia.shalashowa@yandex.ru, chitgma.ru

Исследованы концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-6) в плазме крови и генетический полиморфизм некоторых толл-рецепторов (*TLR4(Asp299Gly)* и *TLR6(Ser249Pro)*) у больных мозговым инсультом. В сравнении с контрольной группой у больных мозговым инсультом в Забайкальском крае отмечено частотное преобладание генотипов *TLR4-299Asp/Asp*, *TLR6-249Pro/Pro* и аллелей *TLR4-299Asp* *TLR6-249Pro*. *Gly*-аллель *TLR4 (Asp299Gly)* и полиморфный вариант *Pro/Pro TLR6 (Ser249Pro)* у больных инсультом ассоциируются с высокими значениями ИЛ-1β. У носителей *Asp*-аллели *TLR4 (Asp299Gly)* и у обладателей *Pro*-аллели *TLR6 (Ser249Pro)* среди участников клинической группы определен более высокий уровень ИЛ-6. Таким образом, носительство полиморфизма изучаемых рецепторов предположительно увеличивает синтез ИЛ-6 и ИЛ-1β, от чего зависит выраженность и продолжительность воспалительного процесса в сосудистой стенке, а значит, течение и исход инсульта.

**Ключевые слова:** интерлейкины, толл-рецепторы, генетический полиморфизм, инсульт

## THE PREVALENCE OF GENETIC POLYMORPHISMS OF TOLL-LIKE RECEPTORS AND THE CONCENTRATION OF IL-1B, IL-6 IN PLASMA OF PATIENTS WITH CEREBRAL STROKE

**Krokhaleva Y.A., Strambovskaya N.N.**

Chita State Medical Academy, Chita, e-mail: yulia.shalashowa@yandex.ru, chitgma.ru

Investigated the concentration of proinflammatory cytokines (IL-1β, IL-6) in plasma and genetic polymorphism of some of the toll-like receptors (*TLR4(Asp299Gly)* and *TLR6(Ser249Pro)*) in patients with cerebral stroke. In comparison with the control group in patients with cerebral stroke in the TRANS-Baikal territory marked frequency the prevalence of genotypes of *TLR4 299Asp/Asp*, *TLR6-249Pro/Pro* alleles and *TLR4 299Asp* *TLR6-249Pro*. *Gly*-allele of *TLR4 (Asp299Gly)* and the polymorphic variant *Pro/Pro TLR6 (Ser249Pro)* in stroke patients is associated with high values of IL-1β. In carriers of the *Asp*-allele of *TLR4 (Asp299Gly)* and *Pro*-alleles *TLR6 (Ser249Pro)* among the participants of the clinical group was defined higher level of IL-6. Thus, carriers of the polymorphism of the studied receptors presumably increase the synthesis of IL-6 and IL-1β, what determines the severity and duration of the inflammatory process in the vascular wall, and thus the course and outcome of stroke.

**Keywords:** interleukins, toll-like receptors, genetic polymorphism, stroke

На сегодняшний день проблема ишемического инсульта – проблема национального масштаба, которая требует дальнейшего поиска решения и углубленного изучения данного заболевания. Среди механизмов вторичного повреждения ткани мозга и «доформирования» инфаркта при инсультах важное место принадлежит реакции локального воспаления в области ишемического очага. Воспалительную реакцию поддерживает активированная микроглия, продуцирующая ряд провоспалительных медиаторов, в том числе ИЛ-1, ИЛ-6, что в конечном итоге приводит к отсроченным нейрональным потерям [3, 5]. Последовательные этапы формирования воспалительной реакции изучены достаточно хорошо, в том числе и роль клеточных рецепторов, передающих активационные сигналы после взаимодействия с различными бактериаль-

ными патогенами или эндогенными паттернами [3, 4]. Толл-рецепторы (англ. Toll-like receptor, TLR; от нем. toll – замечательный) экспрессированы на поверхностных мембранах многих типов лейкоцитов, особенно макрофагов и дендритных клеток, выполняют определенную функцию в патогенезе неинфекционных заболеваний [6]. Toll-белки ответственны за активацию синтеза провоспалительных цитокинов и обеспечивают миграцию лейкоцитов в очаг воспаления. Они запускают иммунный ответ путем активации ядерного фактора, который иницирует транскрипцию генов провоспалительных цитокинов [7].

Литературные данные по изучению полиморфизма данных рецепторов у больных инсультом очень скудные, что не позволяет в полной мере оценить их роль в патогенезе данного заболевания.

**Цель исследования** – сравнить частоту генотипов и аллелей генетического полиморфизма *TLR4(Asp299Gly)* и *TLR6(Ser249Pro)* среди относительно здоровых людей и больных мозговым инсультом. Определить содержание IL-1 $\beta$  и IL-6 у больных мозговым инсультом в разные периоды заболевания (1, 10 и 21-е сутки), в том числе и с учетом носительства выявленных генотипов и аллелей.

### Материалы и методы исследования

В клиническую группу вошли 128 пациентов обоих полов в возрасте  $52 \pm 5,4$  лет, находящихся на лечении в стационарах г. Читы с диагнозом мозговой инсульт. Критериями отбора больных в исследуемую группу явились: наличие объективно доказанного (методами нейровизуализации) ОНМК и отсутствие в анамнезе онкологических и гематологических заболеваний, инфекционных заболеваний и другой острой соматической патологии (инфаркт миокарда). Контрольную группу составили 113 относительно здоровых резидентов обоих полов, не имеющих признаков цереброваскулярной патологии, в возрасте  $43 \pm 5,4$  лет ( $p > 0,05$ ). Представители клинической и контрольной групп являлись жителями Забайкальского края. У всех обследуемых было получено информированное согласие на участие в исследовании. Работа одобрена ЛЭК (протокол № 30 от 9.11.11 г.).

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической венозной крови. Амплификацию проводили в термоциклере «Бис-М110» (ООО «Бис-Н», Новосибирск). В работе использовались стандартные наборы НПФ «Литех» (Москва). Визуализация продуктов амплификации выполнялась в проходящем в ультрафиолетовом свете после электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Концентрацию интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), интерлейкина-6 (IL-6) исследовали в плазме крови, взятой трижды у больных мозговым инсультом (в 1-е, на 10-е и 21-е сутки от начала заболевания) и одновременно у здоровых резидентов. Определение данных цитокинов проводили тест-системами фирмы «Вектор-Бест» (Россия) с помощью иммуноферментного анализатора Expert 96 (Великобритания).

Статистическая обработка результатов выполнялась с использованием программных пакетов Biostat

и Excel 2007. При проведении описательной статистики вычисляли медиану (Me), 25 и 75 перцентили. Достоверность различий оценивали по критерию Манна – Уитни (u-тест). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Для определения популяционного равновесия частот аллельных вариантов генов применялся закон Харди – Вайнберга. При сравнении частот аллелей и генотипов по качественному бинарному признаку пользовались критерием  $\chi^2$ . Степень риска развития событий оценивали по величине отношения шансов (odds ratio (OR)) с расчетом для него 95% доверительного интервала (CI).

### Результаты исследования и их обсуждение

К цитокинам, значение которых в патогенезе ишемического инсульта доказано, относятся ФНО- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, IL-8. Так, в одном из исследований было отмечено, что повышение уровня IL-6 в остром периоде ишемического инсульта коррелирует с большим объемом инфаркта мозга и неблагоприятным прогнозом заболевания [3]. В другом исследовании показана связь отрицательной динамики инсульта с высокой концентрацией IL-6 вне зависимости от исходных размера, локализации и механизма инсульта [3]. Показатели IL-1 и IL-6 были изучены у больных инсультом в зависимости от степени тяжести заболевания. Так, у больных с тяжелой степенью инсульта концентрация ИЛ-1 $\alpha$  в сравнении с нормой была снижена на 50,95% (в 2,03 раза), а ИЛ-6 – на 85,49% (в 6,89 раза) [4].

При исследовании концентрации IL-1 $\beta$  и IL-6 – в динамике острого периода церебрального инсульта мы получили следующие результаты (табл. 1).

Таким образом, мы отмечаем незначительное, но достоверное повышение концентрации изучаемых интерлейкинов, причем IL-1 $\beta$  максимально к концу острого периода, а IL-6 – к моменту завершения формирования инфаркта мозга (10 сут.).

Таблица 1

Содержание цитокинов в крови больных мозговым инсультом в динамике острого периода заболевания, пг/мл (Me; 25-й; 75-й перцентили)

Цитокины	Клиническая группа, n = 78			Контрольная группа, n = 98
	1-е сутки	10-е сутки	21-е сутки	
IL-1 $\beta$	0 (0; 0) <sup>uv</sup>	1,09 (0; 12,16)*	1,25 (0; 12,36)*	0 (0; 0)
IL-6	3,07* <sup>vx</sup> (2,14; 5,46)	8,2* (4,54; 28,99)	6,72* (3,99; 14,37)	1,62 (0,94; 2,9)

Примечания: u,\* –  $p < 0,0001$  сравнение данных клинической и контрольной групп; u,\* –  $p < 0,0001$  статистически значимая разность с 21 сутками от начала инсульта; u, <sup>v</sup> –  $p < 0,0001$  сравнение с 10-ми сутками.

TLR могут экспрессироваться как внутриклеточно, так и экстраклеточно. В роли лигандов для этих рецепторов могут выступать не только инфекционные патогены, но и эндогенные агенты (фрагменты разрушенных клеток) [2]. После связывания с лигандами рецепторы запускают иммунный ответ по MyD88-независимому пути, который осуществляется посредством адаптерного белка TRIF или MyD88, и впоследствии активирующие NF-κB. Этот ядерный фактор, попадая в клеточное ядро, инициирует транскрипцию генов провоспалительных цитокинов IL-6, ФНО-α, IL-8, IL-18, хемокинов, NO-синтазы и других медиаторов, регулирующих воспаление. Также происходит активация цитокинов, стимулирующих дифференцировку Th1-клеток: IL-12, IL-23, IL-27, ответственных за развитие адаптивного иммунитета Th1-типа [1].

Полиморфизм генов предполагает, что с одного и того же гена может быть скопировано несколько структурно отличающихся копий одного и того же белка. При этом часть скопированных вариантов или не обладает активностью, или может иметь противоположную функцию [8]. В случае с толл-рецепторами полиморфизм может приводить к нарушению распознавания лигандов и дисбалансу функционирования системы иммунитета [2]. Одним из наиболее изученных вариантов TLRs-полиморфизма является *TLR4 (Asp299Gly)*, с которыми связывают отсутствие адекватного иммунного ответа и возрастание чувствительности к грамотрицательным инфекциям [8].

В результате молекулярно-генетического исследования обнаружены все искомые

мутации в гомо- и гетерозиготном состоянии. Отклонение от равновесия Харди – Вайнберга выявлено как для полиморфизма *TLR4(Asp299Gly)* ( $\chi^2 = 25,6$ ,  $p < 0,001$ ), так и для *TLR6(Ser249Pro)* ( $\chi^2 = 9,97$ ,  $p = 0,002$ ) у больных инсультом, преимущественно за счет разницы наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности (табл. 2).

У больных отмечается более частое носительство нормального аллеля *TLR4(Asp299Gly)* – 0,79 против 0,69 в контроле, причем зарегистрировано 1,6-кратное преобладание носительства его в гомозиготном состоянии, гетерозиготное же состояние аллелей встречалось в 4,9 раза реже, чем у обследуемых контрольной группы. Степень риска развития изучаемого заболевания у носителей генотипа *Asp/Asp* составила 3,63 [CI 95%: 2,11–6,24], у гетерозигот – 0,12 [CI 95%: 0,06–0,23]. Таким образом, у носителей дикого аллеля RR составил 1,72 [CI 95%: 1,14–2,6], для носителей мутантного аллеля – 0,58 [CI 95%: 0,38–0,88].

Среди пациентов значительно чаще встречаются носители *Pro/Pro*-генотипа полиморфизма *TLR6(Ser249Pro)*, для которых степень риска развития заболевания составляет 2,87 [CI 95%: 1,68–4,89]. Носители дикого аллеля в гомозиготном состоянии преобладают среди здоровых резидентов, RR для развития инфаркта мозга составил 0,56 [CI 95%: 0,30–1,07]. Таким образом, для обладателей нормального аллеля OR равен 0,47 [CI 95%: 0,32–0,68], для носителей мутантного аллеля степень риска развития цереброваскулярной патологии составила 2,15 [CI 95%: 1,46–3,16].

Таблица 2

Частота аллелей и генотипов *TLR4(Asp299Gly)*, *TLR6(Ser249Pro)* у больных ишемическим инсультом в Забайкальском крае

SNP	Группа	Аллель	Частота аллеля, p	$\chi^2$ ; p	Генотип	Частота генотипа, %	$\chi^2$ ; p
<i>TLR4 (Asp 299 Gly)</i>	клиническая группа (n = 128)	-299Asp -299Gly	0,79 0,21	6,66; 0,01	-299Asp/Asp -299Asp/Gly -299Gly/Gly	74,6 10,2 15,2	46,3; < 0,0001
	контрольная группа (n = 113)	-299Asp -299Gly	0,69 0,31		-299Asp/Asp -299Asp/Gly -299Gly/Gly	44,2 49,6 6,2	
<i>TLR6 (Ser 249 Pro)</i>	клиническая группа (n = 128)	-249Ser -249Pro	0,28 0,72	15,4; 0,0005	-249Ser/Ser -249Ser/Pro -249Pro/Pro	15,4 21,1 63,5	15,3; 0,0005
	контрольная группа (n = 113)	-249Ser -249Pro	0,46 0,54		-249Ser/Ser -249Ser/Pro -249Pro/Pro	26,5 38,9 34,6	

Примечание.  $\chi^2$ ; p – статистически значимая разница между клинической и контрольной группами.

Таблица 3

Взаимосвязь носительства полиморфных вариантов толл-рецепторов с показателями IL-1 $\beta$  и IL-6 у больных мозговым инсультом (Me; 25-й; 75-й процентиля)

Группа	TLR	Генотип аллель	1-е сутки от начала инсульта		10-е сутки от начала инсульта		21-е сутки от начала инсульта	
			IL-1 $\beta$	IL-6	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-1 $\beta$	IL-6
Клиническая группа	TLR4 ( <i>Asp299Gly</i> )	<i>Asp/Asp</i>	0 (0; 0)	6,88 (4,06; 15,69) <sup>1,5</sup>	0 (0; 8,85) <sup>2</sup>	11,04 (5,26; 47,15) <sup>1,6</sup>	0 (0; 11,88)	3,36(2,29; 5,6) <sup>1</sup>
		<i>Asp/Gly</i>	0 (0; 0) <sup>5</sup>	7,83 (3,29; 18) <sup>1</sup>	6,1 (2,68; 9,4) <sup>1</sup>	4,54 (2,63; 30,9) <sup>1</sup>	0 (0; 20,13)	3,07 (2,34; 5,54)
		<i>Gly/Gly</i>	0 (0; 0) <sup>5,6</sup>	4,92 (3,48; 8,26) <sup>1,6</sup>	9,68 (0; 18,95)	6,62 (5,24; 17,77) <sup>1,6</sup>	2,5 (0; 6,66)	2,68 (1,71; 3,46) <sup>2</sup>
		<i>Asp-аллель</i>	0 (0; 0)	6,88 (4,06; 15,69) <sup>1,5</sup>	0 (0; 8,85) <sup>2</sup>	11,04 (5,26; 47,15) <sup>1,6</sup>	0 (0; 11,88)	3,36 (2,29; 5,6) <sup>1</sup>
		<i>Gly-аллель</i>	0 (0; 0) <sup>5</sup>	4,92 (3,48; 8,26) <sup>1,6</sup>	8,58 (0; 14,63) <sup>1</sup>	6,14 (5,07; 13,8) <sup>1,6</sup>	2,5 (0; 6,66) <sup>2</sup>	2,68 (1,71; 3,46) <sup>2</sup>
	TLR6 ( <i>Ser249Pro</i> )	<i>Ser/Ser</i>	0 (0; 0) <sup>5</sup>	4,73 (3,92; 18,98) <sup>1,6</sup>	6,28(1,34; 17,24) <sup>2</sup>	4,79 (2,85; 10,24) <sup>1</sup>	0 (0; 7,48)	2,87 (2,68; 3,36)
		<i>Ser/Pro</i>	0 (0; 0,46)	6,56 (4,04; 11,31) <sup>1,5,6</sup>	0 (0; 8,85)	11,04 (7,09; 193,7) <sup>1,3,6</sup>	2,5 (0; 12,02) <sup>2</sup>	2,87 (1,9; 4,66) <sup>2</sup>
		<i>Pro/Pro</i>	0 (0; 0) <sup>5,6</sup>	7,09 (3,69; 14,37) <sup>1,5,6</sup>	0 (0; 13,81) <sup>2</sup>	7,41 (4,54; 20,36) <sup>1,6</sup>	0 (0; 10,23)	3,07 (2,14; 5,61) <sup>1</sup>
		<i>Ser-аллель</i>	0 (0; 0) <sup>5,6</sup>	4,73 (3,92; 18,98) <sup>1,5,6</sup>	6,28(1,34; 17,24) <sup>2</sup>	4,79 (2,85; 10,24) <sup>1,6</sup>	0 (0; 7,48)	2,87 (2,68; 3,36)
		<i>Pro-аллель</i>	0 (0; 0)	6,98 (3,98; 14,37) <sup>1,5,6</sup>	0 (0; 10,98) <sup>1</sup>	8,82 (4,68; 37,38) <sup>1,6</sup>	0 (0; 11,47) <sup>1</sup>	3,07 (2,04; 5,31) <sup>1</sup>
Контрольная группа	TLR4 ( <i>Asp299Gly</i> )	<i>Asp/Asp</i>	0 (0; 0,16)	1,54 (0,94; 2,81) <sup>4</sup>	Не исследовали	Не исследовали	Не исследовали	Не исследовали
		<i>Asp/Gly</i>	0 (0; 0)	1,83 (1,24; 3,77) <sup>4</sup>				
		<i>Gly/Gly</i>	0 (0; 0)	0,89 (0,52; 1,34) <sup>4</sup>				
		<i>Asp-аллель</i>	0 (0; 0,16)	1,54 (0,94; 2,81)				
		<i>Gly-аллель</i>	0 (0; 0)	1,79 (1,04; 3,6)				
	TLR6 ( <i>Ser249Pro</i> )	<i>Ser/Ser</i>	0 (0; 0)	1,54 (0,99; 3,72)	Не исследовали	Не исследовали	Не исследовали	Не исследовали
		<i>Ser/Pro</i>	0 (0; 0)	1,69 (1,02; 2,56)				
		<i>Pro/Pro</i>	0 (0; 0,11)	1,64 (1,24; 2,93) <sup>3</sup>				
		<i>Ser-аллель</i>	0 (0; 0)	1,54 (0,99; 3,72)				
		<i>Pro-аллель</i>	0 (0; 0)	1,64 (1,04; 2,79)				

Примечания:  $u^1 - p < 0,01$ ;  $u^2 - p < 0,05$  – сравнение данных клинической и контрольной групп;  $u^3 - p < 0,05$  – сравнение значений генотипов и аллелей между толл-рецепторами внутри группы;  $u^4 - p < 0,05$  – сравнение данных генотипов и аллелей одного рецептора внутри группы;  $u^5 - p < 0,0001$  сравнение с 10-ми сутками;  $u^6 - p < 0,0001$  статистически значимая разница с 21-ми сутками от начала инсульта.

При анализе ассоциации носительства изучаемых полиморфных маркеров и концентрации интерлейкинов у больных ишемическим инсультом отмечено, что у обладателей *Pro*-аллели *TLR6 (Ser249Pro)* и *Pro/Pro TLR6 (Ser249Pro)* определяется более высокий уровень IL-1 $\beta$  и IL-6. *Gly*-аллель *TLR4 (Asp299Gly)* ассоциируется с высокими значениями IL-1 $\beta$ , а *Asp*-аллель *TLR4 (Asp299Gly)* – с повышением в плазме IL-6 (табл. 3).

Мы предполагаем, что полиморфизм *TLR4 (Asp299Gly)* и *TLR6 (Ser249Pro)* приводит к генетически детерминированным конформационным изменениям

рецепторов или изменениями передачи сигнала в клетку, что в свою очередь вызывает цитокиновый дисбаланс, влияющий на исход и течение ОНМК.

### Заключение

В результате молекулярно-генетического исследования обнаружены все искомые мутации в гомо- и гетерозиготном состоянии. В сравнении с контрольной группой у больных мозговым инсультом в Забайкальском крае отмечено частотное преобладание генотипов *TLR4-299Asp/Asp*, *TLR6-249Pro/Pro* и аллелей *TLR4-299Asp TLR6-249Pro*. *Gly*-аллель

*TLR4 (Asp299Gly)* и полиморфный вариант *Pro/Pro TLR6 (Ser249Pro)* у больных инсультом ассоциируются с высокими значениями IL-1 $\beta$ . У носителей *Asp*-аллели *TLR4 (Asp299Gly)* и у обладателей *Pro*-аллели *TLR6 (Ser249Pro)* среди участников клинической группы определился более высокий уровень IL-6. Таким образом, носительство полиморфизма изучаемых рецепторов предположительно увеличивает синтез IL-6 и IL-1 $\beta$ , от чего зависит выраженность и продолжительность воспалительного процесса в сосудистой стенке, а значит, течение и исход инсульта.

#### Список литературы

1. Абатуров А.Е. Молекулярные механизмы неспецифической защиты респираторного тракта: распознавание патоген-ассоциированных молекулярных структур // Теоретическая медицина. – 2006. – Т. 2, № 2.
2. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В., Веткова Л.Г. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов // Микробиология. – 2004. – № 3. – С. 98–105.
3. Лысенко В.И., Н.В. Дьолог. Ишемический инсульт – особенности патогенеза и алгоритм базисной терапии // Юрия Фарм. – Киев. – Режим доступа: <http://uf.ua/lib/470/> (дата обращения 1.08. 2015).
4. Мищенко Т.С., Балковая Н.Б., Линская А.В., Соколик В.В. Провоспалительные цитокины в прогнозе ишемического инсульта // Новости медицины и фармации. – 2010.
5. Охотова Ф.Р. Ишемический инсульт и показатели клеточного и гуморального иммунитета (клинико-иммунологическое исследование): дис. ... канд. мед. наук. – М., 2014. – 80 с.
6. Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 9–16.
7. Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления // Цитокины и воспаление. – 2005. – № 1. – С. 3–10.
8. Толстопятова М.А., Буслаева Г.А., Козлов И.Г. Роль рецепторов врожденного иммунитета в развитии инфекционной патологии у новорожденных детей // Педиатрия. – 2009. – Т. 87, № 1. – С. 115–120.