

УДК 616.34

А. А. Дорофеева
Донецкий национальный университет, г. Донецк

ТОЧЕЧНАЯ МУТАЦИЯ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ (TLR3 И TLR4) И СИНДРОМ ИЗБЫТОЧНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО РОСТА

Проведена оценка и анализ нарушений микробиома кишечника у студентов высшей школы Донецкого промышленного региона в зависимости от генных мутаций и инфекционных факторов.

Было обследовано 26 студентов высшей школы. Для оценки состояния флоры кишечника был использован водородный тест с лактулозой. С его помощью определяли синдром избыточного бактериального роста (СИБР) не только в толстом, но и в тонком кишечнике. Для анализа мутации генов исследуемым была проведена ДНК-диагностика, включавшая анализ мутаций toll-подобного рецептора 3 - TLR3 (мутация Phe412Leu) и toll-подобного рецептора 4 - TLR4 (мутация Asp299Gly). ДНК выделена из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь». У лиц с мутацией гена рецепторов TLR4 отмечается снижение местной резистентности слизистой оболочки тонкого кишечника, что способствует развитию СИБР. Наличие мутации гена TLR3 мало влияло на эти процессы. В то же время ни гетерозиготные мутации гена TLR3, ни мутации TLR4 не влияли ($p < 0,5$) на частоту острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) и длительность лихорадочного периода. Но наличие гомозиготной мутации гена TLR3 сочеталось с частыми заболеваниями ОРВИ и длительным лихорадочным периодом.

Ключевые слова: рецепторы, мутация генов, бактериальный рост, резистентность.

Особенности кишечного микробиома играет очень важную роль для человека осуществляя множество физиологических функций включая барьерную и иммуностимулирующую. Генетические мутации, влияние неблагоприятных внешних факторов приводят к нарушению соотношения различных бактериальных подвидов в составе микробиома и возникновению синдрома избыточного бактериального роста [2, 3]. Повышение частоты выявления СИБР у людей, живущих в экономически развитых странах, исследователи связывают с увеличением экологической нагрузки, нарушением характера и режима питания, употреблением рафинированных продуктов, высоким уровнем стресса у жителей мегаполисов [1, 5].

В Украине показатели частоты встречаемости СИБР различны в зависимости от региона. Так, в экологически неблагоприятных регионах частота выявления СИБР выше, чем в сельскохозяйственных регионах [4, 6].

Синдром избыточного бактериального роста в кишечнике является полиэтиологическим, в его возникновении значительную роль играет наследственная предрасположенность, реализующаяся под воздействием стрессов, пищевых погрешностей и иммунологических нарушений [3, 4]. Микрофлора является одним из факторов, определяющих нормальное функционирование слизистого барьера кишечника [1, 2].

При наличии воспаления интоксикации угнетаются секреторная и метаболическая активность клеток кишечного эпителия и снижается резистентность слизистых барьеров [1, 4].

При изменениях микробиоциноза кишечника нарушаются витаминообразующие функции, которые выполняют бифидобактерии и кишечная палочка. Они способствуют синтезу незаменимых аминокислот и принимают участие в процессах регенерации слизистой оболочки толстой кишки [6, 8].

Кроме того, при нарушениях баланса анаэробно-аэробной флоры изменяется энергообеспечение колоноцитов [8, 10].

В таком случае нарушаются секреторная функция бокаловидных клеток, соотношения сульфатированных и несulfатированных гликозаминогликанов, а также снижается синтез муцинов, изменяются их состав и свойства, это приводит к нарушению защитных свойств слизи, что поддерживает дисбактериоз.

Развитие СИБР может быть генетически детерминировано. Основную роль в генетической предрасположенности к нарушению бактериальной колонизации играют toll-подобные рецепторы (TLR) [10]. Эти рецепторы (TLRs 1-13) играют ведущую роль в распознавании компонентов клеточной стенки бактерий и вирусов, и участвуют в активации каскада восстановительных реакций, механизмах общего и местного иммунитета [8, 9, 10]. Они широко представлены на поверхности кишечного эпителия и обнаружены на моноцитах, макрофагах многих органах и тканях.

Связывание рецепторов с бактериальным или вирусным антигеном приводит к активации факторов ядерной транскрипции (NF- κ B, JAK2), изменяет экспрессию провоспалительных

цитокинов, запускает механизм воспалительного ответа. Активация TLRs способствует активации цитокинов и интерлейкинов [7, 8, 9, 10]. TLR4 находятся не только в кишечнике, но и на кардиомиоцитах в головном мозге, лейкоцитах периферической крови, а TLR3 находятся только на дендритных клетках, т.е. являются первичным звеном контактирующих с антигеном. В эксперименте клетки TLR3 дефицитных линий характеризовались сниженной продукцией провоспалительных цитокинов (TNF-L, IL-6, IL-12) [7, 9].

Возможно, различные нарушения TLRs в кишечнике из-за генетической предрасположенности способствуют формированию различных типов ответа на вирусных и бактериальных антигенах, влияют на состав кишечной микрофлоры.

Изучены частота точечных мутаций гена TLR3 – замещение фенилаланина лейцином в позиции 412, и мутации гена TLR4 – замещение аспарагиновой кислоты глицином в позиции 299, и влияние этих мутаций на частоту кишечных инфекций и заболеваемость острыми вирусными бактериальными инфекциями (ОРВИ) [7, 9].

Toll-подобные рецепторы рассматривают, как ключевое звено в регуляции противомикробной протекции кишечника [8, 9]. Поэтому, возможно, точечная мутация генов toll-подобных рецепторов, в частности TLR3 и TLR4 отражается на частоте развития синдрома избыточного бактериального роста (СИБР) в тонком кишечнике, уровне системного иммунитета.

Целью работы была оценка и анализ нарушений микробиома кишечника у студентов высшей школы Донецкого промышленного региона в зависимости от генных мутаций и инфекционных факторов.

Материал и методы исследования. Было обследовано 26 студентов высшей школы Донецкого национального университета, Донецкого национального медицинского университета. Для оценки состояния флоры кишечника был использован водородный тест с лактулозой. С его помощью определяли синдром избыточного бактериального роста не только в толстом, но и в тонком кишечнике.

Для анализа мутации генов обследуемым была проведена ДНК-диагностика, включавшая анализ мутаций toll-подобного рецептора 3 - TLR3 (мутация Phe412Leu) и toll-подобного рецептора 4 – TLR4 (мутация Asp299Gly). ДНК выделена из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь». В работе были использованы диагностические тест-системы «SNP-экспресс», разработанные НПФ «Литех».

Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК с последующей электрофоретической детекцией. Реакция проводилась при следующих условиях: первичная денатурация при 93 С в течении 1 мин, после которой следовали 35 циклов, состоящих из денатурации при 93 С в течении 10 с, элонгации при 72 С в течении 20 с. ПЦР проводили на амплификаторе Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Анализ амплифицированных фрагментов производили путем электрофореза в 3% агарозном геле, окрашенном в бромистом этидии. Визуализацию результатов проводили в ультрафиолетовом трансиллюминаторе TFX-20.M (Vilber Lourmat Франция).

Результаты исследования и их обсуждение. У обследованных здоровых жителей Донецкого региона точечные мутации генов рецепторов TLR3 и TLR4 выявлялись достаточно часто. Мутации гена рецепторов TLR3 выявлена у 17 (65,4%) обследованных, при этом полная гомозиготная мутация (Leu/Leu) имела в 11 (42,3%) случаев.

Мутация гена рецепторов TLR4 выявлена у 14 (53,8%), а гомозигот по данной мутации не обнаружено. Сочетание мутации генов TLR3 и TLR4 имели 8 (30,7%) обследованных, а мутацию только одного из этих генов 10 (38,4%).

При сопоставлении частоты мутаций генов рецепторов TLR3 и TLR4 и частоты СИБР выявлены существенные различия (табл.1).

Если в группе лиц без мутации генов рецепторов TLR3 и TLR4 у всех обследованных СИБР отсутствовал, то в группах обследованных с мутациями TLR3 или TLR4 он выявлен, но с различной частотой.

У людей без мутации гена TLR3 преобладал отрицательный дыхательный тест, т.е. СИБР отсутствовал у большинства 8 (80,0%). Но у обследованных с мутацией гена TLR3 СИБР отсутствовал у 10 (62,2%), а был выявлен почти у трети 6 (37,8%), но преимущественно у лиц с сочетанием мутаций генов TLR3 и TLR4 (p< 0,05).

У людей с отсутствием мутации гена TLR4 СИБР не выявлен ни у одного обследованного, а при наличии мутации гена TLR4 синдром избыточного бактериального роста был у 8 (66,7%),

что достоверно отличалось от группы с отсутствием данной мутации ($p < 0,05$). В то же время при сопоставлении частоты СИБР в группе с сочетанием мутации генов TLR3 и TLR4 достоверных различий не выявлено ($p < 1,0$), что указывает на малое влияние присоединения мутации TLR3 к мутации TLR4 при развитии СИБР.

Таблица 1

Характер дыхательного теста у лиц с мутациями генов рецепторов TLR3 и TLR4

Группы мутации генов	Отрицательный		Положительный	
	n	%	n	%
1. Мутации TLR3 и TLR4 нет	8	100,0%	-	-
2. TLR3				
а) норма	8	80,0%	2	20,0%
p <		0,2		0,2
б) мутация	10	62,2%	6	37,8%
p <		0,05		0,05
p 1 <		0,2		0,2
в) сочетание мутаций TLR3 и TLR4	4	40,0%	6	60,0%
p <		0,05		0,05
p 2 <		0,05		0,05
3. TLR4				
а) норма	14	100,0%	-	-
p <		1,0		-
б) мутация	4	33,3%	8	66,7%
p <		0,05		0,001
p 3 <		0,05		0,05
p 4 <		0,5		1,0

Примечание: P – по сравнению с группой 1. Мутации TLR3 и TLR4 нет P1 – сравнение группы TLR3 с мутацией и без мутации P2 – сравнение групп мутацией TLR3 и 2 в) сочетание мутаций TLR3 и TLR4 P3 – сравнение группы TLR4 с мутациями и без них P4 – сравнение группы 3 б) TLR4 с мутациями и 2 в) сочетание мутаций TLR3 и TLR4.

Таким образом, СИБР достоверно чаще выявлялся у лиц с мутацией гена TLR4 ($p < 0,05$) вне зависимости от сочетания мутации гена TLR3. В то же время у 4 (33,3%) студентов с мутацией TLR4 избыточный бактериальный рост не выявлен, но показателями дыхательного водородного теста у них был в пределах верхней границы нормы (23-21ppm), что может свидетельствовать о тенденции к повышенной колонизации бактерий в тонком кишечнике. У всех этих лиц мутация TLR4 сочеталась с мутацией гена TLR3. Следовательно, можно предполагать, что при мутации гена рецепторов TLR4 снижается местная резистентность слизистой тонкого кишечника, способствующая развитию СИБР.

Заболеваемость ОРВИ практически не зависела от наличия мутаций генов рецепторов TLR3 и TLR4 (табл.2).

Таблица 2

Частота и характер течения ОРВИ у лиц с мутацией генов рецепторов TLR3 и TLR4

Группа мутации генов	Частота ОРВИ(ск. раз в год)				Длительность лихорадки			
	До 2-х		3 и более		До 2-х дней		3 дня и более	
	n	%	n	%	n	%	n	%
1. Мутации TLR3 и TLR4 нет	6	75,0	2	25,0	6	75,0	2	25,0
2. TLR3								
а) норма	2	100,0	-	-	2	100,0	-	-
p <		0,5		0,5		0,5		0,5
б) мутация	8	80,0	2	20,0	8	80,0	2	20,0
p <		1,0		1,0		1,0		1,0
p 1 <		0,5		0,5		0,5		0,5
3. TLR4								
а) норма	-	-	-	-	-	-	-	-
б) мутация	6	75,0	2	25,0	6	75,0	2	25,0
p <		1,0		1,0		1,0		1,0
в) сочетание мутаций TLR3 и TLR4	4	66,6	2	33,3	4	66,6	2	33,3
p <		0,5		0,5		0,5		0,5

Примечание: p – по сравнению с группой 1. Мутации TLR3 и TLR4 нет p1 – сравнение группы TLR3 с мутацией и без мутации.

Во всех группах с мутациями генов рецепторов TLR3 и TLR4 заболеваемость ОРВИ была низкой до 2-х раз в год (80,0% - 75,0%), как и в группе без мутаций TLR3 и TLR4 (75,0% $p < 1,0$). Но у одного обследованного с гомозиготной мутацией TLR3 (Leu/Leu) отмечались частые ОРВИ (

более 5 раз в год) с длительным лихорадочным периодом (до 5-6 дней), что может свидетельствовать о нарушениях системного иммунитета.

Заключення

Таким образом, у лиц с мутацией гена рецепторов TLR4 отмечается снижение местной резистентности слизистой оболочки тонкого кишечника, что способствует развитию СИБР. Наличие мутации гена TLR3 мало влияло на эти процессы. В то же время ни гетерозиготные мутации гена TLR3, ни мутации TLR4 не влияли ($p < 0,5$) на частоту ОРВИ и длительность лихорадочного периода. Но наличие гомозиготной мутации гена TLR3 сочеталось с частыми заболеваниями ОРВИ и длительным лихорадочным периодом.

Список литературы

1. Ardatskaya M. D. Disbakterioz kishchnika / M. D. Ardatskaya // *Materia Medica*. – 2003. - No 2-3. – S. 2-8.
2. Grigoryev A. V. Zheludochno-kishechniy trakt kak sreda obitaniya bakteriy. Razdel 1. Morfologiya zheludochno-kishechnogo bakterialnogo biotopa / A. V. Grigoryev // – Moskva; Kiev, - 2004. – 95 s.
3. Dubinin A. V. Troficheskiye i regulatorynyye svyazi makroorganizma i mikroflory / A. V. Dubinin, V. N. Babin, P. M. Rayevskiy // *Klinicheskaya meditsina*. – 1991. - No 7. – S. 24-28.
4. Kryuchko T. O. Genetichniy polimorfizm Toll-podibnogo retseptora 4 u dltey z atopichnoy bronhialnoy astmoyu / T. O. Kryuchko [i dr.] // *Klinicheskaya immunologiya. Allergologiya. Infektologiya*. – 2011. - No 5. – S. 115-120.
5. Tkachenko Ye. I. Disbioz kishchnika: Rukovodstvo po diagnostike i lecheniyu / Ye. I. Tkachenko, A. N. Suvorova // – SPb.: Spetslit, - 2007. – 238 s.
6. Tolstopyatova M. A. Rol retseptorov rozhdennogo immuniteta v razvitii infektsionnoy patologii u novorozhdennykh detey / M. A. Tolstopyatova, G. A. Buslaeva, I. G. Kozlov // *Pediatrics*. – 2009. – T. 87, No 1. – S. 115-120.
7. Ferwerda B. Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms / B. Ferwerda, M. B. McCall, K. Verheijen [et al.] // *Mol. Med.* – 2008. – Vol. 14, № 5-6. – P. 346-352.
8. Moser M. 7 Dendritic cell regulation of TH1/TH2 development / M. Moser, K.M. Murphy // *Nat. Immunol.* – 2000. – Vol. 1. – P. 199-205.
9. Marsik C. The Toll-Like Receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphism Influence the Late Inflammatory Response in Human Endotoxemia / C. Marsik, B. Jilma, C. Joukhadar [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2005. – Vol. 51, № 11. – P. 2178-2180.
10. Schwartz D. The Genetics of Innate Immunity / David A. Schwartz // *CHEST*. – 2002. – Vol. 121. – P. 62-68.

Реферати

ТОЧКОВА МУТАЦІЯ ГЕНІВ TOLL-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ (TLR3 І TLR4) І СИНДРОМ НАДЛИШКОВОГО БАКТЕРІАЛЬНОГО РОСТУ

Дорофеева Г. А.

Проведена оцінка та аналіз порушень мікробіому кишечника у студентів вищої школи Донецького промислового регіону в залежності від генних мутацій та інфекційних факторів. Було обстежено 26 студентів вищої школи. Для оцінки стану флори кишечника був використан водневий тест з лактулозою. З його допомогою визначали синдром надлишкового бактеріального росту (СНБР) не тільки в товстому, а й в тонкому кишечнику. Для аналізу мутації генів обстежуваним була проведена ДНК-діагностика, що включала аналіз мутацій toll-подібного рецептора 3 - TLR3 (мутація Phe412Leu) і toll-подібного рецептора 4 - TLR4 (мутація Asp299Gly). ДНК виділена з лейкоцитів цільної крові за допомогою реагенту «ДНК-експрес-кров». У осіб з мутацією гену рецепторів TLR4 відзначається зниження місцевої резистентності слизової оболонки тонкого кишечника, що сприяє розвитку СНБР. Наявність мутації гену TLR3 мало впливало на ці процеси. У той же час ні гетерозиготні мутації гену TLR3, ні мутації TLR4 не впливали ($p < 0,5$) на частоту гострих респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ) та тривалість гарячкового періоду. Але наявність гомозиготної мутації гена TLR3 поєднувалася з частими захворюваннями на ГРВІ та тривалим гарячковим періодом.

Ключові слова: рецептори, мутація генів, бактеріальний ріст, резистентність.

Стаття надійшла 16.09.2014 р.

POINT MUTATIONS GENE TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR3 AND TLR4) AND BACTERIAL OVERGROWTH SYNDROME

Dorofeyeva A. A.

Evaluate and analyze violations of intestine microbiome in high school students of Donetsk industrial region, depending on the gene mutations and infections factors carried. 26 high school students were examined. Hydrogen test with lactulose to assess the state of the intestinal flora was used. Bacterial overgrowth syndrome (BOS) not only in the large, but also in the small intestine was determined. DNA tests, which included analysis of mutations toll-like receptor 3 - TLR3 (mutation Phe412Leu) and toll-like receptor 4 - TLR4 (mutation Asp299Gly), were conducted. DNA were extracted from leukocytes by using the reagent "DNA express blood". Thus, in persons with TLR4 gene receptor mutation local mucus barrier and resistant small intestine mucosa were abnormal, which promotes to development of BOS. The presence of TLR3 gene mutation had little effect on these processes. At the same time, neither heterozygous mutations of TLR3, TLR4 mutations had no effect to incidence and duration of AVRI. But the presence of a homozygous TLR3 mutation was associated with frequent and prolonged AVRI disease.

Key words: receptor, gene mutation, bacterial growth, resistance.

Рецензент Запорожець Т.М.