

Роль экспрессии Толл-подобных рецепторов в рецидивировании генитального герпеса

Асс. каф. М.С. СЕЛИВЕРСТОВА¹, к.м.н., доц. каф. О.П. ЛЕБЕДЕВА¹, Т.К. ТАРАСОВА², д.м.н., чл.-корр. РАЕН, зав. каф. С.П. ПАХОМОВ¹, д.м.н., проф., зав. каф. М.И. ЧУРНОСОВ¹, С.А. АРХИПОВ²

¹ГОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Россия; ²ОГУЗ «Белгородский областной кожно-венерологический диспансер», Белгород, Россия

Цель. Оценка экспрессии Толл-подобных рецепторов (TLRs) TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 и белков их сигнального пути TRIF и IRAK4 при различных клинических формах ГГ.

Материал и методы. Были обследованы 150 пациенток с ГГ. Первую группу составили пациентки с первым эпизодом непервичной инфекции ($n=56$), вторую группу — с редко рецидивирующим ГГ ($n=53$), третью группу — с часто рецидивирующим ГГ ($n=41$).

Результаты. Обнаружено снижение экспрессии TLR7 в группе пациентов с редко рецидивирующей формой ГГ в сравнении с пациентами с первым эпизодом непервичной инфекции. В этих же группах сравнения было обнаружено снижение экспрессии IRAK4. Также было выявлено снижение экспрессии TLR3 в группе с часто рецидивирующей формой ГГ в сравнении с группой с редко рецидивирующей формой ГГ. В клинической картине наблюдалась умеренная положительная корреляционная связь между экспрессией TLR2 и наличием болевого синдрома, TLR4 и увеличением паховых лимфатических узлов, а также TLR3, TLR8 и лихорадкой. Также обнаружена сильная положительная корреляционная связь между наличием у женщин в анамнезе хламидийной инфекции и количеством обострений ГГ.

Выводы. Снижение экспрессии сигнальных рецепторов, ответственных за распознавание вируса, способствует увеличению частоты рецидивов ГГ; особенности клинической картины при ГГ в большей степени коррелируют с экспрессией TLRs, лигандами которых являются бактериальные антигены, а также, возможно, наличие в анамнезе хламидийной инфекции является фактором, усугубляющим течение ГГ.

Ключевые слова: TLR, TRIF, IRAK4, генитальный герпес, хламидийная инфекция.

The role of Toll-like receptors expression in the recurrent genital herpes

M.S. SELIVERSTOVA¹, O.P. LEBEDEVA¹, T.K. TARASOVA², S.P. PAKHOMOV¹, M.I. CHURNOSOV¹, S.A. ARKHIPOV²

¹Belgorod state national research university, Belgorod, Russia; ²Belgorod regional dermatovenerologic dispensary, Belgorod, Russia

Objective. To evaluate the expression of TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 and proteins of their signaling pathway TRIF, IRAK4 in different clinical forms of genital herpes (GH).

Methods. 150 patients with GH were divided into 3 groups according to clinical forms of GH: group 1 ($n=56$) with first episode of non-primary infection; group 2 ($n=53$) with rarely recurrent GH and group 3 ($n=41$) with often recurrent GH.

Results. Patients with a rarely recurrent GH have lower expression of TLR7 and IRAK4 compared with women with first episode of non-primary infection. Expression of TLR3 was lower in the group of frequently recurrent form of GH compared with the group with rarely recurrent GH. Moderate positive correlation between TLR3 and TRIF adapter molecule was observed. Pain syndrome and lymphadenopathy were associated with increased expression of TLR2 and TLR4 and decreased expression of TLR3 and TLR8. Strong positive correlation between chlamydial infection and the number of herpes exacerbations was found.

Conclusion. Different clinical forms of GH are associated with different pattern of TLR expression.

Key words: TLR, TRIF, IRAK4, genital herpes, chlamydia.

По данным ВОЗ на ноябрь 2013 г., более 530 млн человек в мире заражены вирусом генитального герпеса (ГГ) [10]. ГГ способен вызывать самопроизвольные выкидыши, преждевременные роды, синдром задержки роста плода, врожденные пороки развития, неонатальный сепсис, энцефалит и менингоэнцефалит у новорожденного [5].

Одной из главных проблем является рецидивирующая форма ГГ. По данным литературы [1], более чем у 20—30% больных ГГ в течение первых 2—3 лет развивается рецидив. Рецидивирующая форма ГГ

оказывает не только негативное влияние на психоэмоциональный статус пациентов, но и отражает неспособность местного противовирусного ответа [9]. В частности, наличие рецидивирующего ГГ в последнее время связывают с повышенным риском заражения ВИЧ [8].

Ключевым звеном в распознавании вирусных агентов являются Толл-подобные рецепторы, кото-

Для корреспонденции:

e-mail: seliverstovaMS@yandex.ru

рые экспрессируются на клетках системы врожденного иммунитета — макрофагах, нейтрофилах, дендритных и эпителиальных клетках, а также натуральных киллерах. В распознавании вируса простого герпеса (HSV) участвуют TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9. Они запускают каскад иммунных реакций посредством сигнальной молекулы MyD88 (белок первичного ответа миелоидной дифференцировки 88) или без нее — по MyD88-независимому пути, что требует присутствия адаптерного белка, индуцирующего интерферон-1 β (Toll/IL-1 domaincontaining adaptor inducing interferon-1 β , TRIF). Далее происходит активация интерлейкинсвязывающей киназы 4 (IRAK4) и ядерного транскрипционного фактора NF- κ B. Итогом каскада этих реакций является продукция интерферонов (INF) и интерферонстимулированных генов, которые и определяют качество противовирусного ответа [2].

Цель настоящего исследования — оценка экспрессии TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, TRIF и IRAK4 при различных клинических формах ГГ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор материала для исследования проводился на базе Областного кожно-венерологического диспансера Белгорода. Обследованы 150 женщин с ГГ. Всем пациенткам проводилось анкетирование. В 1-ю группу вошли 56 пациенток с первым эпизодом первичной инфекции (первым клиническим эпизодом ГГ при существующем HSV); во 2-ю группу — 53 пациентки с редко рецидивирующим ГГ (рецидивы 3—4 раза в год, ремиссия менее 4 мес); в 3-ю группу — 41 пациентка с часто рецидивирующим ГГ (рецидивы 4—6 раз в год, ремиссия менее 2—3 мес).

Материалом для исследования был соскоб эпителия с поверхности везикул, полученный с помощью цитощетки или урогенитального зонда, который хранили в пробирках по 1,5 мл типа Эппендорф с 0,5 мл реагента RNAlater («Ambion», США) при -20°C . Выделение РНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции с использованием реагента TRIzol («Евроген», Россия). Качество РНК проверяли методом электрофореза в течение 15 мин при напряжении 10 В/см по интенсивности свечения полос рибосомальной РНК в 1,1% агарозном геле с бромидом этидием. Затем образцы обрабатывали ДНКазой DNase I RNase free («Fermentas», США) для удаления геномной ДНК согласно инструкции производителя. Концентрацию мРНК определяли на спектрофотометре Nanodrop («ThermoScientific», США). В реакцию вносили 1 мкг мРНК. Для проведения обратной транскрипции использовали обратную транскриптазу Mint («Евроген», Россия). Определение экспрессии мРНК TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, TRIF и IRAK4 проводили мето-

дом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в НИЛ «Молекулярная генетика человека» НИУ БелГУ. Подбор праймеров осуществлялся с помощью базы данных BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). В качестве генов-нормировщиков использовали бета-актин и пептидилпролилизомеру А (PPIA). Количественную ПЦР проводили со смесью qPCRmix-HS SYBR с интеркалирующим красителем SYBR I («Евроген», Россия) на амплификаторе CFX96 («Biorad», США). Экспрессию мРНК исследуемых генов вычисляли методом $\Delta\Delta\text{Ct}$. Статистический анализ выполняли с использованием программы Statistica 6,0 (лицензия №AXXR505C705306FAN12, «Statsoft», США). Для оценки достоверности различий использовали критерий Манна—Уитни, для корреляционного анализа — критерий Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружено снижение экспрессии TLR7 в группе пациентов с редко рецидивирующей формой ГГ в сравнении с пациентами с первым эпизодом первичной инфекции [7,62 (5,98; 10,3) против 11,67 (7,36; 20,04) соответственно; $p < 0,05$]. В этих же группах сравнения было обнаружено снижение экспрессии IRAK4 [0,004542 (0,000112; 0,046) и 0,09 (0,0014; 12,16) соответственно; $p < 0,05$].

Также выявлено снижение экспрессии TLR3 в группе с часто рецидивирующей формой ГГ в сравнении с группой с редко рецидивирующей формой ГГ [0,63 (14,6; 40,02) против 31,3 (23,9; 48,0) соответственно; $p < 0,05$] (табл. 1).

Это соотносится с данными литературы [11], согласно которым снижение экспрессии TLR3 и TLR7 связано с повышением восприимчивости к HSV. В исследовании К. Yang [12] также было отмечено, что при дефиците IRAK4 продукция цитокинов не всегда может быть эффективной, что, вероятно, приводит к рецидивам ГГ. В частности, продукция IFN посредством активации TLR7 и TLR9 осуществляется только через IRAK4 и соответственно при дефиците IRAK4 не может быть полноценной. С другой стороны, IRAK4-дефицитные пациенты могут контролировать противовирусную защиту посредством TLR3/4-зависимой продукции IFN. В нашем исследовании у пациенток с редко рецидивирующей формой ГГ снижена экспрессия TLR7 и IRAK4 по сравнению с пациентками с первым эпизодом первичной инфекции, а также снижена экспрессия TLR3 в группе с часто рецидивирующей формой в сравнении с группой с редко рецидивирующим ГГ, но нет изменений экспрессии TLR4 и TLR9. Возможно, именно такой профиль характерен для пациенток этих групп.

Для выявления корреляционных взаимосвязей между экспрессией TLRs и белков их сигнального пути использовали критерий Спирмена. Умеренная

Таблица 1. Экспрессия TLRs у пациентов с разными клиническими формами ГГ

Толл-подобный рецептор	1. Первый эпизод первичной инфекции (n=56)	2. Редко рецидивирующий ГГ (n=53), отн. ед.	3. Часто рецидивирующий ГГ (n=41), отн. ед.	P_{1-2}	P_{2-3}	P_{1-3}
TRIF	9,2 (0,0004; 3,94)	0,003 (0,00014; 0,02)	0,8 (0,0004; 0,025)	0,38	0,5	0,81
TLR2	1,94 (0,05; 4,83)	0,13 (0,04; 0,28)	1,0 (0,05; 0,36)	0,47	0,32	1,0
TLR3	27,41 (11,47; 44,63)	31,3 (23,9; 48,0)	0,63 (14,6; 40,02)	0,55	0,048	0,63
TLR4	2,84 (0,004; 8,9)	0,02 (0,01; 0,04)	0,89 (0,0086; 0,06)	0,67	0,93	0,89
TLR7	11,67 (7,36; 20,04)	7,62 (5,98; 10,3)	0,66 (6,94; 15,78)	0,038	0,35	0,66
TLR8	1,03 (0,04; 2,26)	0,06 (0,03; 0,14)	0,89 (0,04; 0,19)	0,34	0,78	0,89
TLR9	1,39 (0,81; 3,1)	1,21 (0,62; 2,18)	0,19 (0,7; 2,21)	0,36	0,47	0,2
IRAK4	0,09 (0,0014; 12,16)	0,004542 (0,00012; 0,046)	0,24 (0,0008; 0,43)	0,035	0,43	0,25

положительная корреляционная связь наблюдалась только между экспрессией мРНК TRIF и TLR3 ($R=0,37$; $p<0,05$). Это согласуется с данными литературы [3], так как именно TLR3 для активации внутриклеточного каскада продукции IFN необходима адапторная молекула TRIF. Также была выявлена слабая корреляционная связь между TLR9 и TRIF ($R=0,25$; $p<0,05$) и IRAK4 и TRIF ($R=0,24$; $p<0,05$) (табл. 2).

Выявлена умеренно положительная корреляционная связь между экспрессией большинства TLRs (табл. 3).

TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 комплексно участвуют в распознавании лигандов HSV, имеют общий MyD88-зависимый путь активации. Исключение составляют TLR3, которому необходима адапторная молекула TRIF, и TLR4, который может активироваться и посредством MyD88, и TRIF [7]. Как видно из табл. 3, корреляционная связь при HSV есть практически между всеми TLRs, независимо от дальнейшего пути активации [6].

Кроме того, обнаружена слабая положительная корреляционная связь между экспрессией TLR7 и IRAK4 ($R=0,22$; $p<0,05$), а также между экспрессией TLR9 и IRAK4 ($R=0,26$; $p<0,05$) (табл. 4). Несмотря на то что TLR7 и TLR9 имеют разные лиганды, они оба располагаются внутриклеточно, имеют общий MyD88-зависимый сигнальный путь и продукция IFN посредством их активации осуществляется только через IRAK4 [12].

В клинической картине наблюдалась умеренная положительная корреляционная связь между экспрессией TLR2 ($R=0,33$; $p<0,05$) и наличием болевого синдрома, между экспрессией TLR4 и увеличением паховых лимфатических узлов ($R=0,31$; $p<0,05$), а также между экспрессией TLR3 и TLR8 и лихорадкой ($R=0,23$; $p<0,05$ и $R=0,26$; $p<0,05$ соответственно) (табл. 5).

Таким образом, особенности клинической картины при ГГ в большей степени коррелируют с экспрессией TLRs, лигандами которых являются бактериальные антигены.

Таблица 2. Корреляция между TRIF, TLRs и IRAK4

Название	Критерий Спирмена
TLR2/TRIF	0,2
TLR3/TRIF	0,37*
TLR4/TRIF	0,14
TLR7/TRIF	0,15
TLR8/TRIF	0,14
TLR9/TRIF	0,25*
IRAK4/TRIF	0,24*

Примечание. Здесь и в табл. 3–5: * — $p<0,05$.

Таблица 3. Корреляция между экспрессией TLRs

Название	Критерий Спирмена
TLR2/TLR3	0,54*
TLR2/TLR4	0,35*
TLR2/TLR7	0,37*
TLR2/TLR8	0,33*
TLR2/TLR9	0,17
TLR3/TLR4	0,20
TLR3/TLR7	0,55*
TLR3/TLR8	0,37*
TLR3/TLR9	0,35*
TLR4/TLR7	0,23*
TLR4/TLR8	0,22
TLR4/TLR9	0,22*
TLR7/TLR8	0,31*
TLR7/TLR9	0,49*
TLR8/TLR9	0,31*

Таблица 4. Корреляция между экспрессией TLRs и IRAK4

Название	Критерий Спирмена
TLR2/IRAK4	0,08
TLR3/IRAK4	0,16
TLR4/IRAK4	-0,0005
TLR7/IRAK4	0,22*
TLR9/IRAK4	0,26*
TLR8/IRAK4	-0,05

Таблица 5. Корреляция между экспрессией TLRs и клиническими проявлениями ГГ

TLRs	Болевой синдром	Паховая лимфоаденопатия	Лихорадка	Количество везикул
TLR2	0,33*	-0,09	0,18	0,08
TLR3	0,08	0,1	0,23*	-0,04
TLR4	0,09	0,31*	0,01	-0,04
TLR7	0,06	-0,004	0,05	0,12
TLR8	0,15	0,13	0,26*	-0,05
TLR9	0,19	0,004	0,16	0,08

Также обнаружена сильная положительная корреляционная связь между наличием у женщин в анамнезе хламидийной инфекции и количеством обострений ГГ ($R=0,74$; $p<0,05$). В исследовании S. DeKa [4] установлено, что наличие HSV-2, возможно, обеспечивает длительную персистенцию хламидийной инфекции. В частности, под влиянием HSV-2 происходит накопление хламидийного белка теплового шока HSP60-1, обладающего иммуносупрессивными свойствами. Таким образом, наличие в анамнезе хламидийной инфекции, возможно, является фактором, усугубляющим течение ГГ.

ВЫВОДЫ

1. В нашем исследовании в группе пациенток с редко рецидивирующей формой ГГ выявлено снижение экспрессии TLR7 и IRAK4. Обнаружено снижение экспрессии TLR3 при сравнении пациенток с часто и редко рецидивирующей формой ГГ. Это свидетельствует о том, что снижение экспрессии сиг-

нальных рецепторов, ответственных за распознавание вируса, способствует увеличению частоты рецидивов ГГ.

2. Особенности клинической картины при ГГ в большей степени коррелируют с экспрессией TLRs, лигандами которых являются бактериальные антигены. Так, наблюдается умеренно положительная корреляционная связь между экспрессией TLR2 и наличием болевого синдрома, между экспрессией TLR4 и увеличением паховых лимфатических узлов, между экспрессией TLR3 и TLR8 и лихорадкой.

3. Обнаружена сильная положительная корреляционная связь между наличием у женщин в анамнезе хламидийной инфекции и количеством обострений ГГ. Возможно, наличие в анамнезе хламидийной инфекции является фактором, усугубляющим течение ГГ.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований №12-04-32165.

ЛИТЕРАТУРА

1. Губанова Е.И. Результаты анонимного анкетирования больных рецидивирующим генитальным герпесом. Актуал впр дерматол и венерол 2000; 2: 126.
2. Akira S. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol 2001; 2: 675–680.
3. Boonstra A. Dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals and TLR-independent signals. J Immunol 2006; 177: 7551–7558.
4. DeKa S. An early event in the herpes simplex virus type-2 replication cycle is sufficient to induce Chlamydia trachomatis persistence. Cell Microbiol 2007; 9: 725–737.
5. Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections: 2006–2015. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. Available at: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241563475/en/> (accessed 24 December 2013).
6. Hayashi K. Herpes simplex virus (HSV) and cytomegalovirus induce Toll-like receptor mRNA in corneal and conjunctival cells. Invest Ophthalmol Viss Sci 2005; 46: 1037.
7. Kozaburo H. Herpes simplex virus 1 DNA and immune complex (HSV-1-human IgG) elicit vigorous interleukin 6 release from infected corneal cells via Toll-like receptors. J Gen Virol 2006; 87: 2161–2169.
8. Reynolds S. Recent herpes simplex virus type 2 infections and the risk of human immunodeficiency virus type 1 acquisition in India. J Infect Dis 2003; 187: 1513–1521.
9. Rhoda L. Genital herpes: review of the epidemic and potential use of type-specific serology. Clin Microbiol 1999; 12: 1–8.
10. Sexually transmitted infections. Fact sheet N°110 of World Health Organization 2013. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/index.html> (accessed 06 January 2014).
11. Yang C.A. Association of TLR3-hyporesponsiveness and functional TLR3 L412F polymorphism with recurrent herpes labialis. Hum Immunol 2012; 73: 844–851.
12. Yang K. Human TLR 7-, 8- and 9-mediated induction of IFN-alpha/beta and lambda is IRAK-4-dependent and redundant for protective immunity to viruses. Immunity 2005; 23: 465–478.