

Роль TLR9 для изучения эффективности использования противовирусной терапии при хронической Эпштейна-Барр вирусной инфекции в стадии репликативной активности

С.А. Зубченко*

кафедра клинической иммунологии и аллергологии
Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, г. Львов, Украина

*Corresponding author. E-mail: svitlana_zu@meta.ua

Paper received 15.06.15; Accepted for publication 26.06.15.

Аннотация. Tool-like рецепторы (TLRs) экспрессируются на многих клетках организма, в т.ч. иммунокомпетентных и осуществляют относительно специфическое распознавание чужеродных молекулярных структур микроорганизмов. Проанализированы результаты экспрессии TLR9 на моноцитах и лимфоцитах у 40 больных с хронической Эпштейна-Барр вирусной инфекцией в стадии репликативной активности до/после месячного курса лечения Гропринозином и в процессе наблюдения через три месяца. Определено, что до лечения экспрессия TLR9 на лимфоцитах была в 2,4 раза больше, чем на моноцитах. После месячного курса лечения Гропринозином уровень экспрессии TLR9 на моноцитах увеличился, а на лимфоцитах – уменьшился, что коррелировало с регрессией клинических проявлений инфекции. Рекомендуется уровень экспрессии TLR9 на иммунокомпетентных клетках, использовать как маркер мониторинга эффективности противовирусного действия иммуноотропных препаратов, в частности Гропринозина.

Ключевые слова: Tool-like рецепторы, Эпштейна-Барр вирусная инфекция, иммунокомпетентные клетки, иммуноотропные препараты

Введение. Иммунную систему человеческого организма можно охарактеризовать как систему, которая контролирует генетически детерминированный гомеостаз клеточного и гуморального состава. Взаимодействие клеточных и гуморальных компонентов врожденных и адаптивных звеньев иммунной системы обеспечивают эффективность иммунного ответа, в частности, элиминацию инфекционных агентов – носителей чужеродной генетической информации.

Краткий обзор публикаций по теме. На протяжении последних десятилетий значительное количество исследований было посвящено изучению механизмов адаптивного звена иммунной системы. Следовательно, недостаточно уделялось внимания и до последнего времени практически ничего не было известно о механизмах распознавания чужеродного антигена клетками врожденного иммунитета. Значительным достижением стало открытие рецепторов на клетках врожденного иммунитета, так называемых Toll-подобных рецепторов (TLR). В отличие от высоко специфического распознавания патогена Т- и В-клеточными рецепторами, TLR осуществляют относительно специфическое распознавание чужеродных молекулярных структур микроорганизмов, так называемых патоген-ассоциированных участков или паттерн-участков (PAMP – pathogen-associated molecular patterns) [2, 4-6].

На сегодня известно 13 TLRs, включая человека (TLR1 – TLR10), они обнаружены также и в растений. Для этих рецепторов характерна очень низкая плотность экспрессии по сравнению с другими мембрано-связующими белками. Еще одной характерной особенностью онтогенетической экспрессии TLRs является постепенное увеличение плотности рецепторов на мембране клетки в течение интра- и постнатального развития индивидуума [14-15]. Уровень экспрессии TLRs у взрослого человека также не является величиной постоянной. Следовательно, активность экспрессии быстро увеличивается в ответ на воздействие PAMP инфекционных агентов и уменьшается при отсутствии специфических лигандов. TLRs экспрессируются как внутриклеточно, так и на внешних мембранах на многих клетках человеческого организма, в т.ч. имму-

нокомпетентных. На сегодняшний день встречаются сообщения, что дифференцированное взаимодействие и избыточная экспрессия TLRs, вызванная вирусами, может повлиять на чувствительность организма к патогенам, течение инфекций и формирование осложнений [16]. Значительную роль в восприятии вирусных нуклеиновых кислот играют такие члены суперсемьи TLRs, как TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 [9, 10]. Следствием их активности является индукция IFN-генов, ответственных за синтез интерферонов первого типа (IFN- α , - β) с мощным противовирусным действием, а в дальнейшем – модуляторов адаптивного иммунного ответа. Однако, некоторые группы вирусов формируют несколько стратегий противодействия интерфероновой системе. Примером таких вирусов есть вирус Эпштейна-Барр (EBV). Особенности EBV являются его полиорганный тропизм и пожизненная персистенция в человеческом организме, которая обеспечивается эволюционными механизмами избегания иммунной атаки. Одним из этих механизмов является подавление реализации эффекторных функций клеток (например, подавление экспрессии цитокинов), что возможно связано с влиянием на TLRs [1, 12].

По литературным данным известно, что EBV модулирует экспрессию TLR7 благодаря способности встраиваться в геном клетки хозяина и использовать вариант слайсинга с транскриптами IRF5 (interferon regulation factor 5), выполняя роль доминанта регуляции синтеза интерферонов. Поэтому EBV сначала использует TLR7 для усиления пролиферации В-лимфоцитов, а затем подавляет его активность для сохранения латентной формы. Другим представителем семейства TLRs, реагирующий на метилированный CpG паттерн ДНК EBV является TLR9 [8, 11]. Доказано, что TLR9 в большей степени находится в клетках лимфатических узлов, селезенке, пейеровых бляшках кишечника, эндотелиоцитах сосудов, синусов печени и легких, а также в эндосомах EBV-тропных иммунокомпетентных клеток крови (В-лимфоциты, моноциты/макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, базофилы и др.). EBV стимулирует экспрессию TLR9 на указанных клетках с последующим синтезом провоспалительных цитокинов, в част-

ности TNF- α , INF- α , IL-6 и формированием воспалительной реакции [18]. Причем, скорость TLR9-опосредованных клеточных реакций зависит от вида клеток, на которых активируются данные рецепторы. Например, в В-лимфоцитах протеолиз проходит с большей скоростью. В этих случаях активированные вирусом TLR9 стимулируют MyD88-зависимый сигнальный путь запуска воспалительного ответа и усиление апоптоза клетки [7]. Согласно последним данным, установлено, что TLR9 модулируют еще один уникальный сигнальный путь (MyD88-независимый, PI3K/Akt-зависимый) через AMP-активированную киназу [8]. В условиях включения PI3K/Akt-зависимого сигнального пути наблюдается уменьшение воспалительного процесса в тканях соответствующих органов, усиление энергетического метаболизма, увеличение стрессоустойчивости к гипоксии, угнетение апоптоза [19]. Можно предположить, что именно этот механизм дополняет ряд известных факторов, которые «использует» EBV для уклонения от воздействия факторов иммунной системы и индукции состояния латенции. Сегодня также установлена связь EBV и TLR9 относительно инициации ряда аутоиммунных и онкологических нарушений. Доказана роль EBV при ревматических заболеваниях, системной красной волчанке (СКВ), васкулитах, неспецифическом язвенном колите и др. [13]. В свою очередь, активация экспрессии TLR9 на эндотелиоцитах под влиянием DAMPs (damage-associated molecular patterns), образующихся вследствие любого повреждения ткани (ишемия, ожог, травма и т.д.), способствует пролиферации В-лимфоцитов, синтеза ими аутоантител с последующим формированием аутоиммунной органоспецифической (например, аутоиммунный гепатит) и системной (СКВ, васкулиты) патологий [11]. Сегодня достоверно доведена этиологическая роль EBV в возникновении ряда злокачественных образований лимфоидного и эпителиального происхождения. Что касается TLR9, описаны коррелятивные связи гиперэкспрессии этого рецептора с карциномой простаты и карциномой носоглотки. Анализ биологического материала больных раком шейки матки показал наличие полиморфизма гена, который кодирует TLR9, что исследователями трактовалось как фактор риска указанной патологии [3].

Таким образом, исследования TLR-зависимого вирусного распознавания, в частности связанного с TLR9, актуальны в плане возможного влияния на механизмы регуляции иммунного ответа при EBV-инфекции, а также в оценке эффективности применения современных противовирусных препаратов и т.д. В последнее время отмечается повышенный интерес врачей к иммунотропным препаратам, одним из которых является Гропринозин. Доведено, что этот препарат угнетает репликацию ДНК и РНК вирусов, активизирует пролиферацию Т-лимфоцитов, Т-хелперов, NK-клеток, стимулирует биохимические процессы в моноцитах/макрофагах и полинуклеарных клетках, усиливает хемотаксис и фагоцитарную активность этих клеток, повышает продукцию интерферонов, синтез антител и т.д.

Цель. Определение уровней экспрессии TLR9 на иммунокомпетентных клетках пациентов с хронической EBV-инфекцией в стадии репликативной активности вируса на фоне противовирусной терапии.

Материалы и методы. Под нашим наблюдением пребывало 40 пациентов в возрасте от 18 до 74 лет, которым на основании данных анамнеза, результатов клинического, инструментального и лабораторного обследования, в том числе иммунологического, был установлен диагноз хронической EBV-инфекции в стадии репликации. Все исследования больным проводились до и после лечения Гропринозином. Наличие у больных репликативной активности EBV было подтверждено на основании выявления специфических антител классов IgM и IgG к VCA-EBV-антигенам, высоких титров антител класса IgG к EBNA-EBV-антигенам на фоне выявления ДНК вируса в биологических средах. Идентификация специфических антител проводилась с использованием метода непрямого двухступенчатого хемилуминесцентного анализа (CLIA) на тест-системах «Dia Sorin» с использованием анализатора «Liaison». ДНК EBV в слюне, соскобах слизистой оболочки задней стенки глотки и в крови определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на диагностикумах «Ampli Sens» (Россия) с использованием «Rotor Gen 6000» (Corbett Research, Австралия). Исследование TLR9 проводили на основании выявления CD123⁺ на лейкоцитах периферической крови методом проточной цитофлуориметрии с использованием тест-систем фирмы «Becton Dickenson» (США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Statistika for Windows 6.0», используя критерий Стьюдента.

Гропринозин (ТОВ «Гедеон Рихтер Польша» назначали всем больным из расчета 500 мг/10кг массы тела на протяжении одного месяца.

Результаты и их обсуждение. На основании клинико-лабораторных обследований у больных идентифицированы следующие синдромы: длительный субфебрилитет – у 65,0% человек, инфекционный приобретенный/вторичный иммунодефицит – у 62,5%, длительная лимфаденопатия – у 52,5%, часто рецидивирующий хронический тонзиллит – у 32,5%, гипер-IgE синдром – у 30,0% человек. У всех больных обнаружен общий интоксикационный синдром и синдром повышенной утомляемости. В крови больных выявлен повышенный в 5-10 раз уровень IgG VCA-EBV и выше, чем в 10 раз IgG EBNA-EBV. На основании перечисленных результатов клинико-лабораторных обследований у больных исследуемой группы верифицирован диагноз хронической персистенции EBV в стадии репликативной активности вируса.

После проведения одномесячного курса лечения Гропринозином при повторном обследовании у 24 (60,0%) больных репликация EBV не выявлена (ДНК «-» слизистая и слюна). Отметим, что в начале лечения у этих пациентов ДНК EBV определяли: у 10 (41,6%) человек – в слизистых оболочках, у 6-ти (25,0%) – в слюне и в 8-ми (33,4%) человек – в обеих средах (слизистые + слюна). После лечения у 19 (79,2%) больных отмечалась полная регрессия проявлений EBV-инфекции. У пяти человек осталась повышенная утомляемость, лимфаденопатия, повышенный уровень общего IgE, жалобы на периодическую боль и першение в горле.

В группе наблюдения провели исследование экспрессии TLR9 на моноцитах и лимфоцитах до и после курса приёма Гропринозина на протяжении одного месяца (таблица 1).

Таблица 1. Активность экспрессии TLR9+ CD123+ на моноцитах и лимфоцитах до и после лечения больных на протяжении одного месяца (M±m), n=24

Показатели	До лечения	После лечения	Через 3 месяца	p1-2	p1-3	p2-3
	1	2	3			
TLR9+ CD123+mon, %	0,78±0,04	1,08±0,08	0,8±0,04	<0,05	<0,05	<0,05
TLR9+ CD123+limp, %	1,88±0,09	1,05±0,07	0,69±0,08	<0,05	<0,01	<0,05

Примечание: p<0,05 – вероятность разницы показателей больных до/после лечения и в динамике наблюдения

У больных до лечения, экспрессия TLR9 на лимфоцитах была в 2,4 раза больше, чем на моноцитах (p<0,01). После окончания одномесечного курса приема Гропринозина экспрессия TLR9 на моноцитах увеличилась в 1,4 раза (p<0,05), что указывает на активацию этих клеток. В процессе наблюдения через три месяца число TLR9+ моноцитов уменьшилось в 1,35 раза и стало

большим (0,8±0,04%), чем соответствующих лимфоцитов (0,69±0,08%). Относительно лимфоцитов – наблюдалось постепенное уменьшение количества клеток с экспрессирующимися на них TLR9, как сразу после лечения (1,05±0,07%), так и в последующие три месяца в процессе наблюдения (0,69±0,08%) (p<0,05) (рис. 1, 2).

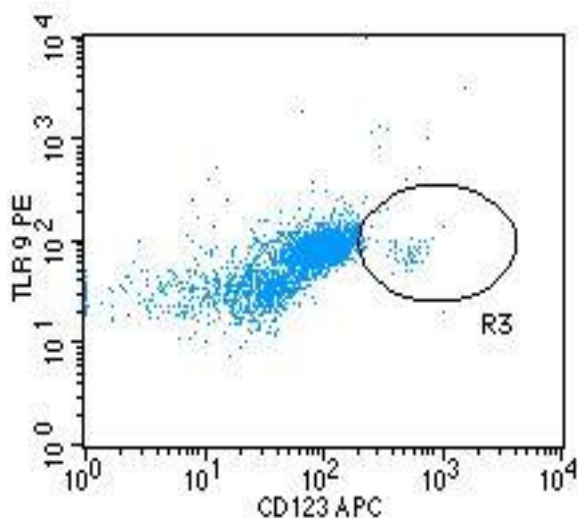


Рис. 1. Количество TLR9⁺-лимфоцитов у пациентов до приема Гропринозина

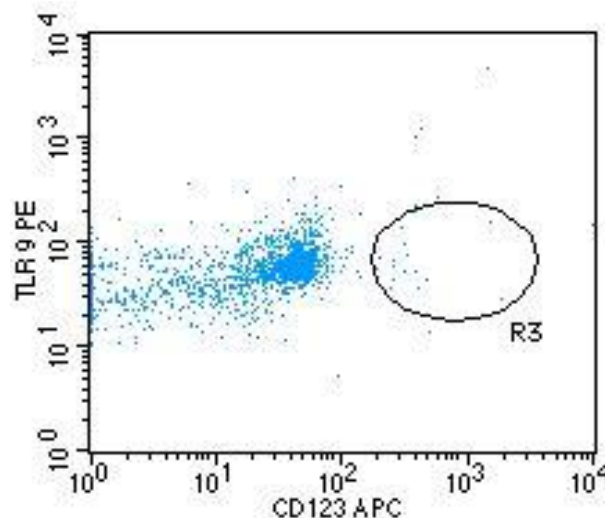


Рис. 2. Количество TLR9⁺-лимфоцитов у пациентов после приема Гропринозина

Проведен индивидуальный анализ экспрессии TLR9 на лимфоцитах и моноцитах больных до и после лечения Гропринозином. До лечения экспрессия TLR9 была обнаружена в среднем на 0,22±0,04% моноцитах у 15 (62,5 %) больных, а после - почти у всех больных число TLR9⁺-моноцитов увеличилось в 2,5 раза и составило в среднем 0,54±0,03% (p<0,05). У 9 (37,5%) больных экспрессия TLR9 была обнаружена на большем количестве моноцитов (1,42±0,02%). После лечения их экспрессия также усилилась, а число TLR9⁺-моноцитов составляло 2,19±0,05% (p<0,05).

Таким образом, мы наблюдали, что на фоне четкой регрессии клинических проявлений EBV-инфекции и отсутствия репликативной активности вируса на моноцитах интенсивность экспрессии TLR9 увеличивалась, а на лимфоцитах – уменьшалась. Увеличение числа TLR9⁺-моноцитов вероятнее всего указывает на более выраженное вовлечение в инфекционный процесс антигенпрезентирующих клеток. Увеличение в 37,5% больных числа TLR9⁺-лимфоцитов возможно касается только EBV-инфицированных клеток, кото-

рые с помощью экспрессии этих рецепторов информируют другие клетки о своем статусе в качестве вирус инфицированных клеток. Полученные данные указывают на необходимость проведения дальнейших исследований в этом направлении.

Выводы

1. У больных с хронической персистенцией EBV в стадии вирусной репликации экспрессия TLR9 на лимфоцитах была в 2,4 раза больше, чем на моноцитах.
2. После месячного курса лечения Гропринозином уровень экспрессии TLR9 на моноцитах увеличивался, а на лимфоцитах - уменьшался, что коррелировало с регрессией клинических проявлений инфекции, что можно рассматривать как прогностически благоприятный критерий эффективности лечения.
3. Уровень экспрессии TLR9 на иммунокомпетентных клетках предложено использовать как маркер мониторинга эффективности противовирусного действия иммуноотропных препаратов, в частности Гропринозина.

REFERENCES

[1] Acquisition of adult-like TLR4 and TLR9 responses during the first year of life / M. Nguyen, E. Leuridan, T. Zhang [et al.] // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5(4). Article ID e10407.
 [2] Akira, S., Takeda, K. Toll-like receptors in innate immunity // Int. Immunol. – 2005. – Vol. 17, №1 – P. 1-14.
 [3] Akira, S., Takeda, K. Toll-like receptor signaling // Nat. Rev. Immunol. – 2004. – Vol. 4(7). – P. 499-511.
 [4] Bonilla, F.A., Oettgen, H.C. Adaptive immunity // J. Allergy Clin. Immunol. – 2010. – Vol. 125(2), Suppl. 2. – P. 33-40.

- [5] Cell-specific TLR9 trafficking in primary APCs of transgenic TLR9-GFP mice / A.M. Avalos, O. Kirak, J.M. Oelkers [et al.] // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 190(2) – P. 695-702.
- [6] CpG-ODN, the TLR9 agonist, attenuates myocardial ischemia/reperfusion involving activation of PI3K/Akt signaling / Z. Cao, D. Ren, Tuanzhu Ha [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2013. – Vol. 1832(1). – P. 96-104.
- [7] Drugs Targeting Toll-like Receptors / J. Krishnan, G. Lee, S. Choi [et al.] // *Arch. Pharm. Res. Commun.* – 2009. – Vol. 32(11). – P. 1485-1502.
- [8] Dunne A., O'Neill L.A. Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity // *FEBS Lett.* – 2005. – Vol. 579(15). – P. 3330-3335.
- [9] Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through toll-like receptor 9 in mice / H. Huang, J. Evankovich, W. Yan [et al.] // *Hepatology.* – 2011. – Vol. 54(3). – P. 999-1010.
- [10] Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: Toll-like receptors on fetal enterocytes / Robert D. Fusunyan, Nanda N. Nanthakumar, Manuel E. Baldeon, W. Allan Walker // *Pediatr Res.* – 2001. – Vol. 49(4). – P. 589-593.
- [11] Kawai, T., Akira, S. Innate immune recognition of viral infection // *Nat. Immunol.* – 2006. – Vol. 7(2). – P. 131-137.
- [12] Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors // *Nat. Immunol.* – 2010. – Vol. 11(5). – P. 373-384.
- [13] Kimura H. Differences between T cell-type and natural killer cell-type chronic active Epstein-Barr virus infection / H. Kimura, Y. Hjshino, S. Hara [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 191(4). – P. 513-539.
- [14] LPS induces translocation of TLR4 in amniotic epithelium / K.M. Adams, J. Lucas, R.P. Kapur, A.M. Stevens // *Placenta.* – 2007. – Vol. 28(5-6). – P. 477-481.
- [15] McGettrick, A.F., O'Neill, L.A. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation // *Curr. Opin. Immunol.* – 2010. – Vol. 22(1). – P. 20-27.
- [16] Medzhitov, R., Janeway, C. Innate immunity // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 343(5). – P. 338-344.
- [17] Soluble forms toll-like receptors (TLR2) capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk / Le Boudier, E., Rey-Nores J.E., Rushmer, N. [et al.] // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171(12). – P. 6680-6689.
- [18] Systemic inflammation and liver injury following hemorrhagic shock and peripheral tissue trauma involve functional TLR9 signaling on bone marrow-derived cells and paranchymae cells / R. Gill, X. Ruan, C. Menzel [et al.] // *Shock.* – 2011. – Vol. 35(2). – P. 164-170.
- [19] Zhu J., Mohan C. Toll-like receptor signaling pathways-therapeutic opportunities // *Mediators Inflamm.* – 2010. – Vol. 2010. – ID 781235.

TLR9 role in studying the efficiency of antiviral therapy application for chronic Epstein-Barr virus infection at replicative activity stage

Z.A. Zubchenko

Department of Clinical Immunology and Allergology of Lvov Danylo Halytsky National Medical University, Lvov, Ukraine

Abstract. Tool-like receptors (TLRs) are expressed on many body cells, including immunocompetent ones, and carry out relatively specific recognition of microorganisms alien molecular structures. The results of TLR9 expression on monocytes and lymphocytes in 40 patients having chronic Epstein-Barr virus infection at the stage of replicative activity before/ after one month's treatment using Groprinosin and during three months monitoring have been analyzed. It has been determined that TLR9 expression on lymphocytes before treatment was 2.4 times higher than on monocytes. After one month of treatment using Groprinosin TLR9 expression level increased on monocytes and decreased on lymphocytes, which correlated with regression of infection clinical manifestations. It is recommended to use the TLR9 expression level in the immune competent cells as a marker for monitoring the efficiency of antiviral action of immunotropic medications, and Groprinosin in particular.

Keywords: *Tool-like receptors, Epstein-Barr virus infection, immune competent cells, immunotropic medications*