

УДК 575.224.22

Полиморфизм генов *TNFA*, *TLR9* и папилломавирусная инфекция

Гарбузова О.А., Шульга А.А., Машкина Е.В.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

*344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, Академия биологии и биотехнологии
им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, lenmash@mail.ru*

DOI: 10.18522/2308-9709-2023-44-5

Аннотация

Однонуклеотидные замены в генах факторов иммунной системы могут изменять экспрессию или активность кодируемых белковых молекул и, таким образом, влиять на течение инфекционного процесса. Целью данного исследования был анализ возможной ассоциации полиморфизма $-308G>A$ (rs1800629) гена *TNFA*, полиморфизма $-1237T>C$ (rs5743836) гена *TLR9* с риском формирования высокой вирусной нагрузки при ВПЧ-инфекции. Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из эпителиальных клеток женщин, инфицированных вирусом папилломы человека (с клинически значимой вирусной нагрузкой) и женщин, не инфицированных ВПЧ. В исследуемых группах женщин взаимосвязи между клинически значимой концентрацией вируса папилломы человека и наличием полиморфизма $-308G>A$ в гене *TNFA* и $-1237T>C$ гена *TLR9* не обнаружено. Частота встречаемости анализируемых SNP среди инфицированных и неинфицированных ВПЧ женщин практически одинакова.

Ключевые слова: полиморфизм генов; вирус папилломы человека, *TLR9*; *TNFA*

Polymorphism of TNFa, TLR9 genes and human papillomavirus infection

Garbuzova O.A., Shulga A.A., Mashkina E.V.

Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia; lenmash@mail.ru

DOI: 10.18522/2308-9709-2023-44-5

Abstract

Single nucleotide substitutions in the genes of immune system factors can change the expression or activity of encoded protein molecules and, thus, affect the course of the infectious process. The aim of this study was to analyze the possible association of the -308G>A (rs1800629) polymorphism of the TNFa gene, the -1237T>C (rs5743836) polymorphism of the TLR9 gene with the risk of high viral load formation in HPV infection. The material for the study was DNA samples isolated from the epithelial cells of women infected with the human papillomavirus (with a clinically significant viral load) and HPV-negative women. No relationship was found between a clinically significant concentration of human papillomavirus and the presence of -308G>A polymorphism in the TNFa gene and -1237T>C in the TLR9 gene. The frequency of the analyzed SNPs among HPV-infected and uninfected women is almost the same.

Keywords: gene polymorphism; human papilloma virus, *TLR9*, *TNFa*

Введение

Заражение онкогенными типами вируса папилломы человека (ВПЧ) является фактором риска развития рака шейки матки. Вирусная патогенность зависит от многих факторов, включая генотип вируса, характер зараженной клетки (тропизм) и состояние иммунитета хозяина. Иммунный ответ на ВПЧ-инфекцию в эпителии шейки матки играет важную роль в патогенезе рака шейки матки.

Толл-подобные рецепторы (TLR) относятся к семейству рецепторов распознавания молекулярных меток. Активация TLR приводит к стимулированию врожденного и адаптивного иммунного ответа (Wall et al., 2019; Barut et al., 2020). TLR9 локализуются внутриклеточно и распознают неметилированные CpG последовательности ДНК, что может оказывать влияние на уровень вирусной нагрузки при ВПЧ-инфекции. Сигналы TLR9 приводят к активации транскрипционного фактора NF- κ B, который ответственен за запуск противовирусного ответа. В результате происходит инициация провоспалительных реакций с участием таких цитокинов, как интерферон типа I, IL-6, TNF, IFN α и IL-12 (Kalantari, 2010; Mirabello, 2012). Показано, что высокие уровни экспрессии TLR9 в слизистой оболочке шейки матки имеют решающее значение для элиминации вируса папилломы человека 16 типа (Daud et al., 2011). В то же время показано, что HPV16, подавляя иммунитет, опосредованно способствует снижению экспрессии TLR9 (Hasan et al., 2013).

Цитокины являются мощными медиаторами иммунитета, продуцируются макрофагами, фибробластами, а также эпителиальными клетками. Фактор некроза опухоли α (TNF- α) является одним из основных медиаторов воспаления в коже и слизистых оболочках (Kondo, 1997). TNF- α представляет собой провоспалительный цитокин, который активируется при проникновении инфекционного агента. В очаге воспаления он запускает сигнальный каскад

иммунного ответа, тем самым блокируя действие инфекционного агента.

Аллельная вариация гена *TNFA* связана с изменением ответной реакции иммунной системы на проникновение инфекции. А это, в свою очередь, может привести к развитию малигнизации зараженных патогенном клеткам.

Однонуклеотидные замены в генах *TLR* и *TNFA* могут изменять экспрессию или активность кодируемых белков и влиять на индивидуальные иммунные реакции человека.

Целью работы было изучить ассоциацию полиморфизма $-308G>A$ (rs1800629) гена *TNFA*, полиморфизма $-1237T>C$ (rs5743836) гена *TLR9* с риском формирования высокой вирусной нагрузки при ВПЧ-инфекции.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из эпителиальных клеток урогенитального тракта женщин. Среди них – 74 женщины, инфицированные ВПЧ (с вирусной нагрузкой более 4lg (ВПЧ на 100 тысяч клеток)) и 156 – с отсутствием вируса. Все женщины, включенные в исследование, были старше 30 лет. Все собранные образцы соскобов эпителиальных клеток из урогенитального тракта женщин были предоставлены клинико-диагностической лабораторией «Наука» (Ростов-на-Дону, Россия).

Тотальную ДНК выделяли согласно протоколу набора реагентов ДНК-сорб-АМ (НекстБио, Россия). Для количественной оценки ДНК ВПЧ высокого риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типы) в биологическом материале использовали тест-систему «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL».

(ИнтерЛабСервис, Россия). Выявление аллельных вариантов генов *TLR9* - $1237T>C$ (rs5743836), *TNFA* $-308G>A$ (rs1800629) проводили методом аллель-специфичной амплификации с использованием реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия).

Частоты аллелей и генотипов генов по исследуемым SNP в группах женщин сравнивали с помощью критерия χ^2 . Тест на соблюдение равновесия Харди-Вайнберга был проведен путем сравнения наблюдаемых частот генотипов с ожидаемыми частотами генотипов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Распределение частот генотипов по полиморфизму $-1237T>C$ гена *TLR9* в исследуемых группах женщин соответствует равновесию Харди-Вайнберга (табл. 1). Среди инфицированных ВПЧ женщин частота генотипа $-1237TT$ составляет 74,3 %, а среди неинфицированных женщин – 76,3 %. Частота гетерозигот по полиморфизму $-1237T>C$ гена *TLR9* в группе инфицированных женщин составляет 25,7 %, а в группе женщин без ВПЧ – 21,2 %.

Частота аллели $-1237C$ гена *TLR9* в обеих группах женщин составила 0,13, что соответствует данным проекта “1000 Genomes” для европеоидов.

Таблица 1 – Частоты генотипов (абс. %) и аллелей по полиморфизму $-1237T>C$ гена *TLR9* среди женщин инфицированных ВПЧ и с отсутствием вируса

| Генотип, аллель | Группа с высокой концентрацией ВПЧ | Группа с отсутствием ВПЧ | χ^2 | <i>p</i> |
|-------------------------|------------------------------------|--------------------------|----------|----------|
| | n = 74 | n = 156 | | |
| <i>T</i> | 0,87 | 0,87 | 0,001 | 0,93 |
| <i>C</i> | 0,13 | 0,13 | | |
| <i>T/T</i> | 55 (74,3 %) | 119 (76,3 %) | 2,38 | 0,3 |
| <i>T/C</i> | 19 (25,7 %) | 33 (21,2 %) | | |
| <i>C/C</i> | 0 | 4 (2,6 %) | | |
| <i>PXB</i> (χ^2) | 1,61 | 0,84 | | |

Примечание: *PXB* – равновесие Харди-Вайнберга

Таким образом, в ходе исследования мы не обнаружили статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей по полиморфизму $-1237T>C$ гена *TLR9* между двумя группами женщин.

Распределение частот генотипов и аллелей по полиморфизму $-308G>A$ гена *TNF-a* в группах обследуемых женщин соответствует равновесию Харди-Вайнберга (табл. 2). Частота встречаемости аллели *TNF* $-308G$ преобладает в обеих группах и соответствует данным проекта “1000 Genomes”. Среди инфицированных ВПЧ женщин частота генотипа $-308GG$ составляет 77 %, а среди неинфицированных женщин – 76,9 %. Частота гетерозигот по полиморфизму $-308G>A$ гена *TNF* в группе инфицированных женщин составляет 20,3 %, а в группе женщин без вируса – 22,4 %. Частота встречаемости генотипа $-308AA$ в обеих группах низкая: в контрольной группе – 0,6%, среди инфицированных ВПЧ женщин – 2,7 %. Статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей по полиморфизму $-308G>A$ гена *TNF-a* между двумя группами женщин не выявлено.

Таблица 2 – Частоты генотипов (абс. %) и аллелей по полиморфизму $-308G>A$ гена *TNF* среди женщин инфицированных ВПЧ и с отсутствием вируса

| Генотип, аллель | Группа с высокой концентрацией ВПЧ | Группа с отсутствием ВПЧ | χ^2 | <i>p</i> |
|--------------------|---------------------------------------|-----------------------------|----------|----------|
| | n = 74 | n = 156 | | |
| <i>G</i> | 0,87 | 0,88 | 0,09 | 0,76 |
| <i>A</i> | 0,13 | 0,12 | | |
| <i>G/G</i> | 57 (77,0 %) | 120 (76,9 %) | 1,74 | 0,42 |
| <i>G/A</i> | 15 (20,3 %) | 35 (22,4 %) | | |
| <i>A/A</i> | 2 (2,7 %) | 1 (0,06 %) | | |

| | | | | |
|-------------------------|------|------|--|--|
| <i>PXB</i> (χ^2) | 0,66 | 0,84 | | |
|-------------------------|------|------|--|--|

Примечание: *PXB* – равновесие Харди-Вайнберга

Инфицирование эпителиальных клеток вирусом папилломы человека и длительная персистенция вируса создают условия для развития хронического воспалительного процесса. Особенности экспрессии факторов иммунной системы могут определять интенсивность и длительность воспалительных реакций, что изменяет вероятность элиминации инфекционного агента. Показано, что длительность персистенции вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска была выше у носителей мутантных аллелей *TLR9* rs187084 и rs352140, особенно при заражении несколькими типами ВПЧ одновременно (Zhang et al., 2023).

TLR играют активную роль в канцерогенезе и прогрессировании опухоли во время хронического воспаления. В ряде исследований показана аномально повышенная экспрессия TLR в эпителиальных клетках, подвергающихся канцерогенным изменениям во время хронического воспаления (Rakoff-Nahoum, 2009). TLR9 способствует регрессии опухоли, индуцируя цитотоксический Т-клеточный ответ, уменьшая количество супрессорных клеток-миелоидов, связанных с опухолями макрофагов и регуляторных Т-клеток. Однако он может также способствовать прогрессированию опухоли и инвазивности тканей шейки матки (Fehri, 2016; Yang, 2017). Полиморфизм $-1237T>C$ гена *TLR9* (rs5743836), расположенный в промоторной области, создает сайт связывания для NF- κ B, что приводит к увеличению транскрипции данного гена (Ng, 2010). Неадекватная экспрессия TLR9 во время хронического воспаления может способствовать активации транскрипционных факторов, вызывающих проканцерогенную активность.

Данные литературы об ассоциации полиморфизма $-1237T>C$ гена *TLR9* с прогрессированием ВПЧ-инфекции противоречивы. По результатам исследования Oliveira L.V с коллегами (2013) не было обнаружено связи между полиморфизмом $-1237T>C$ гена *TLR9* и ВПЧ-инфекцией. В популяции мексиканских женщин полиморфизм $1486T>C$ гена *TLR9* был ассоциирован с прогрессированием инфекции, а полиморфизм $-1237T>C$ и $2848G>A$ – нет (Martínez-Campos C. et al., 2017). По результатам исследования Lai Z.Z и его соавторов (2013) в группах китайских женщин связь с повышенным риском канцерогенеза при наличии ВПЧ 16 типа была обнаружена для полиморфизма $2848G>A$, а для $1486 T>C$ ассоциации не было выявлено.

TNF- α , секретируемый активированными макрофагами, является плейотропным цитокином, который играет важную роль в иммунных реакциях и воспалении. TNF- α участвует в защите от ВПЧ-инфекции, модулируя репликацию вируса (zur Hausen, 2000). Замена $-308G>A$ *TNF α* вызывает повышение уровня транскрипции гена, что ассоциировано со многими комплексными заболеваниями (Fang et al., 2010; Shen et al., 2011). TNF- α играет ключевую роль в ангиогенезе, способствуя стимулированию пролиферации эндотелиальных клеток как прямо, так и косвенно путем усиления экспрессии проангиогенных факторов (Cereda et al., 2012). Кроме того, ФНО- α индуцирует экспрессию молекул адгезии, что облегчает инвазию метастатических опухолевых клеток (Champ et al., 2012).

По результатам некоторых исследований обнаружена связь между SNP - $308G>A$ гена *TNF α* и риском развития рака шейки матки без учета инфицирования ВПЧ. Было показано, что генотип $-308A/A$ связан со значительным увеличением риска развития рака шейки матки (Li Liu, 2012). С другой стороны, по результатам исследования Wang N и соав. (2012) было показано, что не существует связи между полиморфизмом $-308G>A$ (rs1800629)

гена *TNF α* и риском развития рака шейки матки у женщин с ВПЧ-инфекцией и без ВПЧ-инфекции.

Заключение

В исследуемых группах женщин взаимосвязи между клинически значимой концентрацией вируса папилломы человека и наличием полиморфизма *-308G>A* в гене *TNF α* и *-1237T>C* гена *TLR9* не обнаружено. Частота встречаемости анализируемых SNP среди инфицированных и неинфицированных ВПЧ женщин практически одинакова.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018

Литература (References)

1. Barut GT, Lischer HEL, Bruggmann R, Summerfeld A, Talker SC. Transcriptomic profiling of bovine blood dendritic cells and monocytes following TLR stimulation // *Eur J Immunol*. 2020. V.-50(11). P. 1691–1711.
2. Cereda C, Gagliardi S, Cova E, Diamanti L, et al. The Role of TNF-Alpha in ALS: New Hypotheses for Future Therapeutic Approaches, Amyotrophic Lateral Sclerosis. InTech (Martin H.Maurer, ed.). 2012. P. 413-436.
3. Champ CE, Volek JS, Siglin J, Jin L, et al. Weight gain, metabolic syndrome, and breast cancer recurrence: are dietary recommendations supported by the data // *Int. J. Breast Cancer*. 2012: 506868.
4. Daud II, Scott ME, Ma Y, Shiboski S, Farhat S. & Moscicki AB. Association between Toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence // *Int J Cancer*. 2011. Vol. 128. P. 879–886.

5. Fang F, Yao L, Yu XJ, Yu L, et al. TNF alpha -308 G/A polymorphism is associated with breast cancer risk: a meta-analysis involving 10,184 cases and 12,911 controls // *Breast Cancer Res. Treat.* 2010. 122: 267-271.
6. Fehri E, Ennaifer E, Bel Haj Rhouma R, Guizani-Tabbane L, Guizani I, Boubaker S. The role of Toll-like receptor 9 in gynecologic cancer // *Curr Res Transl Med.* 2016. Vol. 64(3). P. 155-159.
7. Hasan UA, Zannetti C, Parroche P, Goutagny N, Malfroy M, Roblot G, et al. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter // *J Exp Med.* 2013. 210(7). 1369–87.
8. Kalantari M, Chase DM, Tewari KS, Bernard HU. Recombination of human papillomavirus-16 and host DNA in exfoliated cervical cells: a pilot study of L1 gene methylation and chromosomal integration as biomarkers of carcinogenic progression // *J. Med. Virol.* 2010. V. 82. P. 311–320.
9. Kondo S, Sauder DN. Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF- α -induced skin inflammation // *Eur. J. Immunol.* 1997. 27: 1713–18.
10. Lai ZZ, Ni-Zhang, Pan XL, Song L. Toll-like receptor 9 (TLR9) gene polymorphisms associated with increased susceptibility of human papillomavirus-16 infection in patients with cervical cancer // *J Int Med Res.* 2013. V. 41(4). P. 1027-1036.
11. Martínez-Campos C, Bahena-Román M, Torres-Poveda K, Burguete-García AI, Madrid-Marina V. TLR9 gene polymorphism -1486T/C (rs187084) is associated with uterine cervical neoplasm in Mexican female population // *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017. V. 143(12). P. 2437-2445.
12. Mirabello L, Sun C, Ghosh A, Rodriguez AC, Schiffman M, Wentzensen N, Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, Lorincz A, Burk RD. Methylation of

- human papillomavirus type 16 genome and risk of cervical precancer in a Costa Rican population // *J. Natl. Cancer Inst.* 2012. V. 104. P. 556–565.
13. Ng MT, Van't Hof R, Crockett JC, Hope ME., Berry S, Thomson J, McLean MH, McColl KE, El-Omar EM, Hold GL. Increase in NF- κ B binding affinity of the variant C allele of the Toll-like receptor 9 - 1237T/C polymorphism is associated with *Helicobacter pylori*-induced gastric disease // *Infect Immun.* 2010. V. 78. – P. 1345–52.
14. Oliveira LB, Louvanto K, Ramanakumar AV, Franco EL, Villa LL, Ludwig–McGill Cohort Study. Polymorphism in the promoter region of the Toll-like receptor 9 gene and cervical human papillomavirus infection // *J Gen Virol.* 2013. V. 94. P. 1858-1864.
15. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer // *Nat Rev Cancer.* 2009. V. 9 (1). P. 57-63.
16. Shen C, Sun H, Sun D, Xu L, et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and breast cancer risk: a metaanalysis // *Breast Cancer Res Treat.* 2011. 126: 763-770.
17. Wall AA, Condon ND, Luo L, Stow JL. Rab8a localisation and activation by Toll-like receptors on macrophage macropinosomes // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2019. V. 374(1765). 20180151.
18. Wang N, Yin D, Zhang S, Wei H, Wang S, Zhang Y, Lu Y, Dai S, Li W, Zhang Q, Zhang Y. TNF-alpha rs1800629 polymorphism is not associated with HPV infection or cervical cancer in the Chinese population // *PLoS One.* 2012. V. 7(9).-e45246.
19. Yang X, Cheng Y, Li C. The role of TLRs in cervical cancer with HPV infection: a review // *Signal Transduct Target Ther.* 2017. V. 2. P. 17055.

20. Zhang C, Yang Z, Luo P, Li T, Wang S, Sun F, Gong P, Mei B. Association of TLR4 and TLR9 gene polymorphisms with cervical HR-HPV infection status in Chinese Han population // BMC Infect Dis. 2023. V. 23(1). P. 152.
21. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis // J Natl Cancer Inst. 2000. V. 92. P. 690–698.