

# ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА CD14 НА ТЕЧЕНИЕ И ИСХОД НОЗОКОМИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ

Байгозина Е.А.<sup>1</sup>, Совалкин В.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Областная клиническая больница, г. Омск

<sup>2</sup>Омская государственная медицинская академия, г. Омск

**Резюме.** Частоты генотипов полиморфизма -260(C→T) гена CD14 в контрольной группе и группе больных с нозокомиальной пневмонией (НП) находятся в равновесии Харди–Вайнберга. При сравнении частот генотипов полиморфизма гена CD14 между контрольной группой и больными было выявлено статистически значимое повышение частоты генотипа T/T у больных с НП (33,33%) по сравнению с контрольной группой (18,09%) ( $p = 0,008$ ). Обращают на себя внимание различия в тяжести течения НП у пациентов с генотипами C/C, C/T и T/T: в первом случае оценка тяжести пневмонии по шкале CPIS составила  $7,81 \pm 1,32$  балла, во втором –  $8,93 \pm 1,48$  балла ( $p < 0,05$ ). В нашем исследовании прослеживается позитивная корреляция между временем разрешения НП с генотипом гена CD14: наличие генотипа T/T ассоциировалось с затяжным, осложненным течением пневмонии и необходимостью пролонгированной респираторной поддержки в случае НП, связанной с искусственной вентиляцией легких (НПивл), по сравнению с течением пневмонии у больных с генотипами C/C и C/T ( $r = 0,70$ ;  $p = 0,01$ ). Выявлено, что у пациентов с генотипом T/T гена регуляторной молекулы CD14 имела место гиперцитокинемия за счет цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-1RN, что подчеркивает ключевую роль полиморфизма гена CD14 в иммунопатогенезе НП.

*Ключевые слова:* полиморфизм, ген, CD14, нозокомиальная пневмония.

*Baygozina E.A., Sovalkin V.I.*

## INFLUENCE OF CD14 GENE POLYMORPHISM ON CLINICAL COURSE AND OUTCOME OF NOSOCOMIAL PNEUMONIA

**Abstract.** Genotypes CD14 gene genotypes frequencies of in control group and in group of patients with nosocomial pneumonia (NP) correspond to Hardy-Weinberg law. We revealed a statistically significant increase of genotype T/T frequency in the patients with NP (33.33%) in contrast to control group (18.09%) ( $p = 0.008$ ). Notable is a difference in severity of NP cours in the patients with C/C, C/T and T/T genotypes. In first case, the score of disease severity, using CPIS scale, was  $7.81 \pm 1.32$ , whereas in second case it was  $8.93 \pm 1.48$  ( $p < 0.05$ ). A positive correlation was found between resolution time of NP and CD14 genotype, i.e. T/T genotype was associated with prolonged respiratory support in NP with mecanical ventilation, as compared with NP cases in the patlents with C/C and C/T genotypes ( $r = 0.70$ ;  $p = 0.01$ ). It was shown that the patients with CD14 T/T genotype exhibited hypercytokinemia due to TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-1RN, thus pointing to a key role of CD14 gene polymorphism in immune pathogenesis of NP. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 1-2, pp 95-102)

*Keywords:* polymorphism, gene, CD14, nosocomial pneumonia.

## Введение

НП остается серьезной проблемой в современных многопрофильных стационарах, составляя от 20 до 50% от общего количества госпитальных

осложнений. Как известно, уровни иммунной реактивности закреплены генетически, следовательно, определяющее значение в предрасположенности к НП имеет полиморфизм гена, кодирующего экспрессию регуляторной молекулы воспаления CD14 как паттерн-распознающего рецептора. Целью настоящего исследования является характеристика клинических и иммунологических особенностей возникновения,

### Адрес для переписки:

644123, г. Омск, ул. Крупской, 25, корп. 1.

Тел.: (3812) 70-01-35.

E-mail: pulmonology55@mail.ru

течения и исхода нозокомиальной пневмонии с учетом полиморфизма единичных нуклеотидов гена паттерн-распознающего рецептора CD14.

## Материалы и методы

Детекцию полиморфизма C(-260)→T проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим расщеплением ПЦР-продукта рестриктазой HaeIII. Структура праймеров: прямой – 5'-TTGGT-GCCAA-CAGAT-GAGGT-TCAC-3', обратный – 5'-TTCTT-TCCTA-CACAG-GGGCA-CCC-3'. Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала: 100 нг ДНК, 1xPCR буфер (75 мМ Трис-НСl (рН 9,0), 20 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01% Tween 20), 0,2 моль/л каждого праймера, 0,2 ммоль/л каждого dNTP, 1,5 дNTP, 1,5 ммоль/л MgCl<sub>2</sub> и 1 ед. Taq-полимеразы. Амплификацию проводили в следующем температурном режиме: 95 °С/2 мин – первый цикл, потом 35 циклов: 95 °С/30 сек, 60 °С/30 сек, 72 °С/30 сек, последний цикл – 72 °С/5 мин. Рестриктику ПЦР-продукта длиной 561 п.о. осуществляли 10 ед. рестриктазы HaeIII инкубацией при 37 °С в течение 16 часов. Детекцию продуктов амплификации и рестрикции проводили методом электрофореза в 4% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием Et-Br. Анализ результатов диагностики проводился следующим образом: в случае положительного контроля выявлялись полосы размером 225, 142 и 83 п.о. При наличии гомозиготного варианта C→C выявлялись полосы размером 142 и 83 п.о. В случае определения гетерозиготного варианта C→T наблюдались полосы размером 225, 142 и 83 п.о. При идентификации гомозиготного варианта T→T выявлялась полоса размером 225 п.о. TNFα в сыворотке крови определяли с помощью набора реагентов «ProCon TNFα» фирмы «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург). IL-1β в сыворотке крови определяли с помощью набора реагентов

«ProCon IL-1b» (Санкт-Петербург). IL-RN в сыворотке крови определяли с помощью набора реагентов (IL-1-ИФА-БЕСТ) фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Микробиологические методы выполнялись в бактериологической лаборатории Областной клинической больницы в соответствии с приказом № 535 от 22 апреля 1985 года «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях в лечебно-профилактических учреждениях». Руководствуясь приложением 1 к Приказу Министерства здравоохранения СССР № 535 от 22 апреля 1985 года «Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинко-диагностических лабораториях», мы проводили микробиологические методы исследования трахеобронхиального секрета, бронхоальвеолярной лаважной жидкости и крови.

## Результаты и обсуждение

Частоты генотипов полиморфизма -260 (C→T) гена CD14 в контрольной группе в целом и в группе больных НП находятся в равновесии Харди–Вайнберга. При сравнении частот генотипов полиморфизма гена CD14 между контрольной группой и больными было выявлено статистически значимое повышение частоты генотипа T/T у больных с НП (33,33%) по сравнению с контрольной группой (18,09%) (p = 0,008).

Генотип C/T достоверно чаще наблюдался в группе контроля (54,03%) по сравнению с группой пациентов с НП (40,0%) (p = 0,012) (табл. 1). При сравнении частот аллелей гена CD14 между группой больных с НП и контрольной группой статистически значимых различий получено не было. Выявленная закономерность может свидетельствовать о том, что гомозиготы по T-аллелю

**ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА CD14 -260 C→T В ПОПУЛЯЦИИ БОЛЬНЫХ НП И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ (г. ОМСК И г. НОВОСИБИРСК)**

Аллельный вариант	Пациенты с НП (n = 75), %	Контрольная группа (n = 409), %
Аллель С	50 (47,62)	335 (53,17)
Аллель Т	55 (52,38)	295 (46,83)
Генотип С/С	20 (26,67)	114 (27,87)
Генотип С/Т	30 (40,0)*	221 (54,03)*
Генотип Т/Т	25 (33,33)**	74 (18,09)**
Соответствие равновесию Харди–Вайнберга		
	$\chi^2 = 2,894$	$\chi^2 = 3,396$

**Примечание.** \* – статистические различия по генотипу С/Т у больных с НП и контрольной группой ( $\chi^2 = 8,87$ ; p = 0,012); \*\* – статистические различия по генотипу Т/Т у пациентов в аналогичных группах ( $\chi^2 = 9,63$ ; p = 0,008).  $\chi^2$  – хи-квадрат, вероятность соответствия наблюдаемого распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга.

более восприимчивы к развитию НП. Обращают на себя внимание различия в тяжести течения НП у пациентов с генотипами С/С, С/Т и Т/Т: в первом случае оценка тяжести пневмонии по шкале CPIS составила  $7,81 \pm 1,32$  балла, во втором —  $8,93 \pm 1,48$  балла ( $p < 0,05$ ). В нашем исследовании прослеживается позитивная корреляция между временем разрешения НП с генотипом гена CD14: наличие генотипа Т/Т ассоциировалось с затяжным, осложненным течением пневмонии и необходимостью пролонгированной респираторной поддержки в случае НП, связанной с искусственной вентиляцией легких, по сравнению с течением пневмонии у больных с генотипами С/С и С/Т ( $r = 0,70$ ;  $p = 0,01$ ). По-видимому, это объясняется более высокой концентрацией sCD14 у индивидуумов с Т-аллелем и приводит к персистенции возбудителей НП [11]. Необходимо отметить, что наибольшее число неблагоприятных исходов у больных с НП наблюдалось в группе пациентов с генотипом Т/Т — 27,90% случаев.

Полученные нами данные подтверждаются результатами других исследований, в которых документируется, что у больных с генотипом Т/Т чаще развивается пневмония, вызванная *Chlamydia pneumoniae* [25]. При этом указывается, что уровень sCD14 в сыворотке крови был выше у гомозигот по аллелю Т гена CD14. Можно предполагать, что значительная часть случаев НП в обследованной популяции больных с генотипом Т/Т связана с особенностями иммунного ответа, модулированного рецептором CD14.

Генетически детерминированное повышение экспрессии гена CD14 ассоциируется с повышенной восприимчивостью к липополисахаридам (LPS) у больных с НП, вызванной грамотрицательной микрофлорой. В нашем исследовании косвенным доказательством отсутствия влияния генотипа С/С на возникновение НП является почти одинаковая частота встречаемости данно-

го генотипа у пациентов с НП (26,67%) и в контрольной группе (27,87%) ( $p > 0,05$ ).

Различия в тяжести НП по шкале CPIS у индивидуумов, несущих генотип Т/Т и С/С или С/Т, по-видимому, связаны с повышением синтеза провоспалительных цитокинов, кислородных радикалов и нитрита азота. [9]. Увеличение секреции данных медиаторов приводит к цитокин-опосредованному повреждению легких при НП. Доказательством этому являются экспериментальные данные S.J. Ebong и соавт., указавших на повышение уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови у мышей с сепсисом при высоком содержании sCD14 [7].

Роль генотипа Т/Т промоторного региона гена CD14 в возникновении бактериальных осложнений обсуждается в литературе. Исследования М. Heesen с соавт. и J.A. Hubacek не выявили различий между аллелем Т гена CD14 и тяжестью инфекций [15, 18].

При анализе варианта течения НП в зависимости от генетического полиморфизма регуляторной молекулы CD14 выявлено, что в группе больных с тяжелой НП достоверно чаще встречались как аллель Т, так и генотипы С/Т и Т/Т по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ) (табл. 2). В нашем исследовании выявлено, что в группе пациентов с тяжелым течением НП наличие аллеля Т ассоциировалось с риском инфицирования грамотрицательной микрофлорой: в популяции больных, несущих аллель Т, грамотрицательная микрофлора идентифицирована в 24 (74%) случаях; среди пациентов, несущих аллель С, — в 5 (17%) случаях ( $p = 0,004$ ). Возможно, наличие в гене регуляторной молекулы CD14 мутантного аллеля Т приводит к дефектам антиинфекционной защиты при тяжелой НП, что доказывается выявленной в нашей работе корреляционной связи умеренной силы между

**ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА CD14 -260 С→Т СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛОЙ И СРЕДНЕТЯЖЕЛОЙ НП**

Аллельный вариант	Пациенты с тяжелой НП (n = 43), абс. (%)	Пациенты со среднетяжелой НП (n = 32), абс. (%)	Контрольная группа (n = 409), абс. (%)	p
Аллель С	28 (45,90)	22 (50,0)	335 (53,17)	$p_1-p_k < 0,05$
Аллель Т	33 (54,09)	22 (50,0)	295 (46,83)	$p_1-p_k < 0,05$
Генотип С/С	10 (23,26)	10 (31,25)	114 (27,87)	$p_1-p_2 < 0,05$
Генотип С/Т	18 (41,86)	12 (37,50)	221 (54,03)	$p_{1,2}-p_k < 0,05$
Генотип Т/Т	15 (34,88)	10 (31,25)	74 (18,09)	$p_{1,2}-p_k < 0,05$

**Примечание.** p – достоверность различий между группами (статистика по Кульбаку);  $p_1$ ,  $p_2$ ,  $p_k$  – достоверность различий между группами пациентов с тяжелым ( $p_1$ ), среднетяжелым ( $p_2$ ) течением НП и контрольной группой ( $p_k$ ).

аллелем Т гена CD14 и тяжестью состояния по шкале SOFA ( $r = +0,54$ ;  $p < 0,05$ ).

Наличие лимфоцитопении у больных с сепсисом также коррелировало с аллелем Т гена CD14 ( $r = +0,49$ ;  $p < 0,05$ ). Несмотря на то что рецептор CD14 не имеет трансмембранного домена, необходимого для проведения внутриклеточного сигнала, его функция сводится к связыванию LPS грамотрицательных бактерий и формированию высокоаффинного рецепторного комплекса вместе с TLR-4 [1]. Кроме того, без молекулы CD14 не формируется высокоаффинный рецепторный комплекс, и распознавание LPS нарушается [1]. По-видимому, у пациентов, несущих аллель Т, утрачивается способность к взаимодействию рецептора и растворимой формы CD14 с LPS, способствуя более тяжелому течению НП. В частности, у пациентов с ВАП обнаружена корреляционная зависимость между генотипом Т/Т гена CD14 и необходимостью проведения ИВЛ более 72 часов ( $r = +0,49$ ;  $p < 0,05$ ).

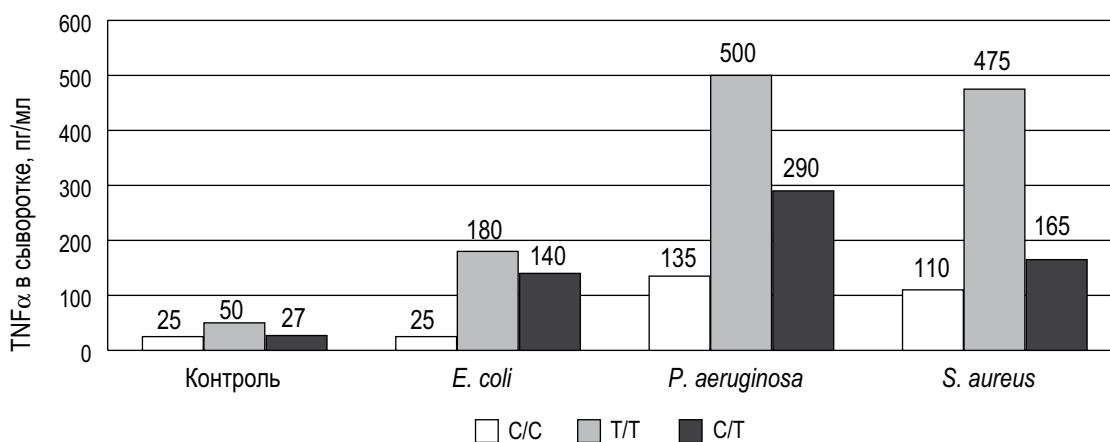
Характеристика популяции больных с тяжелым течением НП включала анализ связи аллельного полиморфизма гена регуляторной молекулы CD14 с рядом клинических параметров пациентов. Нами получены достоверные различия в распространенности грамотрицательной микрофлоры среди пациентов, у которых чаще выявлялся аллель Т гена CD14: 22 (79%) пациента против 6 (17%) с аллелем С ( $p < 0,05$ ). Кроме того, отмечена четкая тенденция к возрастанию уровня летальности к 28 суткам пребывания в стационаре при наличии аллеля Т в группе больных с тяжелой НП ( $p < 0,05$ ). Эти данные подчеркивают роль регуляторной молекулы CD14 на этапах раннего распознавания LPS грамотрицательных патогенов и, возможно, как следствие – развитие

поздних осложнений НП, являющихся ведущей причиной летального исхода к 28 суткам.

В современных публикациях, освещающих механизмы инициального иммунитета и полиморфизм единичных нуклеотидов определена взаимосвязь между полиморфизмом гена CD14 и развитием сепсиса у больных с ожоговой болезнью [6]. Объяснением этому служит инициальная роль CD14 в распознавании грамотрицательных микроорганизмов путем связывания бактериальных LPS. Физический контакт между CD14-связанным LPS, MD-2 и TLR4 запускает сигнальную трансдукцию внутри макрофагов [20, 24]. Замена цитозина на тимин в нуклеотиде 260 изменяет Sp1 ядерный протеин, связывающий промоторную область CD14, что приводит к повышению LPS-индуцированной транскрипции при наличии аллеля Т [27]. Следует отметить, что фенотипические проявления данного полиморфизма остаются до конца не изученными.

В ранее проведенных исследованиях *in vivo* и *in vitro* высказана гипотеза о влиянии полиморфизма гена CD14 на продукцию фактора некроза опухоли-альфа (TNF $\alpha$ ), зависящую от характера микрофлоры; в частности, экспозиция данного цитокина должна быть различной в зависимости от преобладания грамположительной или грамотрицательной микрофлоры [26].

На рисунке 1 представлено влияние полиморфизма гена CD14 на продукцию TNF $\alpha$  клетками периферической крови в зависимости от генотипов – С/С, С/Т и Т/Т у больных с НП (рис. 1). Следует отметить, что в группе здоровых доноров (контроль) не выявлено достоверно значимых различий между генотипом CD14 и содержанием TNF $\alpha$  в периферической крови ( $p > 0,05$ ), что обусловлено отсутствием бактериальных стимулов.



**Рисунок 1.** Содержание TNF $\alpha$  в сыворотке крови в зависимости от полиморфизма гена регуляторной молекулы CD14

**Примечание.** \* – достоверность различий между группами больных, несущих генотип Т/Т, и уровнем TNF $\alpha$  в периферической крови в зависимости от вида патогенов ( $p < 0,05$ ).

Полиморфизм в позиции -260 С/Т гена CD14 ассоциируется с высоким уровнем сывороточного TNF $\alpha$ , что другими исследователями трактуется возрастающим уровнем мРНК TNF $\alpha$  по сравнению с гомозиготами по аллелю С [26].

В нашем исследовании получена умеренная корреляционная связь между полиморфизмом С(-260)→Т гена CD14 и содержанием TNF $\alpha$  в сыворотке крови ( $r = +0,44$ ;  $p < 0,05$ ) в группе у больных с тяжелой НП. Как видно из рис. 1, достоверность различий между группами пациентов с генотипом Т/Т по уровню содержания TNF $\alpha$  в сыворотке статистически значима по сравнению с гомозиготами С/С при стимуляции LPS грамотрицательных микроорганизмов. Особенно высокими значения TNF $\alpha$  в сыворотке оказались при НП, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, *Esherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Оценка роли промоторного полиморфизма гена CD14 в позиции -260 С/Т, согласно данным литературы, свидетельствует о неоднозначном влиянии последнего на цитокиновый ответ и собственно экспрессию mCD14 [5].

В одном из исследований указывается на отсутствие различий между продукцией уровней цитокинов при стимуляции лизатами грамположительных и грамотрицательных бактерий у пациентов с генотипами С/С, С/Т, Т/Т [5]. Тем не менее отдельными авторами указывается на LPS-индуцированное высвобождение TNF $\alpha$  при различных вариантах генотипов молекулы CD14 моноцитами [14], периферическими мононуклеарными клетками крови [21] и клетками крови [9]. В противоположность этим заключениям М. Heesen и соавт. не выявлено различий между тремя генотипами и продукцией TNF $\alpha$  [14].

В недавно проведенных исследованиях показано как в случае генотипа С/С, так и генотипа Т/Т гена CD14 при стимуляции LPS цельной крови здоровых добровольцев отмечалось повышение продукции сывороточного TNF $\alpha$ , достигающая  $> 2000$  пкг/мл [9]. В то же время продукция TNF $\alpha$  после стимуляции клеток цельной крови *Chlamydia pneumoniae* (TW183) и *Chlamydia trachomatis* (UW5) также оказалась выше в группе пациентов с генотипом Т/Т по сравнению с генотипом С/С [9]. Генетически детерминированное возрастание экспрессии CD14 ассоциируется с усилением иммунного ответа на LPS [9]. S.E. Temple и соавт. отметили высокую продукцию мРНК TNF $\alpha$  у индивидуумов с генотипом Т/Т после инкубации крови с LPS или *Esherichia coli* [26].

В нашем исследовании у пациентов с НП, вызванной грамотрицательной микрофлорой, в случае наличия генотипа Т/Т продукция TNF $\alpha$

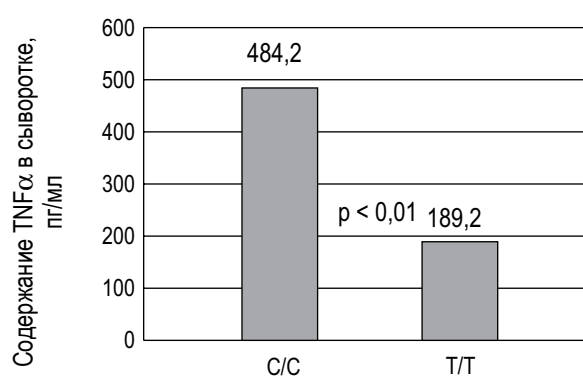


Рисунок 2. Уровень TNF $\alpha$  в сыворотке у пациентов с генотипами С/С и Т/Т гена регуляторной молекулы CD14 (-260) С/Т

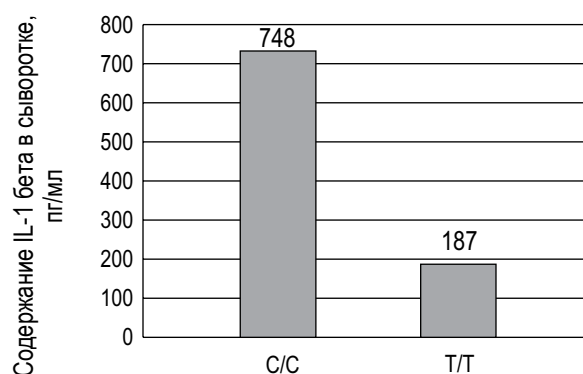


Рисунок 3. Уровень IL-1 $\beta$  в сыворотке у пациентов с генотипами С/С и Т/Т гена регуляторной молекулы CD14 (-260) С/Т

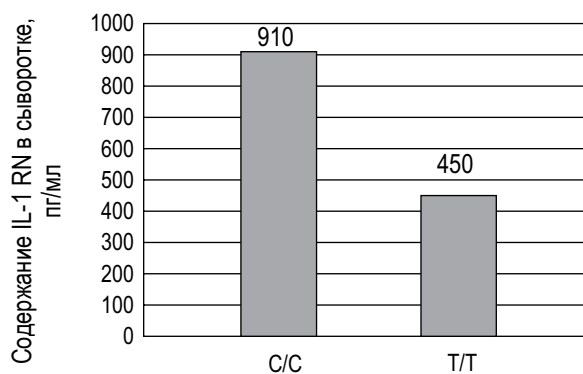


Рисунок 4. Уровень IL-1RN в сыворотке у пациентов с генотипами С/С и Т/Т гена регуляторной молекулы CD14 (-260) С/Т

в периферической крови также оказалась выше по сравнению с группой больных с генотипом С/С ( $p < 0,05$ ). Возможно, это связано с тем, что компоненты мембран грамотрицательной микрофлоры индуцируют стимуляцию моноцитов для продукции TNF $\alpha$  в большей степени, чем другие микроорганизмы [22]. Это происходит не только за счет LPS, но и других антигенов, называемых «главными наружными мембранными

протеинами» [9]. После связывания LPS с CD14 синтезируются и вырабатываются не только TNF $\alpha$ , но и другие провоспалительные цитокины – интерлейкины (IL)-1, -6, -8 и провоспалительные медиаторы (IL-10 и трансформирующий фактор роста  $\beta$ ), активные радикалы кислорода и оксид азота в качестве триггерных механизмов [25].

Наличие аллеля T регуляторной молекулы CD14 снижает аффинность Sp-протеина к взаимодействию с гуанин-цитозинным комплексом, в результате чего усиливается транскрипционная активность моноцитов [27].

Несомненно важным результатом является оценка зависимости между полиморфизмом гена CD14 и продукцией растворимой фракции данной регуляторной молекулы воспаления [4].

В одном из европейских исследований продемонстрировано, что аллель T ассоциируется с высокой плотностью mCD14 на моноцитах у здоровых добровольцев [17]. Авторами данного исследования предполагалось, что изменения в промоторном регионе в позиции C(-260)→T приводят к увеличению экспрессии гена молекулы CD14. По данным других исследований [4], получены достоверные различия по содержанию sCD14 между группами пациентов с генотипами C/C и C/T + T/T. Таким образом, генетически детерминированное повышение экспрессии гена CD14 ассоциируется с усилением иммунного ответа на инфицирование грамотрицательной микрофлорой, что способствует более тяжелому течению НП.

Однако литературные данные свидетельствуют о противоречивых взглядах ряда авторов на влияние полиморфизма гена CD14 на тяжесть течения и исход госпитальных инфекций. S. Gibot и соавт. определили, что генотип T/T промоторного гена CD14 ассоциируется с предрасположенностью к септическому шоку и определяет исход у больных с данным осложнением [11]. Исследования D.M. Agnesse с соавт. не выявили различий между указанным полиморфизмом и тяжестью госпитальных инфекций [2]. Подобные противоречивые результаты могут быть объяснены несколькими причинами. Одним из объяснений является неустойчивая связь между мутацией в позиции -260 и другими вариантами, что может изменять плотность mCD14 и в результате изменять чувствительность к инфекционным заболеваниям [19]. Кроме этого, с повышением микробной обсемененности грамотрицательными микроорганизмами индуцируется продукция цитокинов и экспрессия CD14 на моноцитах [8]; в то же время другие, не LPS-компоненты микроорганизмов стимулируют синтез цитокинов посредством TLR-зависимого пути [23]. Необходи-

мо отметить, что возрастание риска развития грамотрицательных инфекций (в том числе НП) и их исход ассоциируется не только с полиморфизмом гена CD14, но и, например, с полиморфизмом TLR-4 [2].

Как известно, CD14 является рецептором для LPS, фиксирующегося на моноцитах и макрофагах посредством гликозилфосфатидилинозитола [7]. Исследования *in vitro* показали, что клетки, несущие комплекс CD14-LPS, активируют продукцию про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов и других активных молекул, участвующих в инициальном иммунном ответе. В исследованиях было показано, что передача внутриклеточного сигнала посредством mCD14 требует по меньшей мере экспрессии TLR-4, MyD88 и MD2 [7]. В результате расщепления мембранной формы CD14 образуется циркулирующий в крови sCD14 [7]. Исследования *in vitro* выявили, что клетки с недостаточной экспрессией mCD14 (эндотелиальные и эпителиальные клетки), способны отвечать на комплекс LPS-sCD14 с помощью других, еще не идентифицированных рецепторов [16]. Как было описано выше, содержание sCD14 зависело от полиморфизма гена CD14 C(-260)→T.

В нашем исследовании выдвинута гипотеза о возможности влияния генотипов C/C и T/T на продукцию цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-1RN. Полученные результаты по содержанию данных цитокинов в периферической крови в зависимости от генотипов молекулы CD14 представлены на рисунках 2, 3, 4. Как видно из рисунков 2-4, у пациентов с генотипом T/T гена регуляторной молекулы CD14 имела место гиперцитокинемия за счет про- и противовоспалительных цитокинов. Как известно, CD14 экспрессируется клетками миелоидного ряда (моноцитами, макрофагами), В-клетками, печеночными паренхиматозными клетками и клетками микроглии [3]. Описаны различия в интенсивности экспрессии CD14 в различных органах и тканях: наибольший уровень конститутивной экспрессии наблюдается плевральными и альвеолярными макрофагами. В силу этих особенностей при НП экспрессируется максимальное количество CD14, что, в свою очередь, индуцирует синтез провоспалительных цитокинов. В эксперименте показано, что трансгенные мыши по человеческому CD14 примерно в три раза более чувствительны к LPS-индуцированному повреждению легких, чем мыши с неизменным генотипом [10]. В противоположность, мыши, дефицитные по CD14, более устойчивы к воздействию LPS [12]. Однако мыши, дефицитные по CD14, были менее устойчивы к инфицированию *Staphylococcus aureus* и имели более высокое содержание TNF $\alpha$

по сравнению с животными с обычным генотипом [13].

В гене CD14 обнаружен функциональный полиморфизм, связанный с заменой нуклеотидов С на Т в положении -260, что приводит к повышению экспрессии CD14 на моноцитах и параллельному увеличению растворимого CD14 [1].

Следовательно, в нашем исследовании генотип Т/Т ассоциируется с более высокой продукцией CD14 и, как следствие, гиперсекрецией цитокинов. Это подчеркивает ключевую роль полиморфизма CD14 в иммунопатогенезе НП.

## Список литературы

1. Симбирцев А.С., Громова А.Ю. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 3-10.
2. Agnese D.M., Calvano J.E., Hahm S.J. Human toll-like receptor 4 mutation but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections // J. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 186. – P. 1522-1525.
3. Antal-Szalmas P., van Strijp J.A.G., Weersink A.J.L., Verhoef J., van Kessel K.P.M. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils // J. Leukoc. Biol. – 1997. – Vol. 62. – P. 721-728.
4. Arcaroli J., Fessler M.B., Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis // Shock. – 2005. – Vol. 24, N 4. – P. 300-312.
5. Von Aulock S., Rupp J., Gueinzus K., Maass M., Hermann C. Critical investigation of the CD14 promoter polymorphism: lack of a role for *in vitro* cytokine response and membrane CD14 expression // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 2005. – Vol. 12, N 10. – P. 1254-1256.
6. Barber R.C., Chang L.Y.E., Arnoldo B.D., Purdue G.F., Hunt J.L., Horton J.W., Aragaki C.C. Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury // Clinical Medicine. – 2006. – Vol. 4, N 4. – P. 250-255.
7. Ebong S.J., Goyert S.M., Nemzek J.A., Kim J., Bolgos G.L., Remick D. Critical role of CD14 for production of proinflammatory cytokines and cytokine inhibitors during sepsis with failure to alter morbidity or mortality // Infection and Immunity. – 2001. – P. 2099-2106.
8. Eng H.L., Chen C.H., Kuo C.C., Wu J.S., Wang C.H., Lin T.M. Association of CD14 promoter gene polymorphism and Chlamydia pneumoniae infectio // J. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 188. – P. 90-97.
9. Eng H.L., Wang C.H., Chen C.H., Chou M.H., Cheng C.T., Lin T.M. A CD14 promoter polymorphism is associated with CD14 expression and Chlamydia - stimulated TNF alpha production // Genes Immun. – 2004. – Vol. 5. – P. 426-430.
10. Ferrero E., Jiao D., Tsuberi B.Z., Tesio L., Wei Rong G., Haziot A. Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90. – P. 2380-2384.
11. Gibot S., Cariou A., Drouet L., Rossignol M., Ripoll L. Association between a genomic polymorphism within the CD 14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate // Crit. Care Med. – 2002. – Vol. 30. – P. 969-973.
12. Haziot A., Ferrero E., Köntgen F., Hijiya N., Yamamoto S., Silver J., Stewart C.L., Goyert S.M. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria on CD14-deficient mice // Immunity. – 1996. – Vol. 4. – P. 407-414.
13. Haziot A., Hijiya N., Schultz K., Zhang F., Gangloff S.C., Goyert S.M. CD14 plays no major role in shock induced by Staphylococcus aureus but down-regulates TNF-alpha production // J. Immunol. – 1999. – Vol. 162. – P. 4801-4805.
14. Heesen M., Blomeke B., Schluter B., Heussen N., Rossaint R., Kunz D. Lack of association between the -260 C→T promoter polymorphism of the endotoxin receptor CD14 gene and the CD14 density of unstimulated human monocytes and soluble CD14 plasma levels // Intens. Care Med. – 2001. – Vol. 27. – P. 1770-1775.
15. Heesen M., Bloemeke B., Schade U., Obertacke U., Majetschak M. The -260 C→T promoter polymorphism of the lipopolysaccharide receptor CD14 and severe sepsis in trauma patients // Intensive Care Med. – 2002. – Vol. 28. – P. 1161-1163.
16. Hoshido K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., Akira S. Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4) – deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product // J. Immunol. – 1999. – Vol. 162. – P. 3749-3752.
17. Hubacek J.A., Pit'ha J., Skodova Z., Stanek V., Poledne R. C(-260)→T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction // Circulation. – 1999. – Vol. 99. – P. 3218-3220.
18. Hubacek J.A., Stuber F., Frohlich D. The common functional C(-159)→T polymorphism within the promoter region of the lipopolysaccharide receptor CD14 is not associated with sepsis development or mortality // Genes. Immun. – 2000. – Vol. 1. – P. 405-407.
19. Ito D., Murata M., Tanahashi N. Polymorphism in the promoter of lipopolysaccharide receptor CD14 and ischemic cerebrovascular disease // Stroke. – 2000. – Vol. 31. – P. 2661-2664.
20. Kitchens R.L., Thompson P.A., Viriyakosol S., O'Keefe G.E., Munford R.S. Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring

cell-bound LPS to plasma lipoproteins // J. Clin. Invest. – 2001. – Vol. 108. – P. 485-493.

21. Kondo T., Ohno M., Shimokata K., Iino S., Inden Y., Murohara T., Hirai M. CD14 promoter polymorphism is associated with acute myocardial infarction resulting from insignificant coronary artery stenosis // Heart. – 2003. – Vol. 89. – P. 931-932.

22. Van der Linden M.W., Huizinga T.W., Stoeken D.J., Sturk A., Westendorp R.G. Determination of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 production in a whole blood stimulation system: assessment of laboratory error and individual variation // J. Immunol. Methods. – 1998. – Vol. 218. – P. 63-71.

23. Netea M.G., Galama J.M.D., Kullberg B.J., Stalenhoef A.F.H., Dinarello C.A., Van der Meer J.W.M. Non-LPS components of Chlamydia pneumoniae stimulate cytokine production through Toll-like receptor 2-dependent pathways // Eur. J. Immunol. – 2002. – Vol. 32. – P. 1188-1195.

24. Poltorak A., Ricciardi-Castagnoli P., Citterio S., Beutler B. Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed

by genetic complementation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 2163-2167.

25. Da Silva Correia J., Soldau K., Christen U., Tobias P.S., Ulevitch R.J. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the protein in its membrane receptor complex: transfer from CD14 to TLR4 and MD2 // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 21129-21135.

26. Temple S.E.L., Cheong K.Y., Almeida C.M., Price P., Waterer G.W. Polymorphisms in lymphotoxin alpha and CD14 genes influence TNF $\alpha$  production induced by gram-positive and gram-negative bacteria // Genes and Immunity. – 2003. – Vol. 4. – P. 283-288.

27. Le Van T.D., Bloom J.W., Bailey T.J. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity // J. Immunol. – 2001. – Vol. 167. – P. 5838-5844.

*поступила в редакцию 30.07.2009*

*отправлена на доработку 21.08.2009*

*принята к печати 30.09.2009*