

Beata Kaleta, *Jacek Łukaszewicz, Grażyna Kubiak-Tomaszewska, Piotr Tomaszewski

Polimorfizm C-159T receptora CD14 i C-1196T jego ko-receptora TLR4 u pacjentów z alkoholowym stłuszczeniem i alkoholową marskością wątroby

A C-159T polymorphism of CD14 receptor and polymorphism of TLR4 gene in patients with alcoholic fatty liver and alcoholic cirrhosis

Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik Katedry: prof. dr hab. Dariusz Sitkiewicz

Streszczenie

Obok czynników środowiskowych, diety, trybu życia, itp. prawdopodobny wpływ na rozwój alkoholowego stłuszczenia (AC) i alkoholowej marskości wątroby (AC) mają czynniki genetyczne. Badania kliniczne dowodzą, iż toksyny bakterii Gram-ujemnych u osób przewlekłe nadużywających alkoholu w większym stopniu przedostają się do krwi ze światła jelita. Przez interakcję z receptorami błony komórkowej CD14 i TLR4 powodują one aktywację komórek Kupffera w wątrobie i produkcję cytokin prozapalnych, które uszkadzają hepatocyty. Polimorfizm C-159T receptora CD14 w rejonie promotorowym genu powoduje zwiększenie ekspresji tego receptora na powierzchni komórek Kupffera oraz nasilenie reakcji immunologicznej. Również polimorfizm C-1196T jego ko-receptora TLR4 może powodować zmiany w kaskadzie sygnalizacyjnej. W badaniu oznaczono warianty polimorficzne genu CD14 i TLR4 w grupie chorych z alkoholowym stłuszczeniem (AFL) i alkoholową marskością wątroby (AC) oraz w grupie kontrolnej, wykorzystując technikę RT-PCR. W przypadku polimorfizmu C-159T receptora CD14 stwierdzono istotne statystycznie różnice w częstości występowania genotypu TT w grupie osób z AC i kontrolnej ($p = 0,008$), co sugeruje ochronną rolę allelu C. Natomiast w przypadku polimorfizmu C-1196T receptora TLR4 stwierdzono znaczne różnice w częstości występowania genotypu CC między grupą chorych z AFL i kontrolną ($p = 0,009 \cdot 10^{-9}$). Rozkład genotypów C-1196T TLR4 u chorych z AC i w kontroli był niemal identyczny. Uzyskane w tej grupie wyniki nie pozwalają na jednoznaczną interpretację, co sugeruje konieczność kontynuacji badań na większej populacji.

Słowa kluczowe: CD14, TLR4 (*Toll-like receptor*), LPS (lipopolisacharydy), AFL (*alcoholic fatty liver*), AC (*alcoholic cirrhosis*), cytokiny, endotoksyny, RT-PCR (*Real-time polymerase chain reaction*)

Summary

In addition to environmental factors, diet, life style etc., genetic factors influence the susceptibility for alcoholic fatty liver and alcoholic cirrhosis. Clinical studies show that gut permeability for endotoxines from Gram-negative bacteria in patients chronically abuse alcohol, is increased. LPS interact with membrane receptors CD14 and TLR4 cause Kupffer cell activation and production of proinflammatory cytokines, which are critical in the AFL and AC. A C-159T polymorphism in the promotor region of CD14 gene confer increased CD14 expression on Kupffer cells and enhanced inflammatory response. Polymorphism C-1196T of TLR4 gene can also change the intracellular signalling pathway. In the present study we identified polymorphic variants of CD14 and TLR4 genes in patients with alcoholic fatty liver (AFL), alcoholic cirrhosis (AC) and control group using the Real-Time PCR technique. For C-159T polymorphism of CD14 gene we found statistically significant differences in the frequency of TT genotype in patients with AC and control ($p = 0.008$), suggesting the protective role of C allele. However, for C-1196T polymorphism of TLR4 gene we found significant differences in the frequency of CC genotype in patients with AFL and control ($p = 0.009 \cdot 10^{-9}$). Distribution of genotypes C-1196T of TLR4 receptor was almost identical in patients with AC and control group. The results obtained are not conclusive, suggesting the need continuation of tests repetition with the use of larger population.

Key words: CD14, TLR4 (*Toll-like receptor*), LPS (lipopolysaccharide), AFL (*alcoholic fatty liver*), AC (*alcoholic cirrhosis*), cytokines, endotoxin, RT-PCR (*Real-time polymerase chain reaction*)

WPROWADZENIE

Dane kliniczne wskazują, że tylko u około 10-30% osób nadużywających alkoholu rozwija się alkoholowe stłuszczenie (AFL – *alcoholic fatty liver*) i alkoholowa marskość wątroby (AC – *alcoholic cirrhosis*) (1). Poza nadmiernym spożywaniem etanolu również inne czynniki odgrywają znaczącą rolę w patogenezie tych schorzeń. Prawdopodobny wpływ na ich rozwój mają geny. Badania nad polimorfizmem różnych genów mogą wyjaśnić przyczynę i mechanizm rozwoju AFL i AC. Do genów mających związek z rozwojem tych schorzeń można zaliczyć m.in. geny kodujące receptory dla endotoksyn bakteryjnych (LPS – *lipopolisacharyd*): CD14 oraz jego ko-receptor TLR4.

Nadmierna konsumpcja etanolu powoduje zaburzenia w funkcjonowaniu i szczelności śluzówki jelit. Endotoksyny, np. LPS pochodzące ze ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych w większym stopniu przedostają się do krwi, a z nią do wątroby (2-4). LPS po przejściu przez śluzówkę jelita wiąże się z osoczowym białkiem wiążącym (LBP – *lipopolysaccharide binding protein*). Kompleks ten dociera do wątroby. Dochodzi do aktywacji komórek Kupffera (KC – *Kupffer cells*) w wyniku interakcji z receptorami błony komórkowej: powierzchniowym CD14 i przezłonowym TLR4 (2, 5). Receptor CD14 pośredniczy w rozpoznaniu endotoksyn przez TLR4. TLR4 aktywuje wewnątrzkomórkowe kaskady sygnalizacyjne, m.in. kaskadę NF- κ B (NF- κ B – *nuclear factor- κ B*), czego następstwem jest intensywna synteza wolnych rodników tlenowych, chemokin (IL-8) i cytokin prozapalnych, głównie TNF- α i TGF- β 1, IL-1, IL-2, IL-6 (5-10, 20, 21).

Dane eksperymentalne i badania kliniczne dowodzą, iż w patogenezie AFL i AC uczestniczy nadmierna odpowiedź immunologiczna (4, 11-13). Również polimorfizm genów kodujących receptory biorące udział w rozpoznawaniu LPS i wywołaniu kaskady zapalnej może mieć wpływ na rozwój alkoholowego stłuszczenia i marskości wątroby. Jarvelainen i wsp. wykazali związek polimorfizmu C-159T receptora CD14 ze zwiększonym ryzykiem rozwoju alkoholowej choroby wątroby. Polimorfizm ten polega na zamianie allelu cytozynowego na tymidynowy w rejonie promotorowym genu w pozycji -159. W wyniku zamiany alleli C→T zwiększa się ekspresja CD14 na powierzchni komó-

rek Kupffera, co w konsekwencji nasila odpowiedź zapalną (1, 12, 14-16). Ponieważ błonowy CD14 nie posiada części przezłonowej, wymaga obecności ko-receptora. TLR4 jest ważnym partnerem CD14 w wywołaniu odpowiedzi immunologicznej. Odkryto dwa istotne polimorfizmy receptora TLR4, które mają wpływ na przezłonową domenę receptora. Znana jest rola polimorfizmu Asp299Gly w osłabieniu sygnalizacji TLR4 w odpowiedzi na LPS, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia wydzielania cytokin prozapalnych, natomiast niejasna jest rola drugiego ważnego polimorfizmu: C-1196T (Thr399Ile) tego receptora (17-19).

Biorąc pod uwagę rolę endotoksyn, CD14 i TLR4 w wywołaniu reakcji zapalnej, w badaniu oznaczono warianty polimorficzne (SNIps – *single nucleotide polymorphisms*) genów kodujących te receptory u pacjentów z alkoholowym stłuszczeniem i marskością wątroby w populacji polskiej.

MATERIAŁ I METODY

Charakterystyka pacjentów i izolacja DNA

Badanie zostało przeprowadzone w grupie pacjentów z rozpoznaniem alkoholowym stłuszczeniem i alkoholową marskością wątroby oraz w grupie kontrolnej (zdrowi Honorowi Dawcy Krwi). Pod kątem polimorfizmu receptora CD14 przebadano 69 chorych z AFL, 70 z AC i 82 zdrowych krwiodawców. Polimorfizm receptora TLR4 oznaczono u 70 chorych z AFL, 68 z AC i 68 zdrowych.

DNA wyizolowano ze 100 μ l mrożonej krwi obwodowej, używając standardowego zestawu firmy A&A Biotechnology zgodnie z protokołem izolacji (22).

Oznaczenie wariantów polimorficznych CD14 (rs2569190) i TLR4 (rs4986791)

Genotypowanie przeprowadzono za pomocą metody Real-Time PCR, używając termocyklera LightCycler[®] 480 firmy Roche oraz sond typu SimpleProbe firmy TIB MOLBIOL zgodnie z warunkami przedstawionymi w tabeli 1.

Do oznaczenia genotypów wykorzystano analizę temperatury topnienia. Pozwoliło to rozróżnić heterozygoty, geny typu dzikiego i mutanty.

Tabela 1. Program RT-PCR do genotypowania CD14 (rs2569190) i TLR4 (rs4986791).

Program	Denat.	Cycling			Melting			Cooling
Parameter								
Analysis Mode	None	Quantification			Melting Curves			None
Cycles	1	45			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Target [°C]	95	95	60	72	95	40	75	40
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp rate [°C/s]	4,4	4,4	2,2	4,4	4,4	1,5	–	1,5
Acquisition mode	None	None	Single	None	None	None	Continu.	None
Acquisitions [per [°C]							3	

Analiza statystyczna

Różnice w częstości występowania poszczególnych genotypów w grupach badanych oraz w grupie kontrolnej wykazano testem prawdopodobieństwa Fishera. Wartość $p < 0,05$ oznacza istotność statystyczną różnic.

WYNIKI

Częstość genotypów CD14 u pacjentów z AFL, AC i w grupie kontrolnej

Celem badania było potwierdzenie przypuszczenia, iż u pacjentów z alkoholowym stłuszczeniem i marskością wątroby częściej niż w grupie kontrolnej występuje genotyp TT (mutant) niż CC (typ dziki). W przypadku polimorfizmu CD14 (C-159T, rs2569190) allel C jest allelem ochronnym. Genotypowanie CD14 przeprowadzono u 69 chorych z AFL, 70 z AC i 82 zdrowych z grupy kontrolnej. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Rozkład genotypów w grupie kontrolnej przedstawia się następująco: CC: 22/82 (26,83%), CT: 47/82 (57,32%), TT: 13/82 (15,85%). Zbliżony rozkład występuje w grupie chorych z alkoholowym stłuszczeniem wątroby: CC: 26/69 (37,68%), CT: 39/69 (56,52%), TT: 4/69 (5,80%). Różnice w częstości polimorfizmu w tych grupach nie są statystycznie istotne ($p = 0,094$). W grupie chorych z alkoholową marskością wątroby częstość genotypów wynosi: CC: 26/70 (37,14%), CT: 23/70 (32,86%), TT: 21/70 (30,00%). Genotyp TT (homozygota typu mutant) występuje częściej w grupie chorych z AC niż w grupie kontrolnej ($p=0,008$, co oznacza istotność statystyczną różnic).

Częstość genotypów TLR4 u pacjentów z AFL, AC i w grupie kontrolnej

Celem badania polimorfizmu TLR4 (rs4986791) było określenie różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów w grupie kontrolnej ($n = 68$), w grupie chorych z alkoholowym stłuszczeniem wątroby ($n = 70$) i chorych z alkoholową marskością wątroby ($n = 68$). Uzyskane wyniki przedstawia tabela 3.

Rozkład genotypów w grupie kontrolnej przedstawia się następująco: CC: 57/68 (83,82%), CT: 10/68

(14,71%), TT: 1/68 (1,47%). Rozkład genotypów w grupie chorych z alkoholowym stłuszczeniem wątroby: CC: 20/70 (28,57%), CT: 50/70 (71,43%), TT: 0/70 (0,00%). W grupie chorych z alkoholową marskością wątroby częstość genotypów wynosi: CC: 56/68 (82,35%), CT: 11/68 (32,86%), TT: 1/70 (1,47%). **Badanie wykazało znaczące statystycznie różnice w częstości występowania genotypu CC i CT między kontrolą a chorymi ze zdiagnozowanym AFL ($p = 0,009*10^{-9}$), natomiast rozkład genotypów w grupie pacjentów z AC i kontrolnej był niemal identyczny ($p = 1,000$). Uzyskane wyniki nie wykazują współzależności rozwoju AFL i AC z polimorfizmem C-1196T TLR4.**

DYSKUSJA

Wiele badań udowodniło, iż alkoholowe stłuszczenie i marskość wątroby może rozwijać się w wyniku przewlekłego nadużywania alkoholu (20, 21). Mechanizm uszkodzenia hepatocytów nie jest jednak do końca wyjaśniony. Pojawiają się dowody na to, iż hepatotoksyczność etanolu może być związana z podwyższonym poziomem endotoksyn bakteryjnych w osoczu lub polimorfizmem receptorów dla tych endotoksyn (2-5, 11-13). LPS wywiera niekorzystny wpływ na komórki wątroby przez interakcje z receptorem CD14 i jego ko-receptorem TLR4, wywołując silną odpowiedź immunologiczną skutkującą nadmierną produkcją cytokin prozapalnych, które są kluczowe w patogenezie AFL i AC. Celem powyższego badania było określenie, czy polimorfizm C-159T receptora CD14 i C-1196T receptora TLR4 mają wpływ na większą podatność osób nadużywających alkoholu na rozwój alkoholowego stłuszczenia i alkoholowej marskości wątroby.

Genotypowanie C-159T CD14 wykazało, że w populacji chorych z rozpoznaną alkoholową marskością wątroby (AC) genotyp TT (homozygota typu mutant) występuje częściej niż w grupie zdrowych, natomiast nie ma różnic w częstości występowania tego polimorfizmu między grupą kontrolną a grupą z alkoholowym stłuszczeniem wątroby. Zarówno w populacji chorych z AFL, jak i w zdrowej najczęściej występuje heterozygota CT.

Tabela 2. Rozkład genotypów C-159T CD14 (%) u pacjentów z AFL i AC i w grupie kontrolnej.

	GENOTYP			p
	CC	CT	TT	
AFL (n = 69)	26 (37,68%)	39 (56,52%)	4 (5,80%)	0,094
AC (n = 70)	26 (37,14%)	23 (32,86%)	21 (30,00%)	0,008
KONTROLA (n = 82)	22 (26,83%)	47 (57,32%)	13 (15,85%)	–

Tabela 3. Rozkład genotypów C-1196T TLR4 (%) u pacjentów z AFL i AC i w grupie kontrolnej.

	GENOTYP			p
	CC	CT	TT	
AFL (n = 70)	20 (28,57%)	50 (71,43%)	0 (0,00%)	0,009*10 ⁻⁹
AC (n = 68)	56 (82,35%)	11 (16,18%)	1 (1,47%)	1,000
KONTROLA (n = 68)	57 (83,82%)	10 (14,71%)	1 (1,47%)	–

Genotypowanie C-1196T TLR4 dało trudne do jednoznacznej interpretacji wyniki. Stwierdzono, że występują znaczące statystycznie różnice w częstości występowania genotypu CC i CT między zdrowymi a chorymi ze zdiagnozowanym alkoholowym stłuszczeniem wątroby, natomiast rozkład genotypów w grupie pacjentów z alkoholową marskością i w grupie kontrolnej był niemal identyczny. Uzyskane dane nie dają czystego obrazu zależności polimorfizmu C-1196T TLR4. Niejasne jest, dlaczego stwierdzono istotne różnice między grupą kontrolną a grupą chorych z AFL, zaś w przypadku chorych z AC takich różnic nie zaobserwo-

wano. Ponadto wykazano znaczne różnice w częstości genotypów między chorymi ze stłuszczeniem wątroby i marskością, a jak powszechnie wiadomo AFL jest pierwszym etapem alkoholowej choroby wątroby, po którym może rozwinąć się AC. **Zagadnienie to wymaga dalszych badań na znacznie powiększonych populacjach, oznaczenia innych polimorfizmów TLR4 oraz pozostałych genów mogących mieć wpływ na rozwój alkoholowego stłuszczenia i marskości wątroby. Być może da to odpowiedź na pytanie, dlaczego tylko 10-30% osób nadużywających alkoholu zapada na te schorzenia.**

PIŚMIENNICTWO

- Jarvelainen HA, Orpana A, Perola M et al.: Promoter Polymorphism of the CD14 Endotoxin Receptor Gene as a Risk Factor for Alcoholic Liver Disease. *Hepatology* 2001; 33: 1148-1153.
- Rao R: Endotoxemia and Gut barrier dysfunction In alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009; 50: 638-644.
- Parlesak A, Schafer C, Schultz T et al.: Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia In patients with chronic alcohol abuse In different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000; 32: 742-747.
- Bode C, Kugler V, Bode JC: Endotoxemia In patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and its subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J Hepatol* 1987; 4: 8-14.
- Purohit V, Bode JC et al.: Alcohol, intestinal bacterial growth, intestinal permeability to endotoxin, and medical consequences: summary of a symposium. *Alcohol* 2008; 42: 349-361.
- Hines IN, Wheeler MD: Recent advances In alcoholic liver disease. Role of innate immune response In alcoholic hepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: 310-340.
- McClain CJ, Hill DB, Song Z et al.: Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol* 2002; 27(1): 53-61.
- O'Neill LA: The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: Signac transduction Turing inflammation and host defense. *Sci STKE* 2000; 44: re1.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T et al.: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria cell Wall components. *Immunity* 1999; 11: 443-451.
- Barnes PJ, Karin M: Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor In chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071.
- Nanji AA, Khettry U, Sadrzadeh SM, Yamanaka T: Severity of liver injury In experimental alcoholic liver disease. Correlation with plasma endotoxin, prostaglandyn E2, leukotriene B4, and thromboxane B2. *Am J Pathol* 1993; 142: 367-373.
- Su GL: Lipopolysaccharides In liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G256-G265.
- Bauista AP: Impact of alcohol on the ability of Kupffer cells to produce chemokines and its role In alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 349-356.
- Baldini M, Lohman IC, Halonen M et al.: A polymorphism* In the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 976-983.
- Hubacek JA, Rothe G, Pit'ha J et al.: C(-260)→T polymorphism In the promotor of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99: 3218-3220.
- Arroyo-Espliguero R, Avanzas P, Jeffery S, Kaski JC: Cd14 and Toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events? www.heartjnl.com.
- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC: TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness In humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187-191.
- Ameziane N, Beillat T, Verpillat P et al.: Association of the Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism with acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: e61-64.
- Graaf C, Kullberg BJ, Joosten L, et al.: Functional consequences of the Asp299Gly Toll-like receptor-4 polymorphism. *Cytokine* 2005; 30: 264-268.
- Jarvelainen HA, Fang C, Ingelman-Sundberg M, Lindros KO: Effect of chronic coadministration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Hepatology* 1999; 29: 1503-1510.
- Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A et al.: Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin In rats. *Hepatology* 2000; 32: 1008-1017.
- Protokół izolacji dostępny na stronie: www.aabiot.com.

otrzymano/received: 17.02.2012
zaakceptowano/accepted: 15.03.2012

Adres/address:
*Jacek Łukaszkiwicz
Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej,
Wydział Farmaceutyczny WUM
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa
tel./fax: +48 (22) 572-07-35
e-mail: jacek.lukaszkiwicz@wum.edu.pl