

© Сакевич В. Д., Шликова О. А., Кайдашев І. П.
УДК 616.5-002.2.:575

ОСОБЛИВОСТІ ІМУННОГО СТАТУСУ ХВОРИХ НА АЛЕРГІЧНИЙ РИНИТ У ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ TLR 2,4 ТА ГАЛЕКТИНУ-10*

Сакевич В. Д., Шликова О. А., Кайдашев І. П.

Науково-дослідний інститут генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

В исследовании приведены теоретическое обобщение и новое решение научной задачи иммунологии и аллергологии по определению генетической детерминированности при аллергическом рините путем исследования роли толл-подобных рецепторов врожденного иммунитета с полиморфизмом TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) и CLC-10 (rs420297). В обследованных больных АР в 76% случаев имеет наследственную природу преимущественно со стороны матери (36%), начинается преимущественно в детском и подростковом возрасте (88%) и в 44% сопровождается другой аллергической патологией. При исследовании иммунного статуса больных АР у 15% больных наблюдали умеренную и высокую эозинофилию, повышение среднего уровня общего иммуноглобулина E, высокие значения которого достоверно были установлены у больных со средне-тяжелой формой течения ($p = 0,0008$), рост относительного количества $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Трег клеток со снижением содержания IL-10 и повышением IL-4. Выявлена достоверная разница между частотами генотипов в группах контроля и больных АР за полиморфизмом гена TLR 4 (Asp299Gly). Впервые исследованы популяционную распространенность полиморфизма rs420297 гена галектину-10 среди лиц, проживающих в Полтавской области (CC-76%; CT-22%; TT-2%) Обнаружена достоверная разница между частотами генотипов в группах контроля и больных АР ($p = 0,04$), полиморфизм rs420297 гена CLC-10 достоверно чаще встречается в группе больных АР. Выявлена достоверная ассоциация между наличием полиморфной аллели гена CLC-10 и уровнями $CD4^+$, $CD4^+ CD25^+$, в группе гомозиготных носителей полиморфной аллели T и аллеля C гена CLC-10 установлена достоверная ассоциация между наличием полиморфной аллели гена CLC-10 и уровнями $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$, $CD4^+$.

Ключевые слова: аллергический ринит, состояние клеточного и гуморального иммунитета полиморфизм, Toll-подобные рецепторы, галектин-10.

Алергічні захворювання, зокрема, такі поширені, як бронхіальна астма, алергічний риніт, atopічний дерматит з кожним роком стають все більш актуальною та серйозною проблемою [Kumar A., Yhosh B., 2009]. Алергічний риніт (АР) – це захворювання, що характеризується IgE-опосередкованим імунологічним запаленням, що розвивається в результаті попадання алергенів на слизову оболонку носа [Van Cauwenberge P.B. et al., 2001].

У даний час визнана точка зору, згідно з якою АР є мультифакторним захворюванням (МФЗ). Сьогодні поширеною концепцією є наслідування алергічних захворювань та визначена досить велика кількість генів, що опосередковує їх маніфестацію. Однак результати численних досліджень суперечливі: молекулярно-генетичні основи формування захворювання поки вивчені недостатньо. Все це перетворює АР в серйозну медико-соціальну проблему і диктує необхідність дослідження причин і імунологічних механізмів розвитку даного захворювання для розробки адекватних лікувально-профілактичних заходів, що враховують етнічну приналежність, імунологічну реактивність і генетичні особливості хворих.

Метою дослідження було визначення ролі поліморфізмів генів, що контролюють структурні та регуляторні елементи неспецифічної резистентності орга-

нізму (толл-подібних рецепторів: 2258G/A гену TLR2 (rs5743708), 896A/G гену TLR4 (rs4986790) та гену галектину-10 (rs420297 C/T)) у патогенезі АР, для поглиблення знань про імунологічні механізми розвитку цього захворювання.

Матеріали та методи дослідження.

Для вирішення висунутих завдань проведено обстеження 45 пацієнтів віком від 19 до 65 років хворих на АР, на стадії клінічної ремісії захворювання, які перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні четвертої міської клінічної лікарні та алергологічному відділенні Полтавської обласної клінічної лікарні ім.Скляфосовського. Групу порівняння склали 95 практично здорових осіб з банку ДНК Науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія», які були анкетовані та клінічно обстежені для виключення алергічних захворювань.

Діагноз АР встановлювали на основі критеріїв діагностики ARIA (2008) за алгоритмом діагностики прийнятим в Україні та затвердженим МОЗ України. Якість життя хворих визначали за допомогою загальноновизнаних опитувальників (Adult Rhinconjunctivitis

* Цитування при атестації кадрів: Сакевич В. Д., Шликова О. А., Кайдашев І. П. Особливості імунного статусу хворих на алергічний риніт у залежності від поліморфізму генів TLR 2,4 та галектину-10 // Проблеми екології і медицини. – 2014. – Т. 18, № 3-4. – С. 34 – 39.

Quality of Life Questionnaire). Алергологічне обстеження проводилося за загальноприйнятною методикою шляхом постановки шкірних prick-тестів (ТОВ «Імунолог», Вінниця, Україна).

Отримання периферичної крові пацієнтів здійснювали шляхом забору крові з кубітальної вени натщесерце одноразовим пластиковим шприцом в об'ємі 1 мл у стерильну суху скляну пробірку з гепарином (25 ОД/мл) для отримання суспензії мононуклеарних клітин периферичної крові; в об'ємі 4 мл у вакуумну пробірку з ЕДТА (8,4 мг К3ЕДТА) для виділення ДНК; та в об'ємі 5 мл у стерильну суху скляну пробірку без додавання антикоагулянтів для отримання сироватки.

Отримання суспензії мононуклеарних клітин периферичної крові здійснювали шляхом центрифугування в градієнті щільності фікол-верографіну (1,077 г/мл). Сироватку виділяли з периферичної крові, зібраної натщесерце у стерильну суху скляну пробірку без додавання антикоагулянтів, шляхом інкубування та центрифугування [Беркало Л.В. та ін., 2003]. Виділення геномної ДНК проводили методом фенолхлороформної екстракції [Епринцев А.Т. и др. 2008]. Визначення поліморфізмів толл-подібних рецепторів: 2258G/A гену TLR2, 896A/G гену TLR4 проведено методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Ампліфікацію проводили за допомогою ампліфікатора «Терцик» («ДНК-Технологія», Москва) за відповідною програмою з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів із наступним рестрикційним аналізом [Змайлова О.В. та ін., 2011]. Детекція продуктів ампліфікації проведена за допомогою електрофорезу в 3% агарозному гелі («Helikon», Москва) в 1 x TBE (50 мМ трис-Н₃ВО₃ та 2 мМ ЕДТА, рН 8.0) з подальшою візуалізацією результатів у УФ-світлі та фотографуванням.

Для визначення поліморфізму генів проводили виділення геномної ДНК з периферичної крові обстежуваних за допомогою набору «ДНК-експрес-кровь» (ООО НПФ «Литех», Росія), ампліфікували за допомогою алей-специфічної полімеразної ланцюгової реакції в 35 мкл реакційної суміші з додаванням по 5 пкмоль специфічних праймерів. Продукти ампліфікації гену галектину-10 ідентифікували за допомогою флуорисцентної реєстрації накопичення ДНК за каналами флуоресценції.

Фенотип лімфоцитів аналізували за допомогою визначення рівнів експресії поверхневих антигенів клітин CD4, CD25 та внутрішньоклітинного білка Foxp3⁺ методом проточної цитофлуориметрії («EPICS XL-MCL» («Beckman Coulter», США) за стандартною методикою, використовуючи відповідні моноклональні антитіла (виробництво «Сорбент», Росія; «eBioscience», США).

З метою визначення стану гуморальної ланки імунітету хворих на АР визначали рівень загального IgE в сироватці крові визначали за принципом двосайтового (сендвіч) імуноферментного аналізу за допомогою тест-системи ІФА для кількісного визначення загального IgE (ТОВ «Укрмед-Дон», Україна). Кількісне визначення інтерлейкіну-4 та інтерлейкіну – 10 у хворих на АР проводили за допомогою тест-системи ІФА для кількісного визначення інтерлейкіну – 4 та інтерлейкіну – 10 ТОВ «Укрмед-Дон» (Україна) згідно інструкцій до наборів. Оптичну густину досліджуваних зразків визначали на імуноферментному аналізаторі «Stat-Fax 2100» (USA) при довжині хвилі 450 нм.

Статистичну обробку отриманих результатів провели за допомогою статистичного пакету STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., USA) згідно з рекомендаціями. Порівняння частот генотипів між досліджуваними групами проводили шляхом аналізу таблиць спряженості за допомогою точного тесту Фішера. Для порівняння частот алелей використовували критерій χ^2 . Для оцінки достовірності відмінностей між групами використовували точний двосторонній критерій Фішера (для малих груп). Для усіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення.

Вивчення обстежуваних 45 хворих на АР віком від 19 до 65 років (серед яких жінки склали 49%, а чоловіки 51%) показало, що в залежності від періодичності впливу алергену, характеру перебігу та частоти симптомів у 27% (12 хворих) виявлений цілорічний (або персистуючий) АР та у 73% (33 хворих) сезонний (або інтермітуючий) АР. Ступінь тяжкості захворювання оцінювався на основі загальноприйнятих критеріїв діагностики АRIA (2008) [Brozek J.L. et al., 2008] з урахуванням анамнестичних показників, тяжкості клінічних проявів, їх впливу на загальний стан та якість життя (працездатність, навчання, відпочинок, денну активність, сон та ін.), частоти застосування лікарських засобів та їх ефективності. На основі цього встановили легкий перебіг – у 11 (25%), середньо-важкий – у 32 (71%), важкий – у 2 (4%) обстежених хворих на АР. Ускладнений АР виявлений у 32% обстежених хворих. Серед них найбільш поширеними виявились: риносинусит полипозний-18%, середній отит-9%, дисфункція евстахієвих труб та ларингіт – 6%.

Анамнестично встановлено, що розвиток захворювання пов'язаний із впливом алергенів на організм переважно в дитячому віці – 56% (25 хворих), а також в підлітковому та молодому відповідно – 32% (14 хворих) та 12% (6 хворих), що зумовлено особливостями імунної системи в дитячому віці [Дранник Г.Н., 2010]. Наявність алергічних захворювань у родичів I-II ступеню спорідненості з боку матері виявлена в 35%, з боку батька – у 30%, з боку обох батьків-у 11% усіх обстежених хворих на АР, що узгоджується з науковими даними щодо переважного зв'язку з алергічними захворюваннями з боку матері [Охотникова Е.Н., 2008].

При алергологічному обстеженні хворих на АР у 89% пацієнтів були виявлені позитивні шкірні проби на пилокві, грибокві, побутові, епідермальні та харчові алергени, при чому у 7% мала місце сенсibilізація до однієї групи алергену, у 29%-до двох груп, у 36%-до трьох груп, у 13%-до чотирьох груп, а в 4%-до всіх п'яти груп алергенів.

Концепція наслідування АР, що реалізується дисфункцією імунної системи, доведена клінічними спостереженнями та в наш час не викликає сумнівів [Охотникова Е.Н., 2008]. У патогенезі АР зазвичай провідними розглядають IgE-опосередковані імунні реакції [Дранник Г.Н., 2010]. Результати численних досліджень спонукали учених до пошуку нових концепцій імунопатогенезу АР. Відкриття Т-регуляторних (T_{reg}) клітин визначає шлях до розуміння механізмів периферичної толерантності та індукції T_H1-та T_H2 – опосередкованих імунних реакцій, дисбаланс яких супроводжує розвиток АР. Відомо, що важливим є не стільки співвідношення T_H1> T_H2, скільки активація відповідних Т-регуляторів імунної відповіді [Титова

Н.Д., 2009]. Крім того, вважається доведеним, що лише на ранніх стадіях формування АР домінує Тх1 вплив, а пізніше дисбаланс Тх1/Тх2 визначається на користь Тх2. Слід зазначити, що в більшості випадків чхання, свербіж у носі, ринорея, закладеність носа були сильніше виражені саме в пізню фазу алергічної реакції 1 типу, де провідну роль відіграють Тх2 [Lityvakova L.I. et al., 2001].

Досліджені показники периферичної крові та показники імунного статусу хворих на АР в стадії ремісії (рівень лейкоцитів, відносна кількість лімфоцитів, відносна кількість еозинофілів) в цілому відповідали нормальним показникам практично здорових осіб (табл.1) [Литвинов А.В., 2007].

Таблиця 1
Імунологічні показники обстежених хворих на АР

| Показник | Показники практично здорових осіб | Показники хворих на АР, n=45 |
|---|-----------------------------------|------------------------------|
| Загальний IgE, МОд/мл | 0 – 130 | 198,2 ± 11,42 |
| CD4 ⁺ , % | 39 ± 5 | 40,5 ± 1,02 |
| CD4 ⁺ /CD25 ⁺ , % | 9,4 ± 2,05 | 16,5 ± 1,9 (0,25) |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ , % | 5-10% від CD4 ⁺ | 4,66 ± 0,38 |
| ІЛ-10, пг/мл | 0-50 пг/мл | 0,35 ± 0,016 |
| ІЛ-4, пг/мл | 0-20 пг/мл | 50,34 ± 3,58 |

Однак у 15% пацієнтів виявлена еозинофілія зі збільшенням абсолютної та відносної кількості еозинофілів. При визначенні рівня загального IgE у 76% пацієнтів відзначається достовірне підвищення показників, рівень загального IgE становив 198,2 ± 11,42 МО/мл, що підтверджує провідну роль IgE-опосередкованих імунних реакцій при atopії [Johansson S.G.O et al., 2001; Kaidashev I.P., 2009].

Слід зазначити зростання відносної кількості CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Трег клітин у порівнянні з показниками практично здорових людей, що узгоджується з результатами сучасних досліджень [Bellinghausen I. et al., 2003; Schmidt-Weber C.V. et al., 2005]. Отримані дані підтверджують концепцію, що імунна відповідь на алергени у здорових осіб та хворих на алергію є результатом співвідношення між алергенспецифічними Трег клітинами та Th2 клітинами [Bellinghausen I. et al., 2003; Takahashi T. et al., 2000].

Виявлені порушення цитокинової регуляції у обстежених хворих на АР, а саме підвищення вмісту ІЛ-4 (84%) що підсилює виживання еозинофілів. В середньому показник складав 50,34 ± 3,58 пг/мл, що в 2,5 рази перевищує значення показників здорових осіб.

Важливими складовими клітинної імунної відповіді є Трег клітини, що регулюють функцію Т-хелперів та Т-цитотоксичних клітин, забезпечуючи спрямованість Th1/Th2 типів імунної відповіді. Дослідження останніх років вказують на існування індукційних ІЛ-10-продукуючих Трег клітин [Фрейдлин І.С., 2005; Бережная Н.М., 2013]. За нашими даними рівень супресорного цитокіна ІЛ-10 у хворих на АР у середньому склав 0,35 ± 0,016 пг/мл.

Згідно з сучасними дослідженнями, гени atopії та пов'язаних з нею станів сконцентровано в основному у 10 ділянках геному людини [Carroll W., 2005]. Існують відомості щодо асоціації алергічного риніту із поліморфізмом гену TIM-1 [Mou Z. et al., 2010], CD14 [Han D et al., 2010], TLR 2-4 [Kang I. et al., 2010], RNase 3 [Kang I. et al., 2010].

З метою визначення ролі поліморфізму окремих генів, які контролюють структурні та регуляторні елементи неспецифічної резистентності організму, в розвитку алергічного риніту, визначена розповсюдженість поліморфізму гену TLR2 (rs5743708), гену TLR 4 (rs4986790) та гену CLC-10 (rs420297) в групі спостереження і в групі популяційного контролю, проведено аналіз імунологічних показників та клінічних проявів у

хворих з поліморфними варіантами досліджуваних генів. Шляхом молекулярно-генетичного дослідження серед хворих на АР було виділено носіїв поліморфних алелей та проведено аналіз розподілу генотипів за досліджуваними поліморфізмами.

В осіб, що входили до групи контролю, частота генотипу TLR2 GG становила 97,8%; частота гетерозиготного генотипу GA – 2,2%, поліморфний генотип AA не був виявлений. У групі хворих на АР відповідні результати були такими: GG – 93,3%, GA – 6,6% та AA також не був виявлений. Не виявлено достовірного зв'язку між частотою появи поліморфної алелі А в групі контролю та хворих на АР ($\chi^2 = 0,74$; $p = 0,34$). Отримані результати відсутності асоціації поліморфізму 2258G/A гену TLR2 з АР узгоджуються з іншими науковими даними [Modrzynski M., 2007].

При дослідженні поліморфізму гену rs4986790 TLR4 в групі контролю частота поліморфного генотипу AA становила 95,6%, гетерозиготного генотипу AG – 4,5%, поліморфний генотип GG не виявлений. У хворих на АР відповідно: AA – 92,3%, AG – 7,7% та GG – не виявлений. Достовірно значно вищою виявилася різниця між частотами генотипів у групах контролю та хворих на АР ($p = 0,03$). Частота поліморфної алелі G в групі хворих на АР склала 7,7% ($\chi^2 = 3,58$; $p = 0,06$) у порівнянні з групою контролю, виявлена різниця на рівні статистичної тенденції [Davila I. et al., 2009].

Функціональний поліморфізм гену TLR4 полягає в заміні аспарагінової кислоти на гліцинову Asp299Gly1187 (rs4986790) [Montes A.H. et al., 2006]. У результаті знижується здатність TLR4 до розпізнавання відповідних лігандів або до проведення внутрішньоклітинних сигналів, що призводить до менш вираженої активації клітин імунної системи після зустрічі з патогеном. [Schnare M. et al., 2006; Байракова О.Л. и др., 2008]. Функціональний поліморфізм TLR4 порушує регуляцію вродженої імунної відповіді, що є основним чинником дисбалансу Т1/Т2-хелперів [Симбирцев А.С., 2005]. Подібний механізм відіграє вирішальну роль у формуванні хронічного запального процесу та привертає увагу як потенційний чинник ризику розвитку atopічної патології, зокрема АР [Kang I. et al., 2010].

При дослідженні поліморфізму rs420297 С/Т гену CLC-10 у групі контролю частота генотипу СС становила 75,56%, гетерозиготного генотипу СТ – 22,22%, генотип ТТ – 2,22%. У хворих на АР відповідно: СС – 57,78%, СТ – 24,44% та ТТ – 17,78%.

Виявлена достовірна різниця між частотами генотипів у групах контролю та хворих на АР ($p = 0,04$). Достовірно значно вищою виявилася різниця за частотою поліморфної алелі Т в групі хворих на АР-30% ($\chi^2 = 6,42$; $p = 0,011$), у порівнянні з групою контролю. У дослідженнях закордонних учених вивченню асоціації алергічного риніту із поліморфізмом гену галектину-10 (CLC-10) останнім часом приділяється особлива увага [Bryborn M. et al., 2010].

Генетичні маркери можуть визначати схильність до захворювання або бути асоційованими з відповідними патогенетично значущими показниками. Тому в межах пропонованого дослідження було вивчено вплив поліморфізму гену TLR2 (rs5743708), гену TLR 4 (Asp299Gly) та гену CLC-10 (rs420297) на перебіг та особливості клінічних проявів АР. Під час аналізу відмінності за частотою виявлення цілорічної та сезонної форми перебігу між групами хворих на АР залежно від генотипів поліморфізму 2258G/A гену TLR2 та гену TLR 4 (Asp299Gly) не мали статистичної значущості.

Слід зазначити наявність вірогідних відмінностей між групами залежно від генотипів поліморфізму гену TLR4 Asp 299 Gly за наявністю супутніх алергічних захворювань. Достовірно, що частіше у цих хворих на АР виявляли супутню БА ($p=0,0003$), супутній АД (0,0031) та БА у поєднанні з АД ($p=0,0005$). Вірогідні відмінності між групами залежно від генотипів поліморфізму rs420297 C/T гену галектину-10 були виявлені за клінічними формами АР. Достовірно, що частіше у хворих на АР з поліморфною алеллю галектину-10 виявляли цілорічну форму АР ($p=0,0001$).

Як зазначалося раніше, порушення рівноваги T1/T2-хелперів з переважанням Th-2 імунної відповіді відіграє провідну роль в розвитку АР. У відповідь на вплив алергенів у хворих на АР відбувається вивільнення Th2-цитокінів та індукується активація еозинофілів, опасистих клітин та підвищений синтез IgE. Існують відомості, що зазначені реакції відбуваються опосередковано через TLR2,4 [Крючко Т.О. та ін., 2011; Ahmad-Nejad P. et al., 2004]. Відомо також, що галектин-10 є необхідним для здійснення регуляторної активності T_{reg} клітин [Kubach I. et al., 2007].

З метою виявлення відмінностей між хворими на АР залежно від досліджуваних поліморфізмів гену імунологічними показниками було проведено порівняння відповідних груп з використанням критерію Манна-Уїтні.

Виявлена достовірна різниця між групами хворих на АР з наявністю алелі А гену TLR2 та гомозиготними носіями алелі G за показником CD4⁺ ($U_{(n=42;n= 3)} = 12,00$; $p=0,020$).

Виявлена достовірна різниця між групами хворих на АР з наявністю поліморфної алелі Т гену CLC-10 та гомозиготними носіями алелі С за показником CD4⁺ ($U_{(n=26;n= 9)} = 139,50$; $p=0,014$). Слід зазначити, що рівень експресії молекул CD4⁺ у хворих на АР з алеллю Т гену галектину-10 в середньому мав тенденцію до збільшення, а у хворих на АР носіїв алелі С не виходив за межі показників практично здорових осіб (табл.2).

Таблиця 2

Відмінності за імунологічними показниками хворих на АР залежно від генотипів поліморфізму гену галектину-10

| Показник | Хворі на АР з генотипами СТ+ТТ, (n=19) | Хворі на АР з генотипом СС, (n=26) |
|--|---|------------------------------------|
| CD4 ⁺ , % | 44,14±1,92 | 37,92±1,37 |
| U, p | $U_{(n=26;n= 19)} = 139,50$; $p=0,014$ | |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ , % | 11,09±1,32 | 21,16±2,96 |
| U, p | $U_{(n=26;n= 19)} = 136,00$; $p=0,012$ | |
| Загальний IgE, МОд/мл | 234,86±12,46 | 171,48±15,74 |
| U, p | $U_{(n=26;n= 19)} = 138,50$; $p=0,013$ | |
| ІЛ-4, пг/мл | 61,61±5,30 | 42,11± 4,22 |
| U, p | $U_{(n=26;n= 19)} = 123,00$; $p=0,004$ | |
| ІЛ-10, пг/мл | 0,303±0,11 | 0,394±0,024 |
| U, p | $U_{(n=26;n= 19)} = 136,50$; $p=0,011$ | |

U, p відмінності між групами за критерієм Манна-Уїтні

Також група хворих на АР з алеллю Т гену CLC-10 достовірно відрізнялась за вищим значенням рівня CD4⁺CD25⁺ ($U_{(n=26;n= 9)} = 136,00$; $p=0,012$) від групи хворих на АР гомозиготних носіїв алелі С. Отже, галектин-10 є необхідним для здійснення регуляторної активності T_{reg} клітин.

При порівнянні показників загального IgE у груп хворих залежно від генотипів поліморфізму гену CLC-10 достовірно були встановлені вищі значення рівню IgE у хворих на АР з алеллю Т гену CLC-10 ($U_{(n=26;n= 9)} = 138,50$; $p=0,013$) який становив 234,86±12,46 МО/мл.

Виявлені порушення цитокінової регуляції з достовірним підвищенням показників ІЛ-4, що підсилює виживання еозинофілів. Між групами хворих залежно від поліморфізму гену CLC-10 встановлені достовірно вищі значення показників ІЛ-4 у хворих на АР з алеллю Т гену CLC-10 ($U_{(n=26;n= 9)} = 123,00$; $p=0,004$), рівень якого становив 61,61±5,30 пг/мл.

Рівень супресорного цитокіна ІЛ-10 у хворих на АР у середньому склав 0,35 ± 0,016 пг/мл. Це може бути пов'язаним з різними формами АР, коли у хворих з

хронічною формою процесу рівень концентрації ІЛ-10 може значно знижуватись порівняно з показниками гострої стадії захворювання (може пояснюватися збільшенням концентрації у сироватці цитокінів Тх-1 профілю) або залишатися підвищеним відповідно до показників норми [Дранник Г.Н., 2010]. Між групами хворих залежно від поліморфізму гену галектину-10 була виявлена різниця за показниками рівню ІЛ10; вищі значення якого достовірно були встановлені у хворих на АР гомозиготних носіїв алелі С ($U_{(n=26;n= 9)} = 136,50$; $p=0,038$) та склали 0,394±0,024 пг/мл.

Виявлена достовірна різниця між групами хворих на АР гомозиготними носіями алелі Т гену CLC-10 та гомозиготними носіями алелі С за показником CD4⁺ ($U_{(n=26;n= 19)} = 37,00$; $p=0,006$). Також група хворих на АР гомозиготних носіїв алеллі Т гену CLC-10 достовірно відрізнялась за вищим значенням рівня CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ($U_{(n=26;n=8)} = 52,50$; $p=0,037$) від групи хворих на АР гомозиготних носіїв алелі гену CLC-10 (табл. 3).

Таблиця 3
Відмінності за імунологічними показниками хворих на АР залежно від генотипів поліморфізму гену галектину-10 гомозиготних носіїв

| Показник | Хворі на АР з генотипом ТТ гену галектину-10, (n=8) | Хворі на АР з генотипом СС гену галектину-10, (n=26) |
|--|---|--|
| CD4 ⁺ , % | 46,96±2,30 | 37,91± 1,37 |
| U, p | U _(n=8;n=26) = 37,00; p=0,006 | |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ , % (тис/мкл) | 6,61±1,54 | 4,08± 0,35 |
| U, p | U _(n=8;n=26) = 52,50; p=0,037 | |

U, p – відмінності між групами за критерієм Манна-Уїтні.

Отримані результати підтверджують, що, незважаючи на значну внутріклітинну експресію галектину-10 в CD25⁺ T_{reg} клітинах, він безпосередньо не бере участі в пригніченні функції CD25⁺ T_{reg} клітин, однак специфічна блокада галектину-10 відновлює проліферативну здатність CD25⁺ T_{reg} клітин та підсилює їх супресивні функції. Отже, галектин-10 є необхідним для здійснення регуляторної активності T_{reg} клітин [Kubach I. et al., 2007].

Отже, виявлені в результаті дослідження зміни і взаємозв'язки клініко-імунологічних показників у хворих на АР носіїв поліморфних алелей генів TLR2, TLR4, CLC-10 дозволяють припустити важливе значення зазначених поліморфізмів у визначенні перебігу АР, наявності супутньої патології, полівалентної алергії у хворих на АР та реалізації імунних механізмів у патогенезі захворювання.

Висновки

1. В обстежених хворих АР у 76% випадків має спадкову природу переважно з боку матері (36%), розпочинається переважно в дитячому і підлітковому віці (88%) і в 44% супроводжується іншою алергічною патологією. Визначені клінічні форми АР-у 27% цілорічний та у 73% сезонний, за ступенем тяжкості виявили: легкий – у 32%, середньотяжкий – у 62%, тяжкий – у 6% перебіг захворювання. При алергологічному обстеженні у 89% хворих на АР виявили позитивні шкірні проби на побутові, епідермальні, пилкові, харчові та грибкові алергени. У 82% хворих виявлена полівалентна сенсibiliзація до двох і більше груп алергенів.

2. При дослідженні імунного статусу хворих АР у 15% хворих спостерігали еозинofilію, підвищення середнього рівня загального імуноглобуліну Е, зростання відносної кількості CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg} клітин із зниженням вмісту IL-10 та підвищенням IL-4.

3. У групі хворих на АР встановлена розповсюдженість поліморфізму гену TLR2 (rs5743708): генотип GG становив 93,3%, генотип GA – 6,6%, генотип AA не зустрічався. Виявлена достовірна різниця між групами хворих на АР з наявністю поліморфної алелі гену TLR2 та гомозиготними носіями алелю G за показником CD4⁺ (U_(n=42;n=3) = 12,00; p=0,020).

4. У групі хворих на АР встановлена розповсюдженість поліморфізму гену TLR4 (Asp299Gly): генотип AA становив 92,3%, генотип AG – 7,7%, генотип GG не зустрічався. Виявлена достовірна різниця між групами генотипів у групах контролю та хворих на АР (p = 0,03). У хворих на АР носіїв алелю G за поліморфізмом 896A/G гену TLR4 виявлена атопічна патологія: супутня БА (p=0,0003), супутній АД (0,0031) та БА у поєднанні з АД (p=0,0005).

5. Розповсюдженість поліморфізму rs420297 гену галектину-10 серед осіб, що проживають в Полтавсь-

кій області складає СС-76%; СТ-22%; ТТ-2%. Виявлена достовірна різниця між частотами генотипів у групах контролю та хворих на АР (p = 0,04), поліморфізм rs420297 гену CLC-10 достовірно частіше зустрічається в групі хворих на АР. Виявлена достовірна різниця за частотою алелю Т CLC-10 в групі хворих на АР-30%, у порівнянні з групою контролю-13% (χ² = 6,42; p = 0,011). Розвиток та перебіг алергічного риніту асоційований з поліморфізмом rs420297 гену CLC-10 (достовірно частіше у хворих на АР з мутантною алеллю CLC-10 виявляли цілорічну форму АР (p=0,0001)).

6. Виявлена достовірна асоціація між наявністю поліморфної алелі гену CLC-10 та рівнями CD4⁺ (p=0,014), CD4⁺ CD25⁺ (p=0,012), в групі гомозиготних носіїв поліморфної алелі Т та алелі С гену CLC-10, встановлена достовірна асоціація між наявністю поліморфної алелі гену CLC-10 та рівнями CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (p=0,037), CD4⁺ (p=0,014). Встановлено, що особи які несуть поліморфну алель гену CLC-10 мають достовірно вищі рівні IgE (p=0,013) та ІЛ-4 (p=0,004) та нижчий рівень ІЛ10 (p=0,038).

Література.

1. Van Cauwenberge P.B., Ciprandi G., Vermeiren J.S.J. Epidemiology of Allergic Rhinitis. - The UCB Institute of allergy, 2001. – 27p
2. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О. та ін.]; під ред. проф. Кайдашева І.П. – Полтава : Полімет, 2003. – 320 с.
3. Ізмайлова О.В. Зв'язок поліморфізмів генів TLR2 та TLR4 зі схильністю до окремих урогенітальних інфекцій./ О.В. Ізмайлова, О.А. Шликова, Н.О. Боброва [та ін.].// Цитология и генетика – 2011. - № 4. – P. 29-35.
4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю.Реброва – М.: МедиаСфера, 2002.- 312 с.
5. Brozek J.L., Baena-Cagnani C.E, Bonini S. et al. Methodology for development the Allergic Rhinitis and its Impact of Asthma Guideline 2008 update // Allergy. - 2008.- Vol.63(1).- P.38-46
6. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология / Георгий Николаевич Дранник. – К.: ООО «Полиграф плюс», 2010. – 552 с.
7. Охотникова Е.Н. Аллергический «марш»: связь поколений и эскалация аллергии у детей (лекция) // Современ. педиатрия. - 2008. - №4(21). - С.190-197
8. Титова Н.Д. Значение врожденной системы иммунитета в возникновении аллергических заболеваний.// Иммунология, аллергология, инфектология.-2009-(3).- P.32-39.
9. Lityvakova L.I., Baraniuk J.N. Nasal provocation testing: a review. Ann. Allergy Asthma Immunol. – 2001. - Vol. 86. - P. 355-364.
10. Норма в медицинской практике: Справочное пособие / Составит. А.В. Литвинов. – М.: МЕДпресс-информ, 2007. – 144 с.
11. Kaidashev I.P. The allergen-specific IgE reactivity pattern of Ukrainian allergic patients // Проблеми екології та медицини. -2009.- №2-3.- С.8-14

12. Bellinghausen I., Klostermann B., Knop J., Saloga J. Human CD4⁺CD25⁺ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress Th1 and Th2 cytokine production // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2003. – Vol. 111. – P. 862-868
13. Фрейдін М.Б., Брагіна Е.Ю., Огородова Л.М., Плузырев В.П. Полиморфізм генів глутатіонтрансфераз q1 і m1 (GSTT1 і GSTM1) у больних atopічної бронхіальної астмою в Західно-Сибірському регіоні // *Молекулярна біологія.* – 2002. – Т.36. – № 4. – С.630-634.
14. Han D., She W., Zhang L. Association of the CD 14 gene polymorphism C-159 T with allergic rhinitis// *Am J Rhinol Allergy.* – 2010. – 24 (1). – P.1-3
15. Куценко, Н. Л. Полиморфізм Toll-подібного рецептора 2Arg753Gln зв'язан з підвищеним рівнем синтезу специфічних іммуноглобулінів Е у больних алергічними захворюваннями / Н.Л. Куценко, О. В. Измайлова, Л. Э. Веснина // *Аллергология и иммунология.* – 2011. –Т.12, №3. – С. 233 – 236.
16. I Dávila, J Mullol, M Ferrer, J Bartra, A del Cuvillo, J Montoro, I Jáuregui, J Sastre, A Valero; Genetic Aspects of Allergic Rhinitis // *J Investig Allergol Clin Immunol.* – 2009. – Vol. 19., Suppl. 1. – P. 25-31
17. Presymptomatic differences in Toll-like receptor function in infants who have allergy / S.L. Prescott, P. Noakes, B.W.Y. Chow [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – V. 122, № 2. – P. 391–399
18. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin -10 as a novel marker essential for their anergic and suppressive function//Kubach I.,Lutter P., Bopp T. [et al.] //*Blood.*- 2007.-Vol.110(5).-P.1550-1558

ENGLISH VERSION: FEATURES OF THE IMMUNE STATUS OF PATIENTS WITH ALLERGIC RHINITIS, DEPENDING ON TLR 2,4 AND 10 «GALECTIN» GENE POLYMORPHISM*

Shlykova V. D., Shlykova O.A., Kaidashev I. P.

Research Institute for Genetic and Immunological Bases of Pathology and Pharmacogenetics of Higher State Education Establishment of Ukraine " Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava

The study presented theoretical generalization and a new resolve of scientific task in Immunology and Allergology concerning the definition of genetic determinism in allergic rhinitis by examining the role of Toll-like receptors of innate immunity by polymorphisms TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) and CLC-10 (rs420297). In examined patients in 76% of cases, AR is predominantly hereditary nature of the mother (36%), mostly begin in childhood and adolescence (88%) and 44% is accompanied by other allergic diseases. In the study of the immune status of patients with AR in 15% of patients one observed moderate and high eosinophilia, increase the average level of total immunoglobulin E, which is significantly higher values have been established in patients with moderate and severe forms of motion (p = 0.0008) increase in the relative number of CD4 CD25 MPER Foxp3 cells with reducing the amount of IL-10 and IL-4 increase. Significant differences between the frequencies of genotypes in the control group and patients with AR gene polymorphism by TLR 4 (Asp299Gly) were found. For the first time the population-based prevalence of polymorphism rs420297 gene «Galectin»u-10 among persons living in Poltava region (SS-76%, ST-22%, TT-2%) revealed significant differences between the frequencies of genotypes in the control group and patients with AR (p = 0.04), rs420297 polymorphism of the gene CLC-10 was significantly more common in patients with RA. Significant association between the presence of polymorphic alleles of the gene CLC-10 levels and CD4⁺, CD4⁺ CD25⁺, in the group of homozygous carriers of polymorphic alleles T and C alleles of the gene CLC-10 were revealed. The authentic association between the presence of polymorphic alleles of the gene CLC-10 levels and CD4+CD25+Foxp3+, CD4+was found.

Keywords: allergic rhinitis, cellular and humoral immunity polymorphism, Toll-like receptors, «Galectin»-10.

Allergic diseases, including asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis every year become more urgent and serious problem. Allergic rhinitis (AR) is a disease characterized by IgE-mediated immunological inflammation that is caused by penetration of allergens on the nasal mucosa [1].

Currently recognized point of view, according to which AR is a multifactorial disease (MFZ). Now prevalent concept is an imitation of allergic diseases and identified quite a number of genes that mediate their demonstration. However, the results of numerous studies are controversial molecular genetic basis of disease formation yet insufficiently studied. This turns the AR into a serious medical and social problem and necessitates the study of the causes and immunological mechanisms of this disease to develop adequate therapeutic and preventive measures, taking into account ethnicity, immunological reactivity and genetic characteristics of patients.

The aim of the study was to determine the role of polymorphisms of genes that control the structural and regulatory elements of nonspecific resistance of the organism (Toll-like receptors: 2258G /A gene TLR2 (rs5743708), 896A / G gene TLR4 (rs4986790) and «Galectin»u-10 gene (rs420297 C / T)) in the pathogenesis of RA, to further the understanding of the immunological mechanisms of this disease.

Materials and methods.

To solve the nominated tasks examined 45 patients aged 19 to 65 patients with AR at the stage of clinical remission who were dispensary in outpatient department of the Fourth City Hospital and Allergic department of Poltava Regional Hospital im.Sklifosovskoho. Comparison group consisted of 95 healthy persons from DNA of-bank Research-Institute for Genetic and immunological bases of pathology and pharmacogenetics State Higher School of Ukraine "Ukrainian Medical

* To cite this English version: Shlykova V. D., Shlykova O.A., Kaidashev I. P. Features of the immune status of patients with allergic rhinitis, depending on the gene polymorphism TLR 2,4 and 10 haleyntynu // *Problemy ekologii ta medytsyny.* - 2014. - Vol 18, № 3-4. - P. 39 -43.