

070-056.3
198

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

ЛЯХОВСЬКА НАТАЛІЯ ВЯЧЕСЛАВІВНА

070-056.3-06; 070-248;
УДК 575+616.516-092

0726.05

**РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ ТОЛЛ-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ 2, 4
ТА БІЛКУ КЛІТИН КЛАРА В РОЗВИТКУ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ**

14.03.08 – імунологія та алергологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Київ – 2015

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. За прогнозами учених XXI століття стане століттям алергічних захворювань, частота яких за останні два десятиріччя у всьому світі суттєво збільшилась (Дранник Г.Н., 2010; Peter J. Gergen, 2009). Численні генетичні та епідеміологічні дослідження визначають роль певних генів та факторів зовнішнього середовища у розвитку бронхіальної астми (БА). Зростанню розповсюдженості цієї патології сприяють сучасний урбанізований спосіб життя та вплив несприятливих умов довкілля, інфекцій, пасивного паління та багато іншого. Останнім часом вивчаються асоціації ряду генів з процесом розвитку БА, список генів-кандидатів постійно розширюється (Фрейдин М.Б., 2011). До цього часу немає чіткого уявлення про роль кожного гена, взаємодію мутантних генів і факторів зовнішнього впливу у патогенезі БА.

Серед можливих генів-кандидатів виділяють толл-подібні рецептори (TLR), які першими сприймають сигнал загрози від патогенів та мобілізують імунну систему (Бережная Н.М., 2008). При наявності функціонального поліморфізму TLR, обумовленого замінами одиничних нуклеотидів, знижується здатність до розпізнавання відповідних ліганд, що призводить до порушення активації клітин імунної системи. TLR широко досліджуються, доведена їх роль у патогенезі ряду захворювань: atopічної БА у дітей (Крючко Т.О. та ін., 2011), цукрового діабету (Сульская Ю.В., 2009), ревматоїдного артрити (Белоглазова К.В. та ін., 2009), бронхіоліту (Tal G. et al., 2008), атеросклерозу (Скочко О.В. та ін., 2011), урогенітальних інфекцій (Ізмайлова О.В. та ін., 2011), запальних хвороб пародонту (Островська Л.Й. та ін., 2009), хронічного саркоїдозу (Pabst S. et al., 2006), герпесвірусної інфекції (Ганковская О.А. та ін., 2009) та інших. Ряд авторів відмітили зв'язок поліморфізму генів TLR з розвитком різних фенотипів БА, це у першу чергу стосується TLR4 (I.A Yang et al., 2009), TLR2 (F-H Qian, 2010).

Важливу роль у патогенезі БА відіграють Ig E (Beeh K. et al., 2008), T-регуляторні клітини (Sakaguchi S. et al., 2009) та інтерлейкіни 4, 10 (Sevhan B.V. et al., 2010). Відомо, що наявність специфічних Ig E-антитіл в сироватці крові хворого до алергенів є основним імунологічним маркером сенсibiliзації (Beeh K. et al., 2008).

Установлено, що T-регуляторні клітини можуть пригнічувати T-хелпер 2 відповідь на алергени, еозинофілію в дихальних шляхах, гіперсекрецію слизу і бронхіальну гіперреактивність (Li M., 2009). Деякі дослідники (Wei W. et al., 2010) не виявили впливу експресії CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-клітин впливати на продукцію цитокінів у хворих з проявами алергії. У осіб з високим рівнем IL-4 порушеною регуляцією

Ді М., 2009) Деякі дослідники (Wei W. et al., 2010) не виявили впливу експресії CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-клітин впливати на продукцію цитокінів у хворих з проявами алергії. У осіб з високим рівнем IL-4 порушеною регуляцією

a - 13522

IL-10 здатність Т-регуляторних клітин до імуносупресії в значній мірі визначалася кількістю і типом алергену. Доведено, що натуральні регуляторні клітини у хворих на БА характеризувалися вираженим дефектом здатності індукувати імунну відповідь. Порушена функція Т-регуляторних клітин пов'язана зі зниженою експресією IL-10 і тяжкістю захворювання (Khoá D. et al., 2009).

Важливим фактором термінальних відділів бронхіального дерева є білок клітин Клара (Clara cell's protein). Існує інформація, що один із білків клітин Клара з питомою вагою 16 кДа (CC 16) відіграє важливу протизапальну роль у легеневій тканині (Oberdorster G. et al., 2009). Вивчення участі CC 16 в імунологічній відповіді дозволило зробити висновки (Hung C. et al., 2009), що ці білки здатні впливати на баланс між Th1/Th2. Конкретна роль та точна функція цих протеїнів повністю не відома; недостатньо вивчений вплив генетичних варіантів CC 16 на розвиток БА.

Одночасне вивчення параметрів імунітету та поліморфізмів генів TLR 2,4 та CC16 у поєднанні з клініко-лабораторними даними, дозволяє застосовувати системний підхід для з'ясування маловідомих патогенетичних ланок БА.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота є самостійним фрагментом науково-дослідної роботи Вищого державного навчального закладу України "Українська медична стоматологічна академія" за угодою МОЗ України "Вивчення генетичних особливостей розвитку алергічного запалення та формування органів-мішеней", номер державної реєстрації 0110U003032.

Мета та задачі дослідження. Визначити роль поліморфізмів 2258G/A гену TLR 2, 896A/G гену TLR 4, A38G гену CC 16 у взаємозв'язку з рівнями Т-регуляторних клітин, IgE, IL-4, IL-10 у патогенезі БА, для поглиблення знань про імунологічні механізми розвитку цього захворювання.

Відповідно до мети роботи нами були визначені такі завдання:

1. Сформувати групи спостереження: хворі на БА та група популяційного контролю, підтвердити діагноз, визначити профіль сенсibilізації хворих, дослідити рівні Ig E, IL-4, IL-10.
2. Визначити рівень Т-регуляторних клітин (CD4⁺CD25⁺Foxp3) у крові хворих на БА.
3. Дослідити розповсюдженість поліморфізмів 2258G/A гену TLR 2 у хворих на БА та в групі популяційного контролю.
4. З'ясувати частоту поліморфізмів 896A/G гену TLR 4 в групі спостереження (хворі на БА) та в контрольній групі.
5. Оцінити частоту поліморфізмів A38G гену CC 16 у пацієнтів з БА та в групі контролю.

6. Провести статистичний аналіз для виявлення зв'язків між активністю БА, рівнем алергічного запалення та наявністю поліморфних варіантів генів.

Об'єкт дослідження – імунгенетичні механізми, що визначають розвиток та клінічний перебіг БА.

Предмет дослідження – роль поліморфізмів генів TLR 2, TLR 4, CC 16 та стану Т-регуляторних клітин у розвитку та перебігу алергічного запалення у хворих на БА.

Методи дослідження – особливості клінічного перебігу БА визначалися за скаргами, анамнезом та даними об'єктивного обстеження. Усім пацієнтам була проведена спірометрія із тестом зворотної бронхіальної обструкції. Рівень сенсibiliзації у хворих визначався за допомогою прік-тесту до найрозповсюдженіших алергенів. Алергічне запалення характеризувалося вмістом в сироватці крові Ig E, IL-4, IL -10, що визначалися імуноферментним методом. Кількість CD4⁺CD25⁺Foxp3 – Т-клітин визначалася методом проточної цитофлюориметрії. Вивчення поліморфізмів генів 2258G/A гену TLR 2, 896A/G гену TLR 4, а також A38G гену CC 16 було проведено методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням специфічних праймерів.

Зв'язки між показниками були визначені непараметричними статистичними методами з проведенням факторного, кластерного та дискримінантного аналізів за допомогою статистичного пакету STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., USA) згідно з рекомендаціями.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в рамках одного дослідження проведено комплексний молекулярно-генетичний аналіз поліморфізмів генів TLR2, TLR4, CC16 при БА у дорослих. Отримані нові дані про розподіл алелей та генотипів 2258G/A гену TLR2, 896A/G гену TLR4, а також A38G гену CC16 у групі контролю та у хворих на БА.

Визначений зв'язок зміни рівнів біомаркерів алергічного запалення (Ig E, IL-4, IL -10), Т-регуляторних клітин у хворих на БА із наявністю поліморфних варіантів генів, що вивчалися. Виявлена достовірна різниця між частотами генотипів за поліморфізмами 2258G/A гену TLR2, 896A/G гену TLR4, а також A38G гену CC16 у групі контролю та у хворих на БА. Продемонстровано, що у хворих на БА, які є носіями генотипу GA гену TLR2 відмічається зниження рівня IL-4 ($24,1 \pm 6,28$ пг/мл) та наростання експресії IL10 ($0,7 \pm 0,05$ пг/мл) в порівнянні з носіями генотипу GG ($63,7 \pm 8,7$ пг/мл; $0,42 \pm 0,02$ пг/мл відповідно) гену TLR2. Науково обґрунтовано, що генотип AG гену TLR4 пов'язаний зі зниженням рівнів CD4⁺CD25⁺Foxp3 ($0,03 \pm 0,01$ пг/мл) та IL10 ($0,35 \pm 0,03$ пг/мл) у хворих на БА. З'ясовано, що у хворих на БА, які є носіями поліморфного алелю G (AG, GG) гену CC16 визначається вищий рівень загального IgE ($272,5 \pm 30,33$ МОд/мл) в порівнянні з носіями генотипу AA ($123,7 \pm 12,26$

МОд/мл) гену СС16. Вперше визначено маркери алергічного запалення, Т-регуляторних клітин в залежності від гаплотипів генів TLR2, TLR4, СС16 при БА у дорослих.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати дослідження можуть бути покладені в основу розробки скринінгових програм по виявленню осіб з підвищеним ризиком розвитку БА. При виявленні генетичного поліморфізму А38G гену СС 16 підтверджується необхідність у прийомі стероїдних препаратів хворим на БА легкого та середнього ступеню тяжкості для досягнення ремісії захворювання. Отриману інформацію про поліморфізми вказаних генів у жителів Полтавського регіону можна враховувати при проведенні генетико-епідеміологічних досліджень такого широко розповсюдженого захворювання, як БА. Дані про зв'язок поліморфізмів генів TLR 2, TLR 4, СС 16 та Т-регуляторних клітин можуть бути задіяні в розробці лікарських та профілактичних засобів при БА.

Матеріали дисертації використовуються у навчальному процесі на кафедрах: імунології та біохімії Запорізького національного університету (акт впровадження від 07.02.2014 р.); клінічної імунології, алергології та ендокринології Буковинського державного університету (акт впровадження від 05.02.2014 р.); внутрішньої медицини №2 та клінічної імунології і алергології Харківського національного медичного університету (акт впровадження від 3.03.2014 р.). Результати досліджень впроваджені в практику лабораторії клінічної імунології ДУ “Національний інститут фізіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України” (акт впровадження від 14.02.2014 р.).

Особистий внесок. Робота проведена на базі науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики вищого державного навчального закладу України “Українська медична стоматологічна академія”. Автором самостійно проведено патентно-інформаційний пошук для визначення актуальності теми роботи, проаналізовано значну кількість літературних джерел і здійснено літературний огляд, проведено підбір та обстеження хворих на БА. За допомогою старшого наукового співробітника О.А. Шликової досліджено поліморфізми генів TLR 2, TLR 4, СС 16. У співпраці зі старшим науковим співробітником Н.Л. Куценко визначені рівні загального імуноглобуліну Е та Т-регуляторних клітин (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) периферійної крові. Самостійно виконана статистична обробка отриманих результатів та оформлена дисертаційна робота.

Апробація результатів дисертації. Результати дослідження доповідались і обговорювались на: Міжнародній медико-фармацевтичній конференції студентів і молодих вчених “Новітні технології в медицині”

(Чернівці, 2012); Міжнародній науково-практичній конференції “Імунозалежні стани: сучасна лабораторна імунологічна діагностика, лікування та профілактика” (Київ, 2012), XIII Українській науково-практичній конференції з “Актуальні питання клінічної та лабораторної імунології, алергології і імунореабілітації” (Київ, 2012); Конгресах Congress of European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) (Мілан, 2013; Копенгаген, 2014).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 11 друкованих праць, серед них 6 статей у фахових наукових журналах та збірниках, затверджених ДАК України, з яких 2 – одноосібні; 4 тез – у матеріалах наукових з’їздів та конференцій, у тому числі на міжнародних конгресах; Деклараційний патент України на корисну модель “Спосіб прогнозування ускладненого перебігу atopічної бронхіальної астми”, № 82211 від 25.07.2013 р.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація викладена на 153 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, 4 розділів (огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати досліджень, обговорення отриманих результатів), висновків, практичних рекомендацій та списку використаних джерел. Перелік використаних літературних джерел складається з 250, з них 200 латиницею. Текст дисертації проілюстровано 23 таблицями, 19 малюнками та 1 схемою.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Для вирішення поставлених у роботі завдань проведено обстеження 45 хворих на БА та 90 осіб без проявів алергії, що були співставлені за статтю та віком. Під спостереженням знаходилися пацієнти з БА, що були на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні четвертої міської клінічної лікарні м. Полтави та особи, які раніше перебували на лікуванні в алергологічному чи пульмонологічному відділеннях Полтавської обласної клінічної лікарні ім. М.В. Скліфосовського. Групу порівняння склали 90 практично здорових осіб, які були анкетовані та клінічно обстежені для виключення алергічних захворювань. В якості групи порівняння використана вибірка, що належить банку ДНК науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики вищого державного навчального закладу України “Українська медична стоматологічна академія”. Усі пацієнти дали письмову добровільну згоду на проведення обстежень. План медико-біологічних досліджень схвалено комісією з етичних питань та біоетики Вищого державного навчального закладу України “Українська медична

стоматологічна академія”, (протокол № 88 від 16.11.2010 р. засідання Комісії з етичних питань та біоетики).*

Діагноз БА устанавлювали на основі діагностичного алгоритму GINA (The Global Initiative for Asthma, 2014), серед яких: періодична задишка з утрудненням видиху; кашель, більше вночі та при фізичному навантаженні; епізодичні свистячі хрипи в легенях; повторна скованість грудної клітини. Прояви симптомів здебільшого посилюються вночі та в ранковий час і пробуджують хворого; виникають або погіршуються при: фізичному навантаженні, вірусній інфекції, впливі алергенів, палінні, перепаді зовнішньої температури, сильних емоціях, дії хімічних аерозолів, прийомі деяких ліків. Даний алгоритм діагностики прийнятий в Україні та затверджений МОЗ України (Наказ МОЗ України N 128 від 19.03.2007). Для оцінки перебігу БА використовували критерії GINA, перегляду 2014 року.

Обстеження пацієнтів здійснювалося у поліклінічному відділенні четвертої міської клінічної лікарні м. Полтави, в алергологічному та пульмонологічному відділеннях Полтавської обласної клінічної лікарні ім. М.В. Скліфосовського. При цьому були проведені загальноклінічні, лабораторно-інструментальні дослідження та скарифікаційні алергологічні проби на побутові, харчові, епідермальні, пилкові та грибові алергени з використанням стандартних наборів згідно з рекомендаціями виробників (ТОВ “Імунолог”, Вінниця, Україна).

Обстеження проводили за умови відсутності у пацієнта загострення основного чи супутніх хронічних, гострих інфекційних захворювань; прийому антигістамінних препаратів, мембраностабілізаторів, гормонів, бронхоспазмолітиків за 72 години до забору зразків крові. Практично здорові особи на момент обстеження мали задовільний стан здоров'я, не вживали лікарських препаратів, не мали даних atopічного анамнезу та хронічної патології.

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 для отримання суспензії мононуклеарних клітин периферичної крові; також проводився забір крові в об'ємі 4 мл у вакуумну пробірку з консервантом (8,4 мг EDTA) для виділення ДНК та в об'ємі 5 мл у стерильну суху скляну пробірку без додавання антикоагулянтів та консервантів 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 фенол-хлороформної екстракції з цільної крові. Визначення поліморфізмів: 2258G/A гену TLR 2, 896A/G гену TLR 4 та A38G гену CC 16 проведено методом полімеразної ланцюгової реакції. Ампліфікацію специфічної ділянки ДНК здійснювали на ампліфікаторі “Терцик” (“ДНК-Технология”, м. Москва) з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів (Ізмайлова О.В. та ін., 2011). Детекція продуктів ампліфікації проведена за допомогою електрофорезу в 3% агарозному гелі (“Helikon”, м. Москва) в 1 x TBE (50 мМ трис- H_3BO_3 та 2 мМ ЕДТА, рН 8.0) з подальшою візуалізацією результатів в ультрафіолетовому світлі та фотографуванням.

Фенотип лімфоцитів аналізували за допомогою визначення рівнів експресії поверхневих антигенів клітин CD 4, CD 25 та внутрішньоклітинного білку Foxp3 методом проточної цитофлюориметрії, дослідження проводили за стандартною методикою, використовуючи відповідні моноклональні антитіла (виробництво “Сорбент”, Російська Федерація; “eBioscience”, США). Основу методу складає взаємодія моноклональних антитіл (зв’язаних з флуоресцентною міткою) з поверхневими антигенами лімфоцитів з наступним аналізом проб на проточному цитофлюориметрі EPIC LX-MCL (Beckman Coulter, США), використовуючи програму System II TM software.

Рівень загального IgE в сироватці крові хворих на БА визначали за принципом двосайтового імуоферментного аналізу за допомогою тест-системи ТОВ “Укрмед-Дон” (Україна). Кількісне визначення IL-10 та IL-4 у хворих на БА проводили за допомогою набору реагентів ТОВ “Укрмед-Дон” (Україна) з використанням “сандвіч” – варіанту твердофазного імуоферментного аналізу. Оптичну щільність досліджуваних зразків визначали на імуоферментному аналізаторі (“Stat fax 303 plus”, USA) при довжині хвилі 450 нм.

Статистичну обробку отриманих результатів провели за допомогою статистичного пакету STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., USA) з використанням наступних методів: для кількісних параметрів розраховували середнє вибіркоче (M) та стандартну похибку середнього (m); аналіз виду розподілу ознак проводили за критерієм Шاپіро-Уїлка; оцінку відмінності між групами – за допомогою U-критерію Манна-Уїтні для незалежних вибірок; аналіз відмінностей частотних характеристик якісних ознак у двох незалежних групах проводили за допомогою критерію χ^2 Пірсона з поправкою Йетса на безперервність, точного двостороннього критерію Фішера (для малих груп). Для виявлення залежностей між параметрами проводили кореляційний аналіз з використанням коефіцієнту рангової кореляції Спірмена (R). Розподіл генотипів перевіряли на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга (РХВ) за допомогою критерію χ^2 . Для порівняння частот алелей використовували

критерій χ^2 Пірсона з поправкою Йетса. Аналіз частот генотипів проводили за допомогою точного критерію Фішера. Для порівняння частот варіантів у незв'язаних групах вираховували відношення шансів (ВШ) із визначенням 95% довірчого інтервалу (ДІ). Для всіх процедур статистичного аналізу критичний рівень значимості (p) приймали рівним або менше 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Серед обстежених 45 хворих на БА було 18 (40%) чоловіків, 27 (60%) жінок. Середній вік склав $38,4 \pm 13,1$ роки. Обстежених віком від 18 до 30 років було 14 осіб (31,1%); від 30 до 50 років – 18 (40%), більше 50 років – 13 (28,9%). Розподіл по групах тяжкості відбувся наступним чином: у 5 (11,1%) пацієнтів захворювання мало інтермітуючий характер перебігу; у 23 (51,1%) осіб легкий персистуючий; у 17 (37,7%) – середній ступінь тяжкості персистуючого перебігу БА.

В даний час з упевненістю можна вважати, що сімейна схильність до атопії пов'язана з полігенним успадкуванням, яке залежить від взаємодії декількох генів в різних локусах. В нашому дослідженні у 32 (71%) обстежених виявлені різноманітні прояви алергії в сім'ї. Наявність алергічних захворювань (риніт, кон'юнктивіт, дерматит, кропив'янка, астма) у родичів I–III ступеню спорідненості виявлена у 32 осіб (71%). У 13 (29%) хворих з клінічними ознаками БА даних про спадковий характер захворювання не було. Серед обстежених осіб наявність проявів алергії з боку обох батьків відмічена – у 16 осіб (5 %) випадків, у матері – у 8 (25 %), у батька – у 7 (21,9%).

Здебільшого відмічено ранні прояви атопії. Так, атопічний дерматит в дитинстві проявлявся у 22 (48,9 %) опитаних, з них у 28,9 % з них можна говорити про розвиток “атопічного маршу”. Поява риніту, що передувала виникненню нападів ядухи відмітили 27 (60%) хворих. У 50,4 % з цих пацієнтів сенсibilізація при риніті та при астмі спостерігалась на одні і ті ж самі алергени. Сезонність загострень астми: 7 (15,6%) хворих – з липня по жовтень, у 3 (6,7%) – з травня по липень місяць.

При дослідженні спектру сенсibilізації у обстежених осіб виявлено, що найчастіше викликали напади утрудненого дихання побутові алергени у 28 (62,2%) хворих, серед них найбільший вплив мали: бібліотечний та домашній пил із кліщами *Dermatophagoides farinea*, *Dermatophagoides pteronyssinus*; перо подушки. Друге місце посідають пилокві алергени (у 25 осіб (56,5 %)), серед них: пилок хлібних злаків, амброзії, тимофіївки, тополі, для яких характерним є сезонність проявів та ознаки перехресної алергії. Харчова алергія діагностувалась у 14 (31,1%) осіб. Найтипovіший спектр харчових алергенів складав: цитрусові, мед, алергени яєчного

білка. Сенсibilізацію до епідермальних алергенів мали 13 (28,9%) пацієнтів; до грибкових алергенів, представників роду *Penicillium* та роду *Aspergillus* 6 (13,3%).

Ознаки сенсibilізації до двох і більше алергенів відмічені у 35 (77,8%) осіб із числа всіх обстежених, до одного алергену – у 10 (22,2%) хворих на БА. У 28 (62,2%) пацієнтів в анамнезі були прояви інших алергічних патологій (ринокон'юктивіт, риніт, дерматит).

Значна частина хворих на БА вказували на перенесену соматичну патологію. Так, захворювання ШКТ відмітили у 23 (51,1%) пацієнтів. Серед них патологія жовчовивідних шляхів діагностувалась у 12 (26,7%) осіб, дисбіоз кишківника – у 16 (35,6%), виразкова хвороба та хронічний гастродуоденіт – у 7 (15,6%), прояви холецисто-панкреатиту – у 11 (24,4%). Патологія ЛОР органів анамнестично відмічалась у 17 (37,8%) хворих (здебільшого – тонзиліти, фарингіти, синусити, ангіни).

При оцінці результатів імунологічних досліджень (рівні IgE, IL-4, IL-10, CD4⁺CD25⁺Foxp3) виявлено, що у хворих на БА концентрація IgE склала $164,9 \pm 13,89$ МОд/мл (при нормі до 130 МОд/мл), IL-4 - $59,5 \pm 8,2$ пг/мл (при нормі до 20 МОд/мл), рівень CD4⁺CD25⁺Foxp3 - $0,04 \pm 0,01 * 10^9$ /л (при нормі до $3,6 * 10^9$ /л), що перевищує норму практично здорових осіб. Рівень IL-10 склав $0,45 \pm 0,02$ пг/мл (при нормі до 50 пг/мл).

При порівнянні цих показників у групах хворих з різним ступенем тяжкості статистично значимої відмінності між показниками груп не було. При порівнянні рівнів CD4⁺/CD25⁺/Foxp3, IgE, IL-4, IL-10 у хворих з сенсibilізацією до різної кількості алергенів відмічена статистично значима різниця. Так, в групі з полівалентною алергією експресія маркерів Т-регуляторних клітин нижче ніж з проявами моно валентної сенсibilізації ($p=0,03$). Рівень загального IgE в групі з проявами поліалергії був статистично значимо вищий, ніж в групі з проявами моно алергії ($p=0,003$).

З метою встановлення наявності лінійних статистичних зв'язків кореляції між імунологічними показниками хворих на БА був проведений факторний аналіз за методом головних компонент, який дозволяє переглянути індивідуальні та власні значення, частку загальної дисперсії, що пояснює кожна компонента та кумулятивну дисперсію, що пояснюють відібрані головні компоненти. Так, аналіз структури першого фактора показує, що визначальними показниками, на основі яких можна інтерпретувати його зміст, це показники більш ніж 0,7 ϵ : CD4⁺ (навантаження 0,92), абсолютна кількість лейкоцитів (навантаження 0,84), абсолютна кількість лейкоцитів, лімфоцитів (навантаження < 0,91). Перший фактор можна визначити як клітинний вплив, так як пов'язані перемінні мають по цьому фактору найвищі навантаження. Другий фактор характеризує гуморальний вплив на патогенез БА, так як найбільші кореляційні зв'язки фактор має з показниками: IgE (навантаження 0,92), IL-4 (навантаження > 0,84).

При проведенні кореляційного аналізу імунологічних показників виявлено, що найчастіше участь у статистично достовірних взаємозв'язках мають Т-регуляторні клітини (табл.1). Отримані дані можна розглядати, як одну із характерних ознак імунної регуляції у період компенсованого перебігу БА.

Таблиця 1

Вірогідні кореляційні зв'язки між імунологічними показниками у хворих на БА (n = 45)

	CD4	CD4 ⁺ / CD25 ⁺ /Foxp3	CD4 ⁺ / CD25 ⁺	Лейко- цити	Еози- нофі- ли	Лімфо- цити	IL -10	Ig E	IL -4
CD4 ⁺		0,55	0,58	0,77	0,45	0,9	0,17	-0,08	-0,03
CD4 ⁺ / CD25 ⁺ /Foxp3			0,21	0,37	0,21	0,6	0,3	-0,33	-0,32
CD4 ⁺ / CD25 ⁺				0,46	0,22	0,46	-0,02	0,04	0,01
Лейко- цити					0,53	0,78	0,19	-0,16	-0,2
Еози- нофіли						0,52	0,28	-0,17	-0,03
Лімфо- цити							0,2	-0,19	-0,15
IL -10								0,07	-0,14
Ig E									0,79
IL -4									

Примітка: жирним шрифтом позначені кореляційні зв'язки, які мають статистичну вірогідність ($p \leq 0,05$).

Наступним етапом нашого дослідження стало вивчення поліморфізмів 2258G/A гену TLR2, 896A/G гену TLR4 та A38G гену CC16 серед хворих на БА та їх впливу на імунологічні показники та клініку БА.

Проаналізована частота поліморфних варіантів вказаних генів серед хворих на БА та в групі популяційного контролю. В осіб, що входили до групи контролю, частота генотипу TLR2 GG становила 97,8% (88 осіб); частота гетерозиготного генотипу GA – 2,2% (2 особи), генотип AA не був виявлений. У хворих на БА відповідні результати були такими: GG – 88,9% (40 осіб), GA – 11,11% (5 осіб), AA також не був виявлений, тобто відмічається статистично значима різниця ($p = 0,04$) між частотами

генотипів у групі контролю та у хворих на БА. При дослідженні поліморфізму 896A/G гену TLR4 в групі контролю частота генотипу AA становила 95,6% (86 осіб), гетерозиготного генотипу AG – 4,5% (4 особи), генотип GG не виявлений. У хворих на БА відповідно: AA – 84,4% (38 осіб), AG – 15,6% (7 осіб), GG – не знайдено. Між частотами генотипів у групі популяційного контролю та хворих на БА виявлена достовірна різниця ($p = 0,04$).

В групу контролю для вивчення поліморфізму гену CC16 відібрано 46 зразків ДНК осіб, що не страждали на алергічну патологію. У вказаній групі результати були наступними: частота гомозиготного генотипу AA становила 86,9% (40 осіб) генотип GG не був виявлений, частота гетерозиготного генотипу AG склала 13% (6 осіб). У хворих на БА відповідні дані були такими: генотип AA – 64,4% (29 осіб), AG – 28,9% (13 осіб), GG у 6,52% хворих (3 осіб), тобто між частотами генотипів у групі контролю та у хворих на БА відмічається достовірна різниця ($p = 0,019$).

При вивченні розподілу поліморфних варіантів генів 2258G/A гену TLR2, 896A/G гену TLR4 та A38G гену CC16 в залежності від тяжкості перебігу БА статистично значимою різниці знайдено не було.

Одиничні нуклеотидні поліморфізми (ОНП) генів Толл-подібних рецепторів 2, 4 впливають, як на імунологічні показники так і на загальний соматичний стан. З літературних джерел (S. Hoffjan et al., 2005) відомо, що внаслідок змін в генах TLR2 відбувається порушення розпізнавання інфекційних агентів (в тому числі грибкових), яке призводить до дисбалансу функціонування системи вродженого імунітету та розвитку хронічних запальних захворювань. Так, гетерозиготний генотип GA гену TLR2 серед наших досліджуваних спостерігався тільки у жінок (100%). Достовірно частіше у носіїв алелі A ($p = 0,046$) в анамнезі були пневмонії (більше 2 разів за життя), а також відмічались ознаки кандидозу ($p = 0,034$) в порівнянні з пацієнтами без поліморфізму (табл. 2).

При порівнянні рівнів імунологічних показників, що вивчалися, серед хворих на БА з гомозиготними (GG) та гетерозиготними (GA) варіантами гену TLR2 статистично достовірна відмінність спостерігаються лише в концентрації цитокінів. Так, вищий рівень IL-4 ($63,7 \pm 8,7$ пг/мл) спостерігався у групі без наявності поліморфного варіанту гену TLR2 ($p=0,03$), а рівень IL-10 був достовірно підвищений у носіїв гетерозиготного (GA) варіанту геному TLR2 ($p=0,01$) (табл.2).

Клінічні та імунологічні ознаки в залежності від варіантів гену TLR 2

Наявність ознаки		Генотип GG, (n=40)	Генотип GA, (n=5)	P*
В анамнезі пневмонії (2-4 рази за життя)	так	12	4	0,046
	ні	28	1	
В анамнезі ознаки кандидозу	так	11	4	0,036
	ні	29	1	
Імунологічні показники				
IL-10, пг/мл		0,42±0,02	0,7 ± 0,05	0,013
IL-4, пг/мл		63,7±8,7	24,1 ±6,28	0,03

p* – рівень значимості, отриманий точним тестом Фішера

При аналізі кореляційних взаємозв'язків у хворих на БА з генотипом GG гену TLR 2 відмічено 11 кореляційних пар: CD4⁺ та CD4⁺/25⁺ (r=0,53); CD4⁺ та CD4⁺/25⁺/Foxp3 (r=0,32); CD4⁺ та лейкоцити (r=0,79); CD4⁺ та еозинофіли (r=0,41); CD4⁺ та лімфоцити (r=0,9); CD4⁺/25⁺ та лімфоцити (r=0,57); CD4⁺/25⁺/Foxp3 та IL-10 (r=0,57); лейкоцити та еозинофіли (r=0,51); лейкоцити та лімфоцити (r=0,77); еозинофіли та лімфоцити (r=0,49); Ig E та IL-4 (r =0,57). Ці пари є статистично вірогідними (p≤0,05) зі зв'язком від 0,32 до 0,79.

У хворих з генотипом GA відмічено різке зниження достовірно значущих кореляційних пар: CD4⁺ та CD4⁺/25⁺/Foxp3 (r=0,97); CD4⁺/25⁺/Foxp3 та лімфоцити (r=0,97). Утворення нової кореляційної пари (CD4⁺/25⁺/Foxp3 та лімфоцити) та підсилення зв'язку лімфоцитів із Т-регуляторними клітинами підтверджує факти про вплив поліморфної алелі А гену TLR 2 на функціональну активність імунної системи. Отриманий сильний взаємозв'язок імунорегуляторних клітин з іншими імунними факторами може бути ознакою ремісії БА, як у хворих без поліморфізму, так і з ОНП гену TLR 2.

Поліморфізм гена TLR4, який кодує позаклітинну структуру ектодомену рецептора, полягає в заміні аспарагінової амінокислоти на гліцинову Asp299Gly та на кінцевому етапі пов'язаний з пригніченим фосфорилування ІкВ-α після стимуляції ЛПС, що, своєю чергою,

призводить до зниження транслокації NFκB в ядро та позначається на пригніченні синтезу відповідних прозапальних цитокинів (Yang I. et al, 2009). Поліморфізм Asp 299 Gly TLR4 (зміна алелю Asp на Gly) був виявлений у 7 обстежених. У 6 осіб цієї групи прояви БА починалися в ранньому дитинстві ($p=0,03$); 4 пацієнти пройшли типові етапи “атопічного маршу” (табл. 3).

Таблиця 3

Клінічні та імунологічні ознаки в залежності від варіантів гену TLR 4

Наявність ознаки		Генотип AA, (n=38)	Генотип AG, (n=7)	p *
Полісенсibiliзація, що включає харчові алергени	так	7	7	0,01
	ні	31	0	
Супутні алергічні прояви (риніт, кон'юнктивіт)	так	6	5	0,04
	ні	32	2	
В анамнезі прояви ”атопічного маршу”	так	7	6	0,02
	ні	31	1	
Імунологічні показники				
CD 4 ⁺ /25 ⁺ /Foxp3, Г/л		0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04
IL-10, пг/мл		0,45±0,02	0,35 ±0,03	0,03

p* – рівень значимості, отриманий точним тестом Фішера

Достовірно частіше ($p=0,02$) у хворих з гетерозиготними (AG) варіантом гену TLR 4 у порівнянні з пацієнтами, що є носіями гомозиготного варіанту (AA) гену TLR 4, визначались харчові фактори сенсibiliзації, а також супутня алергічна патологія (ринокон'юнктивальний синдром) ($p=0,04$). Отримані дані дають можливість говорити, що поліморфізм гену Asp299 Gly TLR 4 здебільшого впливає на загальні прояви atopії у хворих на БА, ніж на ознаки бронхо-легеневої дисфункції та ступінь тяжкості даної патології.

Вивчення імунологічних даних характеризується достовірними змінами рівня CD4⁺/25⁺/Foxp3 ($p=0,04$) та концентрації IL10 ($p=0,03$) у хворих з поліморфізмом 896A/G гену TLR 4 (табл. 3).

При проведенні кореляційного аналізу між імунологічними показниками у групах з різними варіантами гену TLR 4 виявлено, що у групі з гомозиготним (AA) варіантом гену TLR 4 відмічено 13 статистично достовірних кореляційних пар: CD4⁺ та CD4⁺/25⁺ (r=0,47); CD4⁺ та CD4⁺/25⁺/Foxp3 (r=0,54); CD4⁺ та лейкоцити (r =0,73); CD4⁺ та еозинофіли (r =0,49); CD4⁺ та лімфоцити (r=0,87); CD4⁺/25⁺ та лімфоцити (r=0,54); CD4⁺/25⁺/Foxp3 та лейкоцити (r=0,46); CD4⁺/25⁺/Foxp3 та лімфоцити (r=0,41); CD4⁺/25⁺/Foxp3 та IL10 (r=0,52); лейкоцити та еозинофіли (r=0,59); лейкоцити та лімфоцити (r=0,75); еозинофіли та лімфоцити (r=0,6); Ig E та IL-4 (r=0,63), що більше ніж у всієї групи хворих на БА. У носіїв гетерозиготного варіанту (AG) гену TLR 4 відмічено 6 кореляційних пар: CD4⁺ та лейкоцити (r=0,93); CD4⁺ та лімфоцити (r=0,99); CD4⁺/25⁺ та лейкоцити (r=0,81); лейкоцити та лімфоцити (r=0,92); Ig E та IL-4 (r=0,96); IL-10 та IL-4 (r= - 0,77).

Отримані дані кореляційного аналізу свідчать про активну участь клітинних та гуморальних факторів в імунній відповіді у контрольований період перебігу БА. Взаємозв'язок Ig E з IL-4 та зворотній зв'язок IL-10 із IL-4 підтверджують положення про те, що БА є алергічною патологією, в якій важлива роль відведена цитокінам, як факторам, що активують Т-хелпер 2 імунну відповідь.

При розгляді результатів аналізу поліморфізму A38G гену CC 16 з'ясовано, що переважна більшість осіб, які є носіями алелі G вказаного гену мали сенсibiliзацію до двох і більше алергенів. Особливістю цих хворих була гіперчутливість до грибкових алергенів (найчастіше до групи *Aspergillus*). Так, у носіїв алелі G вказані прояви були у 8 осіб, у носіїв генотипу AA – у 7, що є статистично достовірно (табл. 4). Звертає на себе супутня алергічна патологія. Так, серед носіїв алеллю G 6 осіб мали прояви алергічного дерматиту, а серед носіїв генотипу AA такі прояви мали 4 особи.

При опрацюванні імунологічних даних, що були отримані в ході дослідження з'ясовано, що статистично достовірна різниця відмічалась лише за рівнем загального Ig E. Так, у хворих на БА, які є носіями гомозиготи AA рівень загального Ig E склав $123,7 \pm 12,26$ МОд/мл, у носіїв алелі G гену CC 16 хворих на БА цей показник склав $272,5 \pm 30,33$ МОд/мл, що є статистично вірогідно (p=0,001) (табл. 4), тобто спостерігається залежність рівня загального Ig E від стану генетичного апарату. Можливо це пов'язано з однаковим розташуванням на хромосомі 11q13, як гену білка клітин Клара, так і високоафінного FcεRI-рецептора-β (FcεRI-β) Ig E (Douglas A. et al, 2007).

**Клінічні та імунологічні ознаки в залежності від варіантів гену
CC 16**

Наявність ознаки		Носії генотипу AA гену CC 16 хворі на БА, (n=29)	Носії алелі G (AG +GG) гену CC16 хворі на БА, (n=16)	p*
Мають прояви алергічного дерматиту	так	4	6	0,04
	ні	25	10	
Частіше користуються інгаляційними глюкокортико- стероїдами	так	3	9	0,02
	ні	26	7	
Прояви грибкової сенсibiliзації	так	7	8	0,03
	ні	31	8	
Імунологічні показники				
Ig E, МОд/мл		123,7 ± 12,26	272,5 ± 30,33	0,001

p* – рівень значимості, отриманий точним тестом Фішера

При проведенні кореляційного аналізу відмічено 10 кореляційних пар зі статистичною вірогідністю $p \leq 0,05$ у носіїв генотипу AA: CD4⁺ та CD4⁺/25⁺ ($r=0,52$); CD4⁺ та лейкоцити ($r=0,75$); CD4⁺ та еозинофіли ($r=0,55$); CD4⁺ та лімфоцити ($r=0,89$); CD4⁺/25⁺ та лімфоцити ($r=0,49$); CD4⁺/25⁺/Foxp3 та IL-10 ($r=0,4$); лейкоцити та еозинофіли ($r=0,59$); лейкоцити та лімфоцити ($r=0,7$); еозинофіли та лімфоцити ($r=0,63$); Ig E та IL-4 ($r=0,6$). У хворих на БА з гетерозиготним (AG) варіантом гену CC 16 спостерігається 6 кореляційних пар (CD4⁺ та лейкоцити ($r=0,61$); CD4⁺ та еозинофіли ($r=0,64$); CD4⁺ та лімфоцити ($r=0,76$); CD4⁺/25⁺ та лімфоцити ($r=0,57$); CD4⁺/25⁺/Foxp3 та IL10 ($r=0,66$); Ig E та IL-4 ($r=0,86$)), таких же, як і у хворих з гомозиготою гену CC 16 (AA). Особливістю носіїв генотипу AG гену CC 16 є поява двох нових кореляційних пар із сильним зв'язком та статистичною достовірністю – це CD4⁺ та Ig E ($r=0,7$), CD4⁺ та IL-4 ($r=0,73$). Аналіз кореляційних зв'язків демонструє, що поліморфізм A38G гену CC 16 є підґрунтям для розвитку алергічної реакції в легенях.

Отримані наукові дані про зміни імунологічних показників у групах хворих без поліморфізму та з поліморфізмом генів TLR 2, TLR 4, CC 16

можна розглядати як характерні ознаки контрольованого перебігу БА. Виявлені особливості імунного статусу ще раз підкреслюють важливість положень GINA про те, що БА це персистуюче латентне запалення, яке потребує специфічного протизапального лікування незалежно від стадії перебігу.

Під час опрацювання даних про лікарські засоби, які приймали хворі з'ясовано, що особи, які були носіями генотипу AG або GG гену CC 16 частіше використовували глюкокортикостероїдні препарати (табл. 4). Це можна пояснити, де у чому схожою дією на молекулярному рівні білків клітин Клара та глюкокортикоїдів. Відомо, що активація гена CC 16 інгібує функцію ядерного фактору – κB (NF-κB) шляхом подавлення фосфорилування ІκB-β в епітеліальних клітинах дихальних шляхів, що в свою чергу призводить до зменшення запалення в легеневій тканині (Хіао-Во Long et al, 2012).

Для з'ясування можливого поєднання різних досліджуваних генотипів проведено аналіз гаплотипів та їх зв'язок з клінікою БА. Найчастіше зустрічається гаплотип GGAAAA, як в групі контролю, так і у хворих БА. При аналізі гаплотипів генів TLR4 та CC16 з'ясовано, що 3 особи з гетерозиготним генотипом гену CC16 (гаплотип GGAGAG) та 1 особа з гомозиготою гену CC16 (гаплотип GGAGGG) мали гетерозиготний варіант гену TLR4. У всіх цих хворих відмічались часті прояви ГРВІ, що носили затяжний характер та потребували використання антибактеріальних препаратів. При розгляді імунологічних показників з'ясовано, що у 3 осіб, які мали генотип AA гену CC16 та генотип GA гену TLR 2 (гаплотип AAGA) був достовірно нижчий рівень IgE (критерій Манна-Уїтні U (n=26; n=3) 5; p= 0,01) та IL-4 (критерій Манна-Уїтні U (n=26; n=3) 3; p= 0,01) в порівнянні з носіями гаплотипу AAGG генів CC16 та TLR 2. Отримані дані, підтверджують інформацію (Симбирцев А.С., 2005) про те, що ОНП та зниження функції TLR та CC16 призводить до послаблення шляху активації клітин, зсуву балансу імунної системи в бік диференціації Т - хелперів 2 типу та розвитку алергії.

Отже, за результатами даного дослідження визначено роль поліморфізмів генів TLR 2, 4 та CC 16 у патогенезі БА, що впливають на перебіг та розвиток захворювання, прояви супутньої патології оскільки спричиняють порушення розпізнавання інфекційних агентів і дисбаланс взаємодії системи вродженого та набутого імунітету.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення наукового завдання імунології та алергології стосовно визначення генетичної детермінованості розвитку бронхіальної астми – дослідження ролі толл-подібних рецепторів (за поліморфізмами 2258G/A

гену TLR2, 896A/G гену TLR4) та білка клітин Клара (за поліморфізмом A38G) у взаємозв'язку з рівнем Т-регуляторних клітин, IgE, IL-4, IL-10 у патогенезі бронхіальної астми для поглиблення знань про імунологічні механізми розвитку цього захворювання.

1. Встановлено, що у обстежених хворих бронхіальна астма є генетично детермінованою патологією (71%), характеризується підвищеним рівнем загального IgE (57,7%), полісенсibiliзацією (77,8%), поєднується з іншими алергічними нозологіями (62,2%) та із захворюваннями шлунково-кишкового тракту (51%).

2. Виявлена достовірна різниця між частотами генотипів GA (11,1%) гену 2258G/A TLR2, AG (15,6%) гену 896A/G TLR4, AG (28,9%) та GG (6,52%) гену A38G CC16 у хворих на бронхіальну астму та у групі контролю (2,2%; 4,5%; 13,0%; 0% відповідно).

3. У хворих на бронхіальну астму з перенесеними пневмоніями та кандидозом виявлявся генотип GA гену 2258G/A TLR2, у них відмічається зниження рівня IL4 та наростання експресії IL10 в порівнянні з генотипом GG гену 2258G/A TLR2.

4. Початок захворювання на бронхіальну астму в ранньому дитинстві, наявність супутньої алергічної патології, харчових факторів сенсibiliзації асоціюється з гетерозиготним варіантом (AG) 896A/G гену TLR4. Для таких хворих характерно зниження експресії CD4⁺/25⁺/Foxp3 Т-клітин, зменшення рівня IL-10 у порівнянні з носіями генотипу AA.

5. У хворих на бронхіальну астму, у яких визначається гаплотип (AAGA) генів TLR2 та CC16 відмічається зниження рівнів IgE та IL-4 при порівнянні з носіями інших гаплотипів генів TLR2 та CC16.

6. Грибкова сенсibiliзація, алергічний дерматит в анамнезі, необхідність в підтримуючій дозі аерозольних глюкокортикостероїдів є характерними для носіїв алелі G гену A38G CC16. У них відмічається вищий рівень загального IgE у порівнянні з носіями генотипу AA гену A38G CC16

7. Комплексне вивчення розподілу частот генотипів 2258G/A гену TLR2, 896A/G гену TLR4, A38G гену CC16, їх взаємозв'язку з CD4⁺/CD25⁺/Foxp3, IL-4, IL-10, IgE, з клінічними проявами дозволяє уточнити патогенетичні механізми розвитку та особливості компенсованого перебігу бронхіальної астми у дорослих.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Отримані результати дослідження можуть бути використанні для формування бази даних в скринінгових програмах по виявленню осіб з підвищеним ризиком розвитку БА. Виявлення генетичного поліморфізму A38G гену CC16 є підставою для призначення глюкокортикоїдних

препаратів хворим на БА легкого та середнього ступеню тяжкості для досягнення ремісії захворювання. Дані про зв'язок поліморфізмів генів TLR 2, TLR 4, CC 16 та T-регуляторних клітин можуть бути задіяні в дослідженнях по розробці лікарських та профілактичних засобів при БА.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Ляховська Н.В. Вміст медіаторів алергічного запалення в сироватці крові у хворих на atopічну бронхіальну астму залежно від поліморфізму 2258G/A гена TLR-2 / Н.В. Ляховська, О.А. Шликова, О.В. Ізмайлова, І.П. Кайдашев // Астма та алергія. – 2013. – № 3 – С.43-46. *Особисто підібрані хворі для обстеження, опрацьовані дані вітчизняної та світової літератури, зроблений статистичний аналіз отриманих результатів, стаття підготована до друку.*

2. Ляховська Н.В. Поліморфізм 896 A/G гену TLR 4, 2258G/A гену TLR 2 та особливості клініки atopічної бронхіальної астми у дорослих / Н.В. Ляховська // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2013. – Т. 13, № 3 (43). – С. 179-181. *Особисто проаналізовані літературні джерела, зроблений аналіз отриманих результатів, стаття підготована до друку.*

3. Ляховська Н.В. Зв'язок поліморфізма гена TLR 4 з клініко-імунологічними показниками при бронхіальній астмі / Н.В. Ляховська // Проблеми екології та медицини. – 2013. – №4. – С. 27-33. *Особисто підібрані хворі для обстеження, зроблений статистичний аналіз отриманих результатів, стаття підготована до друку.*

4. Ляховська Н.В. Роль поліморфізмів генів Толл-подібних рецепторів 2,4 та білка клітин Клара в розвитку бронхіальної астми у дорослих / Н.В. Ляховська, О.В. Ізмайлова, О.А. Шликова, І.П. Кайдашев // Проблеми екології та медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 71-80. *Особисто підібрані хворі для обстеження, опрацьовані дані вітчизняної та світової літератури, проведений статистичний аналіз отриманих результатів, стаття підготована до друку.*

5. Ляховська Н.В. Поліморфізм гену білку клітин Клара у хворих на atopічну бронхіальну астму / Н.В. Ляховська, О.В. Ізмайлова, О.А. Шликова, І.П. Кайдашев // Імунологія та алергологія: наука і практика. – 2013. – №4. – С. 25-29. *Особисто підібрані хворі для обстеження, зроблений статистичний аналіз отриманих результатів, стаття підготована до друку.*

6. Ляховська Н.В. Клініко-анамнестичні особливості atopічної бронхіальної астми та їх зв'язок з показниками T-регуляторних клітин та загального імуноглобуліну Е / Н.В. Ляховська, Н.Л. Куценко, М.В. Микитюк, І.П. Кайдашев // Лікарська справа. – 2014. – №3-4. – С.

26-30. *Особисто підібрані хворі для обстеження, зроблений статистичний аналіз отриманих результатів, стаття підготована до друку.*

7. Ляховська Н.В., Куценко Н.Л., Ляховський В.І., Кайдашев І.П. Взаємозв'язок клініко-імунологічних показників у хворих на атонічну бронхіальну астму // XIII Українська науково-практична конференція “Актуальні питання клінічної і лабораторної імунології, алергології та імуноореабілітації”, 26 – 27 квітня, 2012 р.: матеріали доп. – К., 2012. – С. 81-82. *Особисто підібрані хворі для проведення обстеження, проаналізовані отримані результати, тези підготовані до друку.*

8. Kaidashev I.P, Lyakhovskaya N.V., DuBuske L.M. Relationship of polymorphisms of toll-like receptors 2 and 4 and T-regulatory cells in patients with atopic asthma // World Asthma and Allergy Congress. – 22-26 June, 2013. abstracts. – Milano, 2013. – № 996. *Особисто підібрані хворі для проведення обстеження, проаналізовані отримані результати, тези підготовані до друку.*

9. Ляховська Н.В., Кайдашев І.П. Атопічна бронхіальна астма: особливості поліморфізму генів Toll-подібних рецепторів 2, 4 та імунного статусу // Всеукраїнська науково-практична конференція алергологів України. – 25–26 квітня 2013 р.: матеріали доп. – Харків. – С.7. *Особисто підібрані хворі для проведення обстеження, проаналізовані отримані результати, тези підготовані до друку.*

10. Ляховська Н.В., Шликова О.А., Кайдашев І.П. Зв'язок поліморфізму білків клітин Клара з клінічними особливостями атопічної бронхіальної астми у дорослих // Науково-практична конференція з міжнародною участю “Медикаментозна алергія: міждисциплінарні підходи до діагностики, лікування та профілактики”, 23-24 вересня 2013 р. матеріали доп. – К. – 2013. – №1. – С. 6. *Особисто підібрані хворі для проведення обстеження, проаналізовані отримані результати, тези підготовані до друку.*

11. Ляховська Н.В., Куценко Н.Л., Кайдашев І.П. Спосіб прогнозування ускладненого перебігу атопічної бронхіальної астми // Деклараційний патент України на корисну модель № 82211 від 25.07.2013 р. *Особисто підібрані хворі для проведення обстеження, проаналізовані отримані результати.*

АНОТАЦІЯ

Ляховська Н.В. Роль поліморфізмів генів толл-подібних рецепторів 2, 4 та білку клітин Клара у розвитку бронхіальної астми. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.08 – імунологія та алергологія. – Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ, 2014.

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукового завдання імунології та алергології стосовно визначення генетичної детермінованості при бронхіальній астмі шляхом дослідження ролі толл-подібних рецепторів вродженого імунітету (за поліморфізмами 2258G/A гену TLR 2, 896A/G гену TLR 4, A38G гену CC 16) та аналізу зв'язків між особливостями генотипів хворих, показниками стану імунітету та клінічним перебігом захворювання.

З'ясовано, що в групі хворих на бронхіальну астму достовірно частіше зустрічається генотип GA (11,1%) гену TLR 2 у порівнянні з групою контролю. У пацієнтів, які є носіями алелі A гену TLR 2 в анамнезі частіше відмічались пневмонії, були ознаки кандидозу, а також знижувався рівень IL-4 та наростала експресія IL-10 у порівнянні з пацієнтами без генетичних змін. При вивченні поліморфізму гену TLR 4 з'ясовано, що генотип AG статистично вірогідніше зустрічається в групі з бронхіальною астмою (15,6%) ніж у контрольній групі. У хворих з поліморфізмом 896A/G гену TLR 4 захворювання починалось з дитинства, у спектрі сенсibilізації були харчові чинники, мали місце прояви іншої алергічної патології, у цих осіб достовірно знижувалася експресія CD4⁺/25⁺/Foxp3⁺ Т-клітин та рівень IL-10. Поліморфний варіант 38G гену CC 16 достовірно частіше зустрічається у хворих на бронхіальну астму ніж у групі контролю. Особливостями клінічних проявів бронхіальної астми у хворих, які є носіями алелі 38G гену CC 16 є: грибокво сенсibilізація, atopічний дерматит та туберкульоз в анамнезі. Цим пацієнтам показане частіше застосування глюкокортикостероїдів. У них відмічений вищий рівень загального Ig E у осіб з генотипом AG та гомозиготним GG варіантом гену CC 16 у порівнянні з генотипом AA. У роботі показано важливе значення вивчення поліморфізмів генів TLR 2, TLR 4, CC 16 для розуміння клінічного перебігу бронхіальної астми.

Ключові слова: бронхіальна астма, поліморфізм, толл-подібні рецептори, білок клітин Клара.

АНОТАЦІЯ

Ляховская Н.В. Роль полиморфизмов генов толл-подобных рецепторов 2, 4 и белка клеток Клара в развитии бронхиальной астмы. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.08 – иммунология и аллергология. – Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, Киев, 2014.

В диссертационной работе приведено теоретическое обобщение и новое решение научной задачи иммунологии и аллергологии по определению генетической предрасположенности к развитию бронхиальной астмы путем исследования роли толл-подобных рецепторов (полиморфизм 2258G / A гена TLR 2, 896A / G гена TLR 4, A38G гена CC 16) и анализа связей между особенностями генотипов больных, показателями состояния иммунитета и клиническим течением заболевания.

В ходе работы определены содержания в сыворотке крови Ig E, IL-4, -10, которые проводили иммуноферментным методом. Количество CD4⁺CD25⁺Foxp3 – Т-клеток исследовали методом проточной цитофлюориметрии. Изучение полиморфизмов генов 2258G / A гена TLR 2, 896A / G гена TLR 4, а также A38G гена CC 16 было проведено методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров.

Работа основана на результатах исследования 135 особ. Распределение по группам тяжести среди 45 больных бронхиальной астмой состоялась следующим образом: у 5 пациентов – интермиттирующий характер течения астмы, у 23 человек – легкая степень тяжести, персистирующие течение, а у 17 – средняя степень тяжести персистирующего течения. У 71% обследованных больных обнаружены проявления аллергии в семье. Характерным является ранние проявления атопии. Так, атопический дерматит в детстве наблюдался у 48,8% опрошенных, из них у 28,9% симптомы развивались по типу “атопического марша”. Сезонность обострений астмы у 15,5% больных отмечалась с июля по октябрь, а в 6,6% – с мая по июль.

При исследовании спектра сенсibilизации у больных астмой выявлено, что чаще всего приступы затрудненного дыхания вызывали бытовые аллергены (62,2%). Второе место занимают пыльцевые аллергены (55,5%), среди них: пыльца амброзии, хлебных злаков, тимофеевки, тополя. Пищевая аллергия диагностировалась у 31,1% больных. Типичный спектр пищевых аллергенов составлял: цитрусовые, мед, аллергены яичного белка. Сенсibilизацию к эпидермальным аллергенам имели 28,9%, к грибковым аллергенам представителей рода *Penicillium* и рода *Aspergillus* – 14,2% пациентов. Признаки сенсibilизации к одному аллергену отмечены у 22,2% больных, к двум и более аллергенам – у 42,2% из числа всех обследованных. У 28 (62,2%) пациентов в анамнезе были проявления других аллергических патологий (риноконъюнктивит, ринит, дерматит).

Больные указывали на перенесенную соматическую патологию. Так, заболевания желудочно-кишечного тракта отметили 51,1% пациентов.

Патология ЛОР органов анамнестически наблюдалась у 37,8% больных (в основном - тонзиллиты, фарингиты, синуситы, ангины).

При оценке результатов иммунологических исследований (уровни Ig E, IL-4, IL-10, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) определено, что у больных бронхиальной астмой концентрация Ig E составила $164,9 \pm 13,89$ МОд/мл, IL-4 – $59,5 \pm 8,2$ пг/мл, уровень CD4⁺CD25⁺Foxp3 – $0,04 \pm 0,01$ ($\times 10^9$ /л), что превышает норму практически здоровых людей. Уровень IL-10 составлял $0,45 \pm 0,02$ пг/мл. При сравнении этих показателей в зависимости от тяжести течения заболевания статистически значимого различия не было.

У больных бронхиальной астмой достоверно чаще встречается генотип GA (11,1%) гена TLR 2 по сравнению с группой контроля. У пациентов, которые являются носителями аллели A гена TLR 2 в анамнезе чаще отмечались пневмонии, были признаки кандидоза, а также снижался уровень IL-4 и возрастала экспрессия IL-10 по сравнению с пациентами без генетических изменений. При изучении полиморфизма гена TLR 4 установлено, что генотип AG статистически достоверно чаще встречается в группе с бронхиальной астмой (15,6%), чем в контрольной группе. У больных с полиморфизмом 896A / G гена TLR 4 заболевание начиналось в детстве, в спектре сенсibilизации были пищевые факторы, проявления другой аллергической патологии. У этих лиц достоверно снижалась экспрессия CD4⁺25⁺Foxp3⁺ Т-клеток и уровень IL-10. Полиморфный вариант 38G гена CC 16 достоверно чаще встречался у больных бронхиальной астмой чем в группе контроля. Особенности клинических проявлений бронхиальной астмы у больных, которые являются носителями аллели 38G гена CC 16 являются: грибковая сенсibilизация, атопический дерматит и туберкулез в анамнезе, необходимость в частом приеме ГКС; повышенный уровень общего Ig E у лиц с генотипом AG и гомозиготным GG вариантом гена CC 16 по сравнению с генотипом AA.

В работе показано важное значение изучения полиморфизмов генов TLR 2, TLR 4, CC 16 для понимания течения бронхиальной астмы.

Ключевые слова: бронхиальная астма, полиморфизм, толл-подобные рецепторы, белок клеток Клара.

SUMMARY

Lyakhovskaya N.V. The role of polymorphisms of genes toll-like receptors 2, 4, and Clara cell protein in the development of asthma. - Manuscript.

Dissertation for a Candidate of Medical Sciences, degree by specialty 14.03.08 – Immunology and Allergology. – National Medical University. A.A. Bogomoltsa, Kiev, 2014.

The thesis shows the theoretical generalization and a new solution of scientific problems of immunology and allergy, by definition, genetic determination of bronchial asthma by investigating the role of toll-like receptors in innate immunity (for polymorphism 2258G / A gene TLR2 (rs5743708), 896A / G gene TLR4, A38G gene CC16) and analysis of the relationships between the characteristics of the genotypes of patients, the target, the immune system and the clinical course of the disease. In the group of patients with bronchial asthma was significantly more common genotype GA (11,1%) TLR2 gene compared to the control group. Patients who are carriers of allele A TLR2 gene were more common in the history of pneumonia, there were signs of candidiasis, as well as decreased levels of IL4 and IL10 expression was growing compared with patients without the genetic change. In the study of gene polymorphism TLR 4 determines that the AG genotype is significantly found in the group of bronchial asthma (15.6%) than in control group. Patients with polymorphism 896A / G TLR4 gene disease begins in childhood, in the spectrum of sensitization were dietary factors, there have been other manifestations of allergic disease, these individuals significantly decreased the expression of $CD4^+ / 25^+ / Foxp3$ T cells and the level of IL10. A polymorphic variant of the gene 38G CC 16 significantly more common in patients with asthma than in the control group. Clinical manifestations of bronchial asthma in patients who are carriers of the gene allele 38G CC16 are fungal sensitization, atopic dermatitis and history of tuberculosis, the need for frequent GCS; The highest level of total IgE in patients with genotype AG and homozygous GG gene variant CC16 compared with the AA genotype.

The paper shows the importance of studying gene polymorphisms TLR2, TLR4, SS16 for the understanding of bronchial asthma.

Key words: asthma, polymorphism, Toll-like receptors, Clara cell protein.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- БА – бронхіальна астма
- ГКС – глюкокортикостероїди
- ЛПС – ліпополісахариди
- ОНП – одиничний нуклеотидний поліморфізм
- РХВ – рівновага Харді-Вайнберга
- ШКТ – шлунково-кишковий тракт
- СС (Clara's cells) – клітини Клара
- Ig – імуноглобулін
- IL – інтерлейкін
- SNP (single nucleotide polymorphism) – одиничні нуклеотиди
- Th – Т-хелпер
- TLR (Toll-like receptor) – толл-подібний рецептор

Підписано до друку 01.09.2015 р.
Папір офсетний. Друк трафаретний.
Ум. друк. арк. 0,9. Наклад 100 прим. Формат 60×84/16. Зам. № 750.

Виготовлювач: ТОВ “Фірма “Техсервіс”.
Адреса: 36011, м. Полтава, вул. В. Міщенко, 2.
Тел.: (0532) 56-36-71.

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи
серія ДК № 4421 від 16.10.2012 р.