

070.21  
С15

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

САКЕВИЧ ВІКТОРІЯ ДМИТРІВНА



070.21-002:612.6.05  
УДК 575+616.516-092

**РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ ТОЛЛ-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ 2, 4  
ТА ГАЛЕКТИНУ-10 В РОЗВИТКУ АЛЕРГІЧНОГО РИНИТУ**

14.03.08 – імунологія та алергологія

**Автореферат**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Київ - 2014





Loza M.J. et al., 2007; Apter A.J. et al., 2008; Huebner M. et al., 2008]. Важливим є вивчення факторів схильності до алергії, що реалізуються під впливом навколишнього середовища на організм - генів, що кодують ферменти біотрансформації ксенобіотиків [Вавлін В.А. і співавт., 2002; Carroll W., 2005]. Існують відомості щодо асоціації алергічного риніту із поліморфізмами генів 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], білку кристалів Шарко- Лейдена (галектин-10) [Bryborn M et al., 2010] та інших. В цілому, гени - кандидати, причетні до розвитку алергічного риніту, можуть бути розділені на: гени, які контролюють структурні та регуляторні елементи імунної системи; гени, які визначають резистентність тієї чи іншої ділянки (locus morbi); гени, які беруть участь в детоксикації ксенобіотиків.

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.

#### **В'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота є самостійним фрагментом науково-дослідної роботи Вишого 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 дослідження:** визначити роль поліморфізмів генів, що контролюють структурні та регуляторні елементи неспецифічної резистентності організму (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.

#### **Завдання дослідження:**

1. Сформувати групи спостережень – хворі на алергічний риніт та група популяційного контролю, верифікувати діагноз, визначити профіль сенсibiliзації хворих, дослідити рівень біомаркерів алергічного запалення.
2. Дослідити розповсюдженість поліморфізмів генів, зокрема гену TLR2 (rs5743708), гену TLR4 (rs4986790) та гену галектину-10 (rs420297 C/T) в групах спостережень і в групі популяційного контролю.
3. Визначити рівень Т регуляторних клітин ( $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ) в крові хворих на алергічний риніт та в групі популяційного контролю.
4. Провести статистичний аналіз для виявлення зв'язків між активністю алергічного запалення, особливостями клінічного перебігу АР та наявністю поліморфних варіантів генів.

*Об'єкт дослідження* – патогенез алергічного риніту, особливості імунного статусу хворих на алергічний риніт у залежності від поліморфізму генів-кандидатів.

*Предмет дослідження* – характеристика стану імунітету у хворих на алергічний риніт в залежності від поліморфізму генів TLR 2,4 та галектину-10.

*Методи дослідження.* Для верифікації діагнозу АР було використано клінічні ознаки захворювання. Якість життя хворих визначали за допомогою загальноновизначених опитувальників. Рівень сенсibilізації хворих визначали за допомогою шкірних проб до побутових та інгаляційних алергенів. Ступінь алергічного запалення визначали за вмістом в сироватці крові біомаркерів: імуноглобуліну Е, інтерлейкіну -4, 10. Кількість  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Т клітин визначали методом проточної цитометрії. Визначення поліморфізму генів TLR2, TLR4 та галектину-10 було проведено методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням специфічних праймерів із наступним рестрикційним аналізом. Зв'язки між показниками було визначено непараметричними статистичними методами, проведено факторний, кластерний та дискримінантний аналізи за допомогою статистичного пакету STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., USA) згідно з рекомендаціями [Реброва О.Ю., 2002].

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше досліджена та проаналізована роль поліморфізмів толл-подібних рецепторів 2258G/A гену TLR2 (rs5743708), 896A/G TLR4 (rs4986790) та гену галектину-10 (rs420297 C/T) у патогенезі алергічного риніту шляхом визначення та аналізу зв'язків між особливостями генотипів хворих, показниками стану імунітету та клінічним перебігом захворювання серед населення України.

В отриманих результатах обстеження хворих на АР підтверджена наявність порушень імунної реактивності з різнонаправленими змінами показників гуморального і клітинного імунітету. Аналіз індивідуальних значень імунологічних показників, що вивчались, довів суттєву гетерогенність популяції хворих на АР.

Отримано подальше підтвердження, що у обстежених хворих у переважній більшості випадків АР має спадкову природу (76%) (переважно з боку матері (35%)), розпочинається в дитячому і підлітковому віці і супроводжується іншою алергічною патологією. У структурі сенсibilізації хворих на АР основне місце посідають пилокві (86%), побутові (36%), грибкові (22%) та епідермальні (20%) алергени. У хворих на АР в структурі супутніх захворювань переважали гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ), в т.ч. ускладнені бронхо-легеневою патологією та захворювання шлунково-кишкового тракту (ШКТ).

Подальше вивчення виявило, що при АР у хворих спостерігали помірну та високу еозинофілію, підвищення середнього рівня загального імуноглобуліну Е, зростання відносної кількості  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Трег клітин зі зниженням вмісту IL-10 та підвищенням IL-4.

Вперше вивчено поліморфізм Толл-подібного рецептора 2,4 та галектину-10 серед хворих АР та проведено аналіз розподілу генотипів генів TLR2, TLR4 та галектину-10 у групах контролю та обстежених хворих із АР. Вперше визначений зв'язок підвищення рівня біомаркерів алергічного запалення у хворих на АР із наявністю поліморфних варіантів генів та отримані нові дані про залежність рівня Т регуляторних клітин у хворих на АР від наявності поліморфних варіантів генів.

Виявлена достовірна різниця між частотами генотипів у групах контролю та хворих на АР за поліморфізмом 896A/G (rs4986790) гену TLR4. У хворих на АР носіїв поліморфної алелі за поліморфізмом 896A/G гену TLR4 достовірно частіше виявляється атопічна патологія: супутня БА, супутній АД та БА у поєднанні з АД.

Уперше досліджено популяційну розповсюдженість поліморфізму rs420297 C/T гену галектину-10 серед осіб, що проживають в Полтавській області. Виявлена достовірна різниця між частотами генотипів у групах контролю та хворих на АР за поліморфізмом rs420297 C/T гену CLC-10 та достовірно значно вища частота поліморфної алелі CLC-10 в групі хворих на АР у порівнянні з групою контролю ( $\chi^2 = 6,42$ ;  $p = 0,011$ ). Вперше встановлено, що розвиток та перебіг АР асоційований з поліморфізмом rs420297 C/T гену CLC-10. Виявлена достовірна асоціація між наявністю поліморфної алелі гену CLC-10 та рівнями  $CD^+4$  ( $p=0,014$ ),  $CD^+4 CD^+25$  ( $p=0,012$ ),  $CD^+4 CD^+25^+ Foxp3^+$  ( $0,037$ ). Встановлено, що особи, які несуть поліморфний алель гену CLC-10, мають достовірно вищі рівні IgE ( $p=0,013$ ) та IL-4 ( $p=0,004$ ) та нижчий рівень IL10 ( $p=0,038$ ).

Аналіз імунологічних показників серед носіїв гаплотипів визначених поліморфізмів генів TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 ( rs420297 ) виявив статистично значимо вищий рівень експресії молекул  $CD^+4 CD^+25^+ Foxp3^+$  у хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4 CLC 10 (AG/(CT+TT) ( $p=0,024$ ).

**Практичне значення отриманих результатів.** Виявлену достовірну різницю між частотами генотипів у групах контролю та хворих на АР за поліморфізмами генів TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 ( rs420297); відповідні зміни рівнів біомаркерів алергічного запалення у хворих на АР із наявністю поліморфних варіантів генів; статистично достовірні асоціації перебігу захворювання, супутньої алергічної патології та полівалентної алергії у обстежених хворих можна використовувати для прогнозування розвитку алергічного запалення та формування органу-мішені у хворих на АР. Визначення несприятливих гено- та гаплотипів поліморфізмів генів TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 ( rs420297 ) можна застосовувати для генетичного консультування пацієнтів з сімейним анамнезом atopії.

Матеріали дисертації використовуються в учбовому процесі на кафедрі імунології та біохімії Запорізького національного університету; кафедрі клінічної імунології , алергології та ендокринології Буковинського державного медичного університету; кафедрі внутрішньої медицини №2 і клінічної імунології та алергології Харківського Національного Медичного Університету. Результати досліджень впроваджені в практику лабораторії клінічної імунології Національного інституту фтизіатрії та пульмонології ім. Ф.Г. Яновського.

**Особистий внесок здобувача.** 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 алергічний риніт зі спостереженням пацієнтів у динаміці. Сумісно із співробітниками Науково-дослідницького інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія» (к.мед.н. Шликова О.А., к.мед.н. Куценко Н.Л., к.б.н. Боброва Н.О.) визначено поліморфізми генів толл-подібних рецепторів 2,4 та галектину-10, виконані методики для визначення рівню загального імуноглобуліну Е, рівню IL-4 та IL-10, рівнів експресії поверхневих антигенів клі-

тин CD4, CD25 та внутрішньоклітинного білку Foxp3<sup>+</sup> у даної групи хворих, досліджено стан імунітету у хворих. Автором виконано статистичну обробку та аналіз отриманого матеріалу, сформульовано основні положення, висновки та практичні рекомендації, проведено впровадження результатів досліджень у клінічну практику.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дослідження доповідались і обговорювались на ІХ 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 актуальних питань клінічної та лабораторної імунології, алергології і імунореабілітації (Київ, 2012); Congress of European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), 2013, 2014; Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Медикаментозна алергія: міждисциплінарні підходи до діагностики, лікування та профілактики» (Київ, 2013); Українській науково – практичній конференції з міжнародною участю «Імунологія та алергологія: перспективи розвитку» (Київ, 2013).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 10 друкованих робіт, серед них 6 статей у фахових виданнях, рекомендованих ДАК України, 4 – у тезах матеріалів наукових з’їздів та конференцій, у тому числі з міжнародною участю.

**Об’єм і структура дисертації.** Дисертацію викладено на 132 сторінках друкованого тексту. Дисертація складається зі вступу, 5 розділів (огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати клініко-лабораторних досліджень, результати молекулярно-генетичних досліджень обговорення отриманих результатів), висновків та списку використаних джерел, що включає 161 джерело, з них кирилицею – 44, латиницею – 117. Текст дисертації проілюстровано 29 таблицями та 25 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи дослідження.** Для вирішення висунутих у роботі 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 імені М.В. Скліфосовського. 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. Усі пацієнти дали письмову добровільну згоду на проведення досліджень. План медико-біологічних досліджень по темі дисертаційної роботи схвалено комісією з етичних питань та біоетики Вищого державного навчального закладу України “Українська медична стоматологічна академія” (протокол № 76 від 17.11.2009 р. засідання Комісії з етичних питань та біоетики).

Діагноз алергічного риніту встановлювали на основі критеріїв діагностики ARIA (2008) за алгоритмом діагностики, прийнятим в Україні та затвердженим

МОЗ України (від 03.07.2006 № 432) серед яких обов'язкові: свербіння носа, ринорея, закладеність носа, часте чхання; та додаткові. Діагноз алергічного риніту встановлювали за наявності трьох і більше обов'язкових та трьох і більше додаткових критеріїв. Ступінь тяжкості захворювання у хворих на АР оцінювали з урахуванням таких критеріїв: анамнестичні показники, тяжкість клінічних проявів, їх вплив на загальний стан та якість життя (працездатність, навчання, відпочинок, денну активність, сон та ін.), частота застосування лікарських засобів та їх ефективність. Якість життя хворих визначали за допомогою загальноновизнаних опитувальників ("Rhinosconjunctivitis Quality of Life Questionnaire"-RQLQ) E.Juniper et al. (1999)). Питання об'єднані в 7 розділів: активність, сон, неносові симптоми, практичні проблеми, носові, очні симптоми і емоції. Показники балів по кожному розділу отримували шляхом обчислення середнього значення. Сумарний показник якості життя визначався як середнє значення показників по всіх розділах. Кількість балів зворотно пропорційна якості життя.

На базі поліклінічного відділення четвертої міської клінічної лікарні та алергологічного відділення Полтавської обласної клінічної лікарні ім. М.В. Скліфосовського були проведені інструментальні обстеження та алергологічне обстеження. Алергологічне обстеження проводилося за загальноприйнятою методикою шляхом постановки шкірних пріск-тестів (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 та за 72 години до забору зразків крові.

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 градисні шільності 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 [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 [Ізмайлова 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-Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub> 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-експресс-кровь» (ООО

НПФ «Литех», Росія), ампліфікували за допомогою алель-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 флюоресценції.

Фенотип лімфоцитів аналізували за допомогою визначення рівнів експресії поверхневих антигенів клітин CD4, CD25 та внутрішньоклітинного білка Foxp3<sup>+</sup> методом проточної цитофлюориметрії («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.

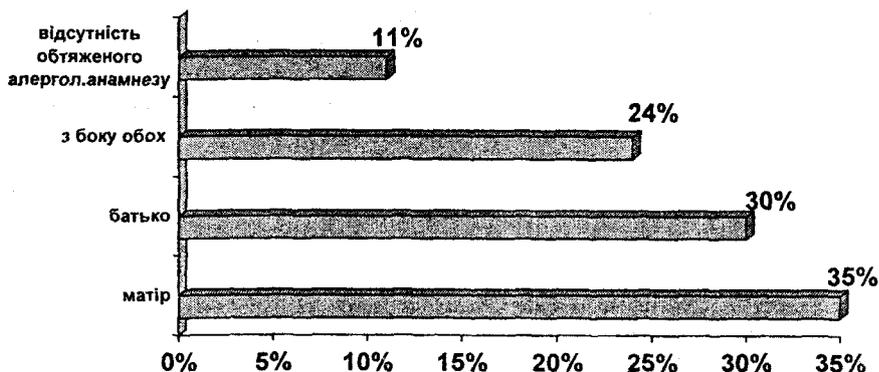
Статистичну обробку отриманих результатів провели за допомогою статистичного пакету STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., USA) згідно з рекомендаціями. Для кількісних параметрів розраховували:  $M$  – середнє вибіркове,  $m$  – стандартну похибку середнього. Оцінку відмінності між групами за рівнем кількісних ознак проводили за допомогою непараметричного  $U$ -критерію Манна-Уїтні для незалежних вибірок. Аналіз відмінності частотних характеристик якісних ознак у двох незалежних групах проводили за допомогою непараметричних методів  $\chi^2$  з поправкою Йетса на безперервність, точного двостороннього критерію Фішера (для малих груп). Для виявлення залежностей між кількісними та якісними параметрами проводили непараметричний кореляційний аналіз з використанням коефіцієнту рангової кореляції Спірмена ( $R$ ). Для встановлення наявності лінійних статистичних зв'язків кореляції між показниками проводили факторний аналіз за методом головних компонентів. Розподіл генотипів за визначеними поліморфними локусами перевіряли на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга (ХВВ) за допомогою критерію  $\chi^2$ . Для порівняння частот алелей використовували критерій  $\chi^2$  Пірсона з поправкою Йетса на безперервність за кількості ступенів свободи рівній 1. Порівняння частот генотипів між досліджуваними групами проводили шляхом аналізу таблиці спряженості за допомогою точного тесту Фішера. Для порівняння частот варіантів у нез'язаних групах вираховували відношення шансів (ВШ) із визначенням 95% довірчого інтервалу (ДІ). Для аналізу асоціації маркерів генів з atopічним дерматитом, а також з якісними патогенетично важливими ознаками захворювання порівнювали частоти алелей і генотипів з використанням критерію  $\chi^2$  з поправкою Йетса на безперервність. Для всіх процедур статистичного аналізу критичний рівень значимості ( $p$ ) приймали рівним 0,05; при  $0,05 < p \leq 0,1$  зазначали тенденцію до відмінності.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ 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 ARIA (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 поліпозний - 18%, середній отит - 9%, дисфункція євстахієвих 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 (рис.1), що узгоджується з науковими даними щодо переважного зв'язку з алергічними захворюваннями з боку матері [Охотникова Е.Н., 2008].

**Рис. 1 Розподіл спадкування серед хворих на АР з обтяженим алергологічним анамнезом.**



При алергологічному обстеженні хворих на АР у 89% пацієнтів були виявлені позитивні шкірні проби на пилкові, грибкові, побутові, епідермальні та харчові але-

ргени, 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. У 11% хворих шкірні проби були негативними до всіх використаних алергенів. У спектрі сенсibilізації хворих на АР переважала чутливість до пилоквих алергенів – у 86%, у 36% виявлена чутливість до побутових алергенів, а саме алергенів домашнього пилу, де основна роль в алергізувальній активності належить *Dermatophagoides pteronyssinus*. Чутливість до грибкових алергенів у 22% хворих, серед них провідну роль відіграють цвілеві гриби роду *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*. Чутливість до епідермальних та харчових алергенів – у 20% та 12% відповідно. У 44% перебіг АР був пов'язаний з різними нозологічними формами алергічної патології. У 20% обстежених хворих на АР був установлений супутній діагноз БА, у 6% присутня симптоматика АД, повна триада atopії виявлена у 10% обстежених нами хворих на АР. Інші алергічні прояви (кропив'янка, алергічний кон'юнктивіт) були зафіксовані у 12% хворих на АР. Практично в усіх обстежених хворих на АР виявлені анамнестичні дані про супутню соматичну патологію. У 58% хворих були часті гострі респіраторні захворювання (ГРЗ), з характерним затяжним перебігом та ускладненнями з боку бронхо - легеневої системи (бронхіти, пневмонії) – 35%), що, ймовірно, відіграє значну роль у розвитку та підтриманні АР [Баранова Н.И., 2009]. У 18% обстежених хворих діагностовано викривлення носової перегородки. Патологія шлунково-кишкового тракту (ШКТ) виявлена у 44% обстежених хворих, переважали: хронічні гастродуоденіти – 32%, виразкова хвороба шлунка та дванадцятипалої кишки – 20%, дискінезія жовчно-вивідних шляхів (ДЖВШ) – у 23%, захворювання печінки – 8%, панкреатопатії – 10%.

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<sub>рег</sub>) клітин визначає шлях до розуміння механізмів периферичної толерантності та індукції Тх1- та Тх2 – опосередкованих імунних реакцій, дисбаланс яких супроводжує розвиток АР. Відомо, що важливим є не стільки співвідношення Тх1 > Тх2, 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 [Lityukova 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 [Литвинов А.В., 2007].

Однак у 15% пацієнтів виявлена еозинофілія зі збільшенням абсолютної та відносною кількістю еозинофілів. Еозинофілія вважається суттєвою особливістю імунопатогенезу та діагностичною ознакою АР, розвиток якої, відбувається за імунним механізмом та обумовлений протекторною функцією еозинофільних гранулоцитів у

гальмуванні анафілактичних реакцій при алергічних хворобах [ Євстігнєєв І.В., 2009; Foresi A. et al., 2000].

При визначенні рівня загального IgE у 76% пацієнтів відзначається достовірне підвищення показників, рівень загального IgE становив  $198,2 \pm 11,42$  МО/мл. Серед них у 16% - виявлені незначні підвищення рівнів IgE (нижчі за 200 МО/мл), у 48% - показники були в межах від 200 до 300 МО/мл та у 12% показники загального IgE перевищували 300 МО/мл, що підтверджує провідну роль IgE - опосередкованих імунних реакцій при atopії [Johansson S.G.O et al., 2001; Kaidashev I.P., 2009]. Між групами хворих залежно від ступеня тяжкості була виявлена різниця за показниками рівню IgE вищі значення якого достовірно були встановлені у хворих з середньо-важкою формою перебігу (критерій Манна-Уїтні U (n=34; n=11)=60,5; p=0,000835) та склав 220 МО/мл.

За оцінкою результатів імунограми показники рівня експресії молекул CD4<sup>+</sup> суттєво не відрізнялися від показників практично здорових людей і становили у середньому  $40,5 \pm 1,2\%$ . Слід зазначити зростання відносної кількості CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Трег клітин у порівнянні з показниками практично здорових людей, що узгоджується з результатами сучасних досліджень [Bellinghausen I. et al., 2003; Schmidt-Weber C.B. 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 посилює виживання еозинофілів. В середньому показник складав  $50,3 \pm 3,6$  пг/мл, що в 2,5 рази перевищує значення показників здорових осіб. Між групами хворих залежно від ступеню тяжкості була виявлена різниця за показниками рівню ІЛ-4; вищі значення якого достовірно були встановлені у хворих з середньо-важкою формою перебігу (критерій Манна-Уїтні U (n=34; n=11)=61,5; p=0,000918) та склали 57 пг/мл). При з'ясуванні залежності рівня ІЛ4 від кількості алергенів відмічено, що в групі з проявами поліалергії рівень ІЛ4 був статистично значимо вищий, ніж в групі з проявами моноалергії (критерій Манна-Уїтні U (n=37; n=8) =24; p=0,000232) та склав 56 пг/мл). Отримані дані узгоджуються з результатами сучасних досліджень [ Баранова Н.И., 2009].

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 цитокина ІЛ-10 у хворих на АР у середньому склав  $0,35 \pm 0,016$  пг/мл. Між групами хворих залежно від ступеню тяжкості була виявлена різниця за показниками рівню ІЛ10; вищі значення якого достовірно були встановлені у хворих з легкою формою перебігу (критерій Манна-Уїтні U (n=34; n=11)=57; p=0,000596) та склали 0,48 пг/мл. Це може бути пов'язано 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 концен-

трації у сироватці цитокінів Th-1 профілю) або залишатися підвищеним [Bellinghausen I. et. al., 2003].

Для виявлення прихованого дисбалансу імунної системи та встановлення наявності статистичних зв'язків між імунологічними показниками хворих на АР був проведений кореляційний аналіз за методом Спірмена. Встановлення наявності статистичних зв'язків між імунологічними показниками хворих на АР виявило помірну позитивну кореляція між імунологічними показниками:  $CD4^+CD25^+Foxp3$  і  $CD4^+$  ( $R=0,43$ ;  $p=0,002954$ );  $CD4^+CD25^+Foxp3$  і відносною кількістю еозинофілів ( $R=0,35$ ;  $p=0,024697$ );  $CD4^+CD25^+$  і  $IL10$  ( $R=0,99$ ;  $p=0,00$ );  $IgE$  і  $IL4$  ( $R=0,94$ ;  $p=0,00$ ). Також виявлена негативна кореляція між  $CD4^+CD25^+$  і  $IgE$  ( $R = -0,95$ ;  $p=0,00$ );  $CD4^+CD25^+$  і  $IL4$  ( $R=-0,98$ ;  $p=0,00$ );  $IgE$  і  $IL10$  ( $R=-0,95$ ;  $p=0,00$ );  $IL4$  і  $IL10$  ( $R=-0,95$ ;  $p=0,00$ ). Отримані результати свідчать про відсутність грубих імунологічних порушень у хворих на АР в період ремісії та підтверджують тісний взаємозв'язок між рівнем алергічного запалення та Т-регуляторними клітинами.

Згідно з сучасними дослідженнями, гени атопії 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 A 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].

Результатом активації  $TLR4$  є ініціація транскрипції генів, які регулюють синтез протизапальних цитокінів [Титова Н.Д., 2009]. Функціональний поліморфізм

гена 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 T1/T2- 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 AP [Kang I. et al., 2010].

При дослідженні поліморфізму rs420297 C/T гену CLC-10 у групі контролю частота генотипу CC становила 75,56%, гетерозиготного генотипу CT – 22,22%, генотип TT – 2,22%. У хворих на AP відповідно: CC – 57,78%, CT – 24,44% та TT – 17,78%.

Виявлена достовірна різниця між частотами генотипів у групах контролю та хворих на AP ( $p = 0,04$ ). Достовірно значно вищою виявилася різниця за частотою поліморфної алелі T в групі хворих на AP - 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 [Byborn M. et al., 2010].

Проведена перевірка розподілу генотипів за поліморфізмами 2258G/A гену TLR2 (rs5743708) та гену TLR 4 (Asp299Gly) на відповідність PХВ за допомогою критерію  $\chi^2$  шляхом порівняння частот генотипів, що спостерігаються, з очікуваними показала, що такий розподіл генотипів відповідає теоретично очікуваному при PХВ як у групі контролю (TLR2 ( $\chi^2 = 0,204$ ;  $p = 0,90$ ); TLR 4 ( $\chi^2 = 0,031$ ;  $p = 0,99$ )), так і в групі хворих (TLR2 ( $\chi^2 = 0,055$ ;  $p = 0,97$ ); TLR 4 ( $\chi^2 = 0,205$ ;  $p = 0,90$ )).

При дослідженні поліморфізму rs420297 гену галектину-10 у групі популяційного контролю очікувана гетерозиготність та гетерозиготність, яка спостерігається показала, що такий розподіл генотипів не відповідає теоретично очікуваному при PХВ, як у групі контролю ( $\chi^2 = 0,061$ ;  $p = 0,97$ ), так і в групі хворих ( $\chi^2 = 7,862$ ;  $p = 0,02$ ).

У досліджуваних поліморфізмах спостерігається нерівномірний розподіл алелей, на що вказує проведений аналіз показника врахування рідкісних алелей ( $\mu < 2$ ) і частки рідкісних алелей ( $h > 0$ ), а також виявлено співпадання очікуваної гетерозиготності та гетерозиготності, яка спостерігається, що свідчить про рівновагу генетичної структури даної популяції.

Генетичні маркери можуть визначати схильність до захворювання або бути асоційованими з відповідними патогенетично значущими показниками. Тому в межах запропонованого дослідження було вивчено вплив поліморфізму гену TLR2 (rs5743708), гену TLR 4 (Asp299Gly) та гену CLC-10 (rs420297) на перебіг та особливості клінічних проявів AP. Під час аналізу відмінності за частотою виявлення цілорічної та сезонної форми перебігу між групами хворих на AP 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 ( $p=0,0005$ ). Статистично достовірної асоціації поліморфізму 2258G/A гену TLR2 та гену CLC-10 (rs420297 C/T) з розвитком у хворих іншої atopічної патології ( $p=0,3037$ ) не встановлено. Отримані дані узгоджуються з результатами проведених досліджень вітчизняних та зарубіжних вчених [Титова Н.Д., 2009]. 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<sub>reg</sub> клітин [Kubach I. et al., 2007].

З метою виявлення відмінностей між хворими на АР залежно від досліджуваних поліморфізмів гену імунологічними показниками було проведене 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<sup>+</sup> ( $U_{(n=42, n= 3)} = 12,00$ ;  $p=0,020$ ). Слід зазначити, що рівень експресії молекул CD4<sup>+</sup> у хворих на АР з алеллю А гену TLR2 в середньому мав тенденцію до збільшення, а у хворих на АР носіїв алелі G не виходив за межі показників практично здорових осіб.

Також група хворих на АР з алеллю А гену TLR2 достовірно відрізнялась за вищим значенням лімфоцитів ( $U_{(n=42, n= 3)} = 11,50$ ;  $p=0,019$ ) від групи хворих на АР гомозиготних носіїв алелі G.

Відмінності між групами хворих на АР залежно від генотипів поліморфізму Asp 299 Gly гену TLR4 за імунологічними показниками не були статистично значущими.

Виявлена достовірна різниця між групами хворих на АР з наявністю поліморфної алелі T гену CLC-10 та гомозиготними носіями алелі C за показником CD4<sup>+</sup> ( $U_{(n=26, n= 9)} = 139,50$ ;  $p=0,014$ ). Слід зазначити, що рівень експресії молекул CD4<sup>+</sup> у хворих на АР з алеллю T гену галектину-10 в середньому мав тенденцію до збільшення, а у хворих на АР носіїв алелі C не виходив за межі показників практично здорових осіб (табл.1).

**Відмінності за імунологічними показниками хворих на АР залежно від генотипів поліморфізму гену галектину-10 (M±m)**

Показник	Хворі на АР з генотипами СТ+ТТ, (n=19)	Хворі на АР з генотипом СС, (n=26)
CD4 <sup>+</sup> , %	44,1±1,9	37,9±1,4
U, p	U <sub>(n=26;n=19)</sub> = 139,5; p=0,014	
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> , %	11,1±1,3	21,2±2,9
U, p	U <sub>(n=26;n=19)</sub> = 136,0; p=0,012	
Загальний IgE, МОд/мл	234,9±12,5	171,5±15,7
U, p	U <sub>(n=26;n=19)</sub> = 138,5; p=0,013	
ІЛ-4, пг/мл	61,6±5,3	42,1± 4,2
U, p	U <sub>(n=26;n=19)</sub> = 123,00; p=0,004	
ІЛ-10, пг/мл	0,30±0,11	0,39±0,02
U, p	U <sub>(n=26;n=19)</sub> = 136,5; 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (U<sub>(n=26;n=9)</sub> = 136,0; p=0,012) від групи хворих на АР гомозиготних носіїв алелі С. Отже, галектин -10 є необхідним для здійснення регуляторної активності T<sub>рег</sub> 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<sub>(n=26;n=9)</sub> =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<sub>(n=26;n=9)</sub> =123,00; p=0,004), рівень якого становив 61,6±5,3 пг/мл.

Рівень супресорного цитокіна ІЛ-10 у хворих на АР у середньому склав 0,35 ± 0,02 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<sub>(n=26;n=9)</sub> =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<sup>+</sup> ( $U_{(n=26, n=19)} = 37,00$ ;  $p=0,006$ ). Також група хворих на АР гомозиготних носіїв алелі Т гену CLC-10 достовірно відрізнялась за вищим значенням рівня CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> % ( $U_{(n=26, n=8)} = 52,50$ ;  $p=0,037$ ) від групи хворих на АР гомозиготних носіїв алелі гену CLC-10 (табл. 2).

Таблиця 2

Відмінності за імунологічними показниками хворих на АР залежно від генотипів поліморфізму гену галектину-10 гомозиготних носіїв (M±m)

Показник	Хворі на АР з генотипом ТТ гену галектину-10, (n=8)	Хворі на АР з генотипом СС гену галектину-10, (n=26)
CD4 <sup>+</sup> , %	46,9±2,3	37,9±1,4
U, p	$U_{(n=8; n=26)} = 37,0$ ; $p=0,006$	
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> , % (тис/мкл)	6,6±1,5	4,1±0,4
U, p	$U_{(n=8; n=26)} = 52,5$ ; $p=0,037$	

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

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

Для з'ясування можливого поєднання різних генотипів всіх генів, що визначаються проведено аналіз гаплотипів. Виявлено, що найчастіше зустрічається гаплотип GGAACC, як в групі контролю (30%), так і у хворих на АР (23%).

При порівнянні частот гаплотипів визначених поліморфізмів генів TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 ( rs420297) у групах хворих на АР та популяційного контролю не виявлено достовірної залежності між наявністю у генотипі алеля Т гену галектину -10, алеля А гену TLR 2 або алеля G гену TLR 4 та розвитком АР.

При вивченні поширеності можливого поєднання генотипів генів TLR 4 (rs4986790) та CLC10 ( rs420297) виявлено, що найчастіше зустрічається гаплотип ААСС, як в групі контролю (30%), так і у хворих на АР (24%), у групах хворих на АР та популяційного контролю не виявлено достовірної залежності між наявністю у генотипі алеля Т гену галектину -10 та алеля G гену TLR 4 з розвитком АР.

У хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4/ CLC 10, які містять поліморфні алелі G та T, виявлено достовірно вищий рівень експресії молекул CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg клітин (критерій Манна-Уїтні  $U_{(n=4, n=41)} = 25,50$ ;  $p=0,024$ ), що склав  $6,29 \pm 0,50\%$  (тис/мкл) із зниженням вмісту IL-10 та підвищенням IL-4 ( $55,9 \pm 11,33$  пг/мл).

Отже, виявлені в результаті дослідження зміни і взаємозв'язки клініко-

імунологічних показників у хворих на АР носіїв поліморфних алелей генів TLR2, TLR 4, CLC-10 вказують на важливе значення зазначених поліморфізмів у визначенні перебігу АР, наявності супутньої патології, полівалентної алергії у хворих на АР та реалізації імунних механізмів у патогенезі захворювання, оскільки спричинюють порушення розпізнавання інфекційних агентів і дисбаланс функціонування системи вродженого імунітету.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукового завдання імунології та алергології визначення генетичної детермінованості алергічного запалення шляхом дослідження ролі толл-подібних рецепторів вродженого імунітету за поліморфізмами TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 (rs420297) для поглиблення знань про механізми розвитку алергічного риніту.

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 сенсibiлізація до двох і більше груп алергенів.

2. При дослідженні імунного статусу хворих АР у 15% хворих спостерігали еозинofilію, підвищення середнього рівня загального імуноглобуліну Е ( $198,2 \pm 11,4$ ), вищі значення якого достовірно були встановлені у хворих з середньоважкою формою перебігу ( $p=0,0008$ ), зростання відносної кількості  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Трег клітин із зниженням вмісту IL-10 та підвищенням IL-4.

3. У групі хворих на АР встановлена розповсюдженність 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  $CD4^+$  ( $U_{(n=42, n=3)} = 12,00$ ;  $p=0,020$ ). Хворі на алергічний риніт носії поліморфної алелі гену TLR2 відрізнялись достовірно вищим значенням лімфоцитів ( $U_{(n=42, n=3)} = 11,50$ ;  $p=0,019$ ).

4. У групі хворих на АР встановлена розповсюдженність поліморфізму гену TLR 4 (Asp299Gly): генотип AA становив 92,3%, генотип AG – 7,7%, генотип GG не зустрічався. Виявлена достовірна різниця між частотами 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. Розповсюдженність поліморфізму rs420297 гену галектину-10 серед осіб, що проживають в Полтавській 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% ( $\chi^2 = 6,42$ ;  $p = 0,011$ ). 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 T та алелі C 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 IL - 4 ( $p=0,004$ ) та нижчий рівень IL10 ( $p=0,038$ ).

7. При порівнянні частот гаплотипів визначених поліморфізмів генів TLR2 (rs5743708), TLR 4 (Asp299Gly) та CLC-10 (rs420297) у групах хворих на АР та популяційного контролю не виявлено достовірної залежності між наявністю у генотипі алеля T гену галектину-10, алеля A гену TLR 2 або алеля G гену TLR 4 та розвитком АР. Встановлено, що у хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4/ CLC 10, які містять поліморфні алелі G та T, виявлено достовірно вищий рівень експресії молекул  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Трег клітин ( $p=0,024$ ), що склав  $6,29 \pm 0,50\%$  (тис/мкл) із зниженням вмісту IL-10 та підвищенням IL-4 ( $55,9 \pm 11,33$  пг/мл).

### ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. До плану обстеження хворих на АР рекомендується включати молекулярно-генетичні методи досліджень, зокрема, визначення поліморфізму 896A/G гену TLR4 (rs4986790) та гену галектину-10 (rs420297).

2. Дані про зв'язок поліморфізмів генів толл-подібних рецепторів 2258G/A гену TLR2 (rs5743708), 896A/G TLR4 (rs4986790) та гену галектину-10 (rs420297) та T-регуляторних клітин можуть бути задіяні в розробці лікувальних та профілактичних засобів при алергічному риніті.

3. Визначення поліморфізму 896A/G гену TLR4 та гену галектину-10 (rs420297) можна застосовувати для генетичного консультування пацієнтів з сімейним анамнезом atopії.

## СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Сакевич В.Д. Клінічний перебіг та особливості стану клітинного та гуморального імунітету у хворих на алергічний риніт / Сакевич В.Д., М.В. Микитюк, Н.Л. Куценко, І.П. Кайдашев // Лікарська справа=Врачебное дело. – 2014. – № 1 – С.15-20. *(Здобувачем особисто підібрані хворі для обстеження, зроблено статистичний аналіз отриманих результатів).*

2. Сакевич В.Д. Взаємозв'язок клініко-імунологічних показників у хворих на алергічний риніт з мутантними алелями толл - подібного рецептора 4 (TLR 4 Asp 299 Gly) / Сакевич В.Д., Шликова О.А., Кайдашев І.П. // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2013. – Т. 13, № 3 (43). – С. 242–245. *(Здобувачем особисто підібрані хворі для обстеження, зроблено статистичний аналіз отриманих результатів).*

3. Сакевич В.Д. Розповсюдженість поліморфних алелей 2258G/A гену TLR2 та їх зв'язок з окремими імунологічними показниками серед хворих на алергічний риніт / Сакевич В.Д., Шликова О.А., Боброва Н.О., Кайдашев І.П.// Астма та алергія. – 2013. – № 3 – С.51-56. *(Здобувачем особисто підібрані хворі для обстеження, зроблено статистичний аналіз отриманих результатів).*

4. Сакевич В.Д. Розповсюдженість гаплотипів поліморфізмів генів TLR 2, TLR 4, CLC-10 та їх зв'язок з окремими імунологічними показниками у хворих на алергічний риніт / В.Д.Сакевич, О.В.Ізмайлова, О.А.Шликова, І.П.Кайдашев // Проблеми екології та медицини. – 2013. – № 5–6. – С. 9–12. *(Здобувачем особисто підібрані хворі для обстеження, зроблено статистичний аналіз отриманих результатів).*

5. Сакевич В.Д. Розповсюдженість поліморфної алелі rs420297 C/T гену галектину-10 (CLC-10) та її зв'язок з окремими імунологічними показниками серед хворих на алергічний риніт / В.Д.Сакевич, О.В.Ізмайлова, О.А.Шликова, І.П.Кайдашев // Імунологія та алергологія: наука і практика – 2013. – № 3. – С. 8–14. *(Здобувачем особисто підібрані хворі для обстеження, зроблено статистичний аналіз отриманих результатів).*

6. Сакевич В.Д. Особливості імунного статусу хворих на алергічний риніт у залежності від поліморфізму генів TLR 2,4 та галектину-10 / В.Д.Сакевич, О.А.Шликова, І.П.Кайдашев // Проблеми екології та медицини. – 2014. – Т.18, № 3–4. – С. 34–39. *(Здобувачем особисто підібрані хворі для обстеження, зроблено статистичний аналіз отриманих результатів).*

7. Сакевич В.Д., Шликова О.А., Кайдашев І.П. Розповсюдженість поліморфізму гену галектину-10 в групі хворих на алергічний риніт та в групі популяційного контролю. // 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. 7-8. *(Здобувачем особисто підібрані хворі для проведення обстеження, проаналізовані отримані результати).*

8. V. D. Sakevich, I.P. Kaidashev, L.M. DuBuske Relationship of polymorphisms of toll-like receptors 2 and 4 and T-regulatory cells in patients with allergic rhinitis

/ EAACI congress – June 2013 – 996. *(Здобувачем особисто підібрані хворі для проведення обстеження, проаналізовані отримані результати).*

9. V. Sakevich, I.P. Kaidashev, N. Lyakhovskaya, L.M. DuBuske Relationship of polymorphisms of Clara cell protein (CC16) and galectin 10 and immunological parameters in patients with atopic asthma and allergic rhinitis / EAACI congress – June 2014 – 836. *(Здобувачем особисто підібрані хворі для проведення обстеження, проаналізовані отримані результати).*

10. Сакевич В.Д., Куценко Н.Л., Кайдашев І.П. Дослідження Т регуляторних клітин у хворих на алергічний риніт в залежності від клінічного перебігу // Міжнародна науково-практична конференція «Імунозалежні стани: сучасна лабораторна імунологічна діагностика, лікування та профілактика», 29 – 30 березня, 2012 р., м. Київ. – 2012. – С. 89. *(Здобувачем особисто підібрані хворі для проведення обстеження, проаналізовані отримані результати).*

## АНОТАЦІЯ

**Сакевич В.Д. Роль поліморфізмів толл-подібних рецепторів 2,4 та галектину-10 в розвитку алергічного риніту. Рукопис.**

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

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукового завдання імунології та алергології стосовно визначення генетичної детермінованості при алергічному риніті шляхом дослідження ролі толл-подібних рецепторів вродженого імунітету за поліморфізмами TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 (rs420297) у патогенезі та аналізу зв'язків між особливостями генотипів та гаплотипів хворих, показниками стану імунітету та клінічним перебігом захворювання.

В обстежених хворих алергічний риніт у 76% випадків має спадкову природу переважно з боку матері (36%). При дослідженні імунного статусу хворих алергічний риніт у 15% хворих спостерігали еозинофілію, підвищення середнього рівня загального імуноглобуліну Е, зростання відносної кількості CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Трег клітин із зниженням вмісту IL-10 та підвищенням IL-4. Виявлена достовірна різниця між частотами генотипів у групах контролю та хворих на алергічний риніт за поліморфізмом гену TLR 4(Asp299Gly) (p = 0,03). Поліморфізм rs420297 гену CLC-10 достовірно частіше зустрічається в групі хворих на алергічний риніт (p = 0,04). Виявлена достовірна асоціація між наявністю поліморфної алелі гену CLC-10 та рівнями CD4<sup>+</sup>(p=0,014), CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>(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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>(p=0,037), CD4<sup>+</sup>(p=0,014). Встановлено, що особи які несуть поліморфну алель гену CLC-10 мають достовірно вищий рівні IgE, ІЛ- 4 та нижчий рівень ІЛ10. У хворих на алергічний риніт носіїв гаплотипів TLR4/ CLC 10, які містять поліморфні алелі G та T, виявлено достовірно вищий рівень експресії молекул CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Трег клітин (p=0,024) із зниженням вмісту IL-10 та підвищенням IL-4.

**Ключові слова:** алергічний риніт, імунітет, толл-подібні рецептори, галектин-10, поліморфізм.

## АННОТАЦІЯ

**Сакевич В.Д. Роль поліморфізмів толл - подібних рецепторів 2,4 і галектина - 10 в розвитку алергічного риніта. - Рукопись .**

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

В диссертационной работе 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 патогенезе и анализа связей между особенностями генотипов и гаплотипов больных, показателями состояния иммунитета и клиническим течением заболевания.

Обследовано 45 пациентов в возрасте от 19 до 65 лет больных аллергическим ринитом, на стадии клинической ремиссии заболевания. У обследованных больных аллергический ринит 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 аллергический ринит у 15% больных наблюдали эозинофилию, повышение среднего уровня общего иммуноглобулина Е, высокие значения которого достоверно были установлены у больных со средне - тяжелой формой течения (p=0,0008), рост относительного количества CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Трег клеток со снижением содержания IL-10 и повышением IL- 4.

Выявлена достоверная разница между частотами генотипов в группах контроля и больных аллергическим ринитом за полиморфизмом гена TLR 4 ( Asp299Gly) (p = 0,03). Впервые исследована популяционная распространенность полиморфизма rs420297 гена галектина-10 среди лиц, проживающих в Полтавской области (CC -76 %; CT- 22%; TT - 2%). Выявлена достоверная разница между частотами генотипов в группах контроля и больных аллергическим ринитом (p = 0,04), полиморфизм rs420297 гена CLC-10 достоверно чаще встречается в группе больных аллергическим ринитом. Выявлена достоверная ассоциация между наличием полиморфной аллели гена CLC-10 и уровнями CD4<sup>+</sup> (p=0,014), CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (p=0,012), в группе гомозиготных носителей полиморфной аллели T и аллели C гена CLC-10 установлена достоверная ассоциация между наличием полиморфной аллели гена CLC-10 и уровнями CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (p=0,037), CD4<sup>+</sup> (p=0,014). Установлено, что лица, которые несут полиморфную аллель гена CLC-10 имеют достоверно более высокие уровни IgE (p=0,013) и IL- 4 (p=0,004), и более низкий уровень IL10 (p=0,038). У больных аллергическим ринитом носителей гаплотипов TLR4 / CLC 10, содержащие полиморфные аллели G и T, выявлен достоверно более высокий уровень экспрессии молекул CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Трег клеток (p=0,024) со снижением содержания IL-10 и повышением IL- 4.

В полученных результатах подтверждены нарушения иммунной реактивности с разнонаправленными изменениями показателей гуморального и клеточного иммунитета. Анализ индивидуальных значений иммунологических показателей, которые изучались, доказал существенную гетерогенность популяции больных аллергическим ринитом. Обнаруженную достоверную разницу между частотами исследуемых генотипов в группах контроля и больных аллергическим ринитом; соответствующие изменения уровней биомаркеров аллергического воспаления у больных аллергическим ринитом с наличием полиморфных вариантов генов; статистически достоверные ассоциации течения заболевания, сопутствующей аллергической патологии и поливалентной аллергии у обследованных больных можно использовать для прогнозирования развития аллергического воспаления и формирования органа - мишени у больных аллергическим ринитом. Определение неблагоприятных генотипов полиморфизмов генов TLR 4 (rs4986790) и CLC-10 (rs420297) можно применять для генетического консультирования пациентов с семейным анамнезом атопии.

Ключевые слова : аллергический ринит , иммунитет , толл - подобные рецепторы, галектин - 10 полиморфизм.

## ABSTRACT

### **Shakevych VD The role of polymorphisms Toll-like receptors 2,4 and Galectin-10 in the development of allergic rhinitis. – Manuscript.**

The dissertation for the scientific degree of Candidate of Medical Sciences specialty 14.03.08 - Immunology and Allergology. – O.O.Bohomolets National Medical University, Kyiv, 2014.

In the thesis the theoretical generalizations and new research assignment solution of 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 pathogenesis and analysis of relationships between genotype and haplotype of patients immune status indicators and clinical course of the disease are given.

At examined patients allergic rhinitis in 76 % cases is predominantly of hereditary nature from the mother (36%). During the study of the immune status of patients with allergic rhinitis in 15 % of patients eosinophilia was observed, increase of the average level of total immunoglobulin E, increase at the relative number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells with the reducing amount of IL -10 and increase IL -4. Revealed significant differences between the frequencies of genotypes in the control group and patients with allergic rhinitis gene polymorphism by TLR 4 (Asp299Gly)(p = 0,03). Polymorphism rs420297 of the gene CLC- 10 was significantly more common in patients with allergic rhinitis(p = 0,04). The significant association between the presence of polymorphic alleles of the gene CLC- 10 levels and CD4<sup>+</sup> revealed, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, in the group of homozygous carriers of polymorphic alleles T and C alleles of the gene CLC- 10. The authentic association between the presence of polymorphic alleles of the gene CLC- 10 levels and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>. It is established, that individuals, who carry the gene polymorphic allele CLC- 10 have significantly higher levels of IgE, IL -4 and lower levels of IL10. At patients with allergic rhinitis haplotype carriers TLR4 / CLC 10 containing

polymorphic alleles G and T. Significantly higher level of expression of molecules CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells( $p=0,024$ ) of reducing the amount of IL -10 and increasing IL-4 is found.

**Keywords:** allergic rhinitis, immunity, Toll-like receptors Galectin-10 polymorphism.