© Ляховська Н.В.
УДК [577.21:616.5-002]-053.3/.5

ЗВ'ЯЗОК ПОЛІМОРФІЗМА ГЕНА TLR4 З КЛІНІКО-ІМУНОЛОГІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ ПРИ АТОПІЧНІЙ БРОНХІАЛЬНІЙ АСТМІ*

Ляховська Н.В.

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

Исследована значимость полиморфизма Asp299Gly с заменой A на G в позиции 896 (rs4986790) гена TLR4 и связь с иммунорегуляторными факторами в механизмах развития атопической бронхиальной астмы (АБА). Нами было обследовано 45 человек больных АБА . Диагноз АБА и степень ее тяжести установлен в соответствии с утвержденными критериями полиморфизм гена TLR4 896 A/G статистически достоверно (p = 0,04) встречается в группе больных АБА чем у практически здоровых лиц, что позволяет рассматривать ген TLR 4, как ген-кандидат этого заболевания. У больных, которые несут аллель 896G гена TLR4 заболевание начиналось с детства (p = 0,03), в спектре сенсибилизации присутствовали пищевые факторы (p = 0,02) и проявления другой аллергической патологии (p = 0,045). Единичный нуклеотидный полиморфизм гена TLR4 у больных атопической астмой с компенсированным течением характеризуется существенным снижение уровня IL-10, абсолютного количества $CD4^+$ / 25^+ / $Foxp3^+$ - клеток и отсутствием взаимосвязей этих лимфоцитов с другими иммунологическими показателями. Исследование генетических аспектов атопической бронхиальной астмы позволяют оптимизировать лечебно-диагностические протоколы данной патологии и способствуют внедрению профилактических мероприятий по развитию и распространению аллергических заболеваний

Ключевые слова: атопическая астма, Толл-рецептор, полиморфизм.

Бронхіальна астма - це приклад мультифакторної патології, яка виникає при взаємодії факторів навколишнього середовища й спадкової схильності. В останні роки поряд із клініко - функціональними, імунологічними дослідженнями активно проводиться вивчення генетичних основ атопічної бронхіальної астми (АБА), оскільки такий підхід дозволяє розширити уявлення про механізми розвитку цього складного патологічного фенотипу [19]. Вивчення генетичних аспектів схильності до бронхіальної астми створюють нові перспективи в розробці діагностичних критеріїв, індивідуальних програм профіклактики й стратегії лікування атопічної патології [4 ,15].

Генетика вродженого імунітету стала центром активних міжнародних досліджень, як можлива патогенетична ланка атопії [1]. Значна увага сконцентрована концепції одиничних замін у геномі ДНК (однонуклеотидний поліморфізм — ОНП), які кодують структуру Toll-подібного рецептора 4, порушуючи тим самим регуляцію вродженої імунної системи при взаємодії із цілим рядом антигенів, що може бути ключовим фактором дисбалансу різних видів хелперних лімфоцитів у хворих на АБА [2, 3]. Доведена важлива роль цих патерн-розпізнавальних рецепторів у патогенезі ряду захворювань: атопічної БА у дітей [14], урогенітальних інфекцій [13], запальних хвороб пародонту [16], сприйнятливості до інфекції у ВІЛ-інфікованих [6], цукрового діабету [17], ревматоїдного артриту [12], хронічного саркоідозу [5].

Вивчення розповсюдженості ОНП TLR 4 у хворих на АБА викликає особливу зацікавленість, оскільки, відмінності в генах, що контролюють захисні реакції організму можуть визначати різний характер перебігу запального процесу і специфічних імунологічних реакцій.

Мета дослідження оцінити значимість поліморфізму Asp299Gly зі зміною аденіна на гуанін в позиції 896 (rs4986790) гену TLR4 та його зв'язок з імунорегуляторними факторами в механізмах розвитку АБА.

Матеріали та методи

Нами було обстежено 45 осіб хворих на АБА. Діагноз АБА та ступінь її тяжкості встановлено відповідно до затверджених критеріїв (наказ МОЗ України №767 та міжнародні рекомендації GINA, 2011) на базі алергологічного і пульмонологічного відділення Полтавської обласної клінічної лікарні. Анамнестичні дані зібрані шляхом анкетування з використанням спеціального опитувальника. Усім пацієнтам з АБА були проведені загальноклінічні лабораторні, інструментальні та алергологічне обстеження. Наявність сенсибілізації до алергенів діагностовано шляхом проведення шкірного тестування (прик-тест) з основними аероалергенами (побутовими, пилковими, епідермальними, грибковими) і харчовими алергенами (ТОВ «Імунолог», м. Вінниця). Обстеження проводили за умови відсутності у пацієнта загострення основного чи супутніх хронічних, відсутності гострих інтеркурентних інфекційних захворювань та тяжкої супутньої патології, яка б могла вплинути на результати дослідження. До групи кон-

* *Цитування при атестації кадрів: Ляховська Н.В. Зв'язок поліморфізма гена TLR4 з клініко-імунологічними показниками при атопічній бронхіальній астмі. – 2013. – Т. 17, № 3-4. – С. 27-30.*

тролю увійшли 90 практично здорових осіб, без алергологічного анамнезу з бази ДНК НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Дослідження проводили відповідно наданої письмової згоди на проведення обстеження та ухвали комісії з етичних питань та біоетики вказаного навчального закладу. Виділення геномної ДНК здійснювали методом фенол-хлороформної екстракції. Визначення поліморфізму 896A/G гену TLR4 проведено методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням специфічних праймерів [13].Фенотип лімфоцитів аналізували шляхом визначення рівнів експресії поверхневих антигенів клітин з використанням моноклональних антитіл CD4, CD25 (виробництво «Сорбент», Росія) та внутрішньоклітинного білку FoxP3 («eBioscience», США) методом проточної цитофлюориметрії. Визначення проводили на проточному цитофлюориметрі EPIX LX-MCL (Beckman Coulter, США), використовуючи програму System II TM software, рівень загального IgE, інтерлейкіну-4,10 (ТОВ «Укрмед-Дон», Україна) визначали в сироватці крові за допомогою непрямого імуноферметного аналізу. Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc).

Результати дослідження та їх обговорення

Було проаналізовано частоту поліморфізму Asp299Gly зі зміною аденіну на гуанін в позиції 896 (rs 4986790) ген у TLR4 у хворих на АБА та в групі популяційного контролю (табл.1). У зразках ДНК 90 осіб, що входили до групи контролю, мутантний генотип GG не був виявлений, частота гетерозиготного генотипу AG склала 4,5% (4 особи), частота «дикого» генотипу AA становила 95,6% (86 осіб). У хворих на АБА відповідні дані були такими: GG – не був виявлений, AG – 15,6% (7 осіб), генотип AA -84,4% (38 осіб), тобто між частотами генотипів у групі контролю та у хворих на АБА відмічається достовірна різниця (p = 0,04), що характеризує ген TLR 4, як ген - кандидат в розвитку АБА.

Таблиця 1

Розподіл частот генотипів та алелей гену TLR4 у хворих на АБА та в групі контролю

Генотип,алель	Популяційний контроль (n=90)	Хворі на АБА (n=45)	p*
AA	95,6 (86)	84,4 (38)	
AG	4,5 (4)	15,6 (7)	0,04
GG	0	0	
G	97,8 (176)	92,2 (83)	0,06
A	2,2 (4)	7,8 (7)	

Особливістю хворих, що є носіями мутантної алелі (табл.2.) є прояви полісенсибілізації, а саме поєднання побутової та пилкової алергії з харчовими факторами - це відмічено у всіх 7 хворих (p = 0,013). У 6 осіб цієї групи (p=0,03) прояви АБА починалися в ранньому дитинстві; 4 пацієнти пройшли типові етапи "атопічного маршу". Характерною клінічною ознакою вказаного ОНП TLR4 була супутня алергічна патологія (риніт та кон'юктивіт) (p=0,045). Переважна більшість хворих мали захворювання ШКТ та часті прояви ГРВІ.

Таблиця 2

Клінічні особливості перебігу АБА в залежності від поліморфізму 896A/G гену TLR4

Наявність ознаки		Хворі на АБА носії «дикої» алелі A TLR4, (n=38)	Хворі на АБА носії мутантної алелі G гену TLR4, (n=7)	p*
Полісенсибілізація, що включає харчові фактори	так ні	7 31	7 0	**0,013**
Супутні алергічні захворювання (риніт, кон'юктивіт)	так ні	6 32	5 2	**0,045**
В анамнезі прояви "атопічного маршу"	так ні	7 31	6 1	**0,029**
Часті ГРВІ	так ні	17 21	5 2	0,344

При аналізі даних, що характеризують стан імунної системи у носіїв гомо- та гетерозиготи TRL4 - нами виявлено ряд цікавих фактів, які можуть відігравати важливу роль у розумінні особливостей імунопатогенезу АБА.

Грунтуючись на класичних положеннях сучасної імунологічної науки [7] можна відмітити ознаки дисбалансу у діяльності імунної системи у вказаних групах хворих з компенсованим перебігом АБА. Це в першу чергу стосується високої активності CD4 - лімфоцитів. Характерною ознакою (табл.4) компенсованого перебігу АБА у пацієнтів з гетерозиготними змінами TLR4 є зменшенням кількості (з 17 до 6) статистично достовірних взаємозв'язків та суттєве збільшення сили кореляції цих зв'язків, як приклад - пряма кореляція між рівнями IgE та IL4, яка відображає типовий для АБА взаємозв'язок імунорегулюючої та ефекторної ланок патогенезу. Відмічені достовірні зміни рівня $CD4^+/25^+/Foxp3^+$ та IL10 у хворих з поліморфізмом 896A/G гену TLR4 (табл.3). Як відомо, вказаний інтерлейкін є одним із двох основних ефекторних медіаторів T-reg клітин [18, 8]. Зміни рівня IL-10 можна розглядати, як системну імунну реакцію, як натуральних, так й індукованих Т-регулюючих лімфоцитів - це підтверджують ряд авторів [11].

Факт достовірного зменшення рівня $CD4^+/25^+/Foxp3^+$ у взаємозв'язку з його основним медіатором - IL10 у носіїв гетерозиготного варіанту гена TLR4 може бути важливим фактором у імуногенетичному патогенезі АБА. T-reg клітини контролюють реакції не тільки адаптивного, але і вродженого імунітету, в тому числі і TLR [9]. Відомо, що завдяки наявності Толл - подібних рецепторів на поверхні вказаних регулюючих клітин вони можуть ак-

тивуватися тими ж факторами, що активують ефекторні клітини вродженого імунітету [10]. Доведено, що підсилення активності Т-регулюючих клітин в результаті повторної стимуляції патогенами обумовлено не тільки формуванням клітин пам'яті, але і експансією цих регуляторних клітин під впливом активації через Toll - подібні рецептори [9]. Виходячи з цього, можливо, що генетичні зміни TLR4 можуть призводити до порушення в діяльності іншої складової цього механізму, в нашому випадку – супресії ланки: Т-reg- клітин та IL10.

Таблиця 3

Імунологічні показники у хворих на АБА в залежності від генотипу 896A/G гену TLR4

№	Показник	Носії "дикої алелі" (АА), хворі на АБА (n=38)	Носії мутантної алелі (AG), хворі на АБА (n=7)
1.	CD 4^+, Г/л	0,67 ± 0,07	0,78 ± 0,17
2.	CD $4^+/25^+$,Г/л	0,16 ± 0,02	0,27 ± 0,08
3.	CD $4^+/25^+/Foxp3^+$, Г/л	**0,07 ± 0,01 ***	**0,03 ± 0,01***
4.	Лейкоцити, Г/л	6,55 ± 0,4	8,7 ± 1,89
5.	Еозинофіли, Г/л	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,02
6.	Лімфоцити, Г/л	1,47 ± 0,13	2,05 ± 0,45
7.	IgE, МОд	163,8 ± 14,4	170,8 ± 45,8
8	IL10, пг/л	**0,45 ± 0,02 ***	**0,35 ± 0,03***
9	IL 4, пг/л	63,09 ± 9,28	38,6 ± 8,18

** p ≤ 0,05 у порівнянні з групою осіб носіїв "дикої алелі".*

Таблиця 4

Сила кореляційного зв'язку імунологічних показників в залежності від генотипу 896A/G гену TLR4

	Кореляційні пари *	Носії "дикої алелі" (АА), хворі на АБА (n=38)	Носії мутантної алелі (AG), хворі на АБА (n=7)
1	$CD4^+$ та $CD4^+/25^+$	0,47	--
2	$CD4^+$ та $CD4^+/25^+/Foxp3^+$	0,54	--
3	$CD4^+$ та лейкоцити	0,73	0,93
4	$CD4^+$ та еозинофіли	0,49	--
5	$CD4^+$ та лімфоцити	0,87	0,99
6	$CD4^+/25^+$ та лімфоцити	0,54	--
7	$CD4^+/25^+$ та лейкоцити	--	0,81
8	$CD4^+/25^+/Foxp3^+$та лейкоцити	0,46	--
9	$CD4^+/25^+/Foxp3^+$ та лімфоцити	0,41	--
10	$CD4^+/25^+/Foxp3^+$ та IL10	0,52	--
11	Лейкоцити та еозинофіли	0,59	--
12	Лейкоцити та лімфоцити	0,75	0,92
13	Еозинофіли та лімфоцити	0,60	--
14	IgE та IL4	0,63	0,96
15	IL10та IL4	--	-0,77

**- Всі вказані пари є статистично достовірними (p≤ 0,05)*

Підтвердженням положень [20] про важливість імунорегулюючої дії $CD4^+/25^+/Foxp3^+$ у хворих на АБА може бути поява у осіб із гетерозиготними змінами гену TLR4 достатньої сили негативнонаправленого кореляційного взаємозв'язку IL10 та IL4, які характеризують супресивну дію одного з основних медіаторів Т-reg- клітин на індуктор синтезу алергозначущих імуноглобулінів.

Висновки

1. Поліморфізм гену TLR4 896 A/G статистично вірогідніше частіше (p =0,04) зустрічається в групі хворих на АБА ніж у практично здорових осіб, що дозволяє розглядати ген TLR4, як ген-кандидат в розвитку цього захворювання.

2. У хворих, які несуть алель 896G гену TLR4 захворювання починалось з дитинства (p=0,03), в спектрі сенсибілізації були харчові чинники (p=0,02) та мали місце прояви іншої алергічної патології (p=0,045).

3. Одиничний нуклеотидний поліморфізм гену TLR4 у хворих на атопічну астму з компенсованим перебігом характеризується суттєвим зменшення рівня IL-10, абсолютної кількості $CD4^+/25^+/Foxp3^+$ - клітин та відсутністю взаємозв'язків цих лімфоцитів з іншими імунологічними показниками.

4. Дослідження генетичних аспектів атопічної бронхіальної астми дозволяють оптимізувати лікувально-діагностичні протоколи даної патології та сприяють впровадженню профілактичних заходів щодо розвитку та розповсюдження алергічних захворювань.

Література

1. Bottcher M. TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharideinduced interleukin-12(p70) responses in Swedish chi ldren / M. Bottcher // J. Allergy clin. immunol. - 2004. - P. 561-567.
2. Ferwerda B. Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms / B. Ferwerda, M. BB. Mccall, K. Verheijen, B. J. Kullberg // MOL MED. — 2008. — Vol. 14, № 5—6. — P. 346—352.].
3. Garcia Rodriguez C. Toll-like receptor 4 dependent pathways as sensors of endogenous «danger» signals. New evidences and potential therapeutic targets / C. Garcia Rodriguez // Imunologia. - 2007. - Vol. 26, № 4. — P. 210—215
4. Holloway J.W. Genetics of allergic disease / J.W. Holloway, I.A. Yang, S.T. Holgate // J. Allergy. Clin. Immunol. - 2010. - № 125. - P. 81

5. Pabst S., Baumgarten G., Stremmel A. et al. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms are associated with a chronic course of sarcoidosis / Clin. Exp. Immunol. – V. 143, № 3. – P. 420-426.
6. Papadopoulos A. I., Ferwerda B., Antoniadou A. et al. Association of Toll-Like Receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms with Increased Infection Risk in Patients with Advanced HIV-1 Infection / Clin. Infect. Dis. – 2010. – V. 51, № 2. – P. 242-247.
7. Peakman M.. Basic and clinical Immunology/ M. Peakman, D. Vergani.- 2 edition. –USA- 2009.- 486 p.
8. Pop S. Single cell analysis shows decreasing Foxp3 and TGFbeta coexpreissing CD4+ CD25+regulatory T cells during autoimmune diabetes/ S. Pop, C. Wong, D. Culton. et al. // J Exp Med – 2005 – P 1333-1346
9. Sakaguchi S. Control of immune responses by naturally arising CD4 regulatory T cells that express toll-like receptors/ S. Sakaguchi // J. Exp. Med. – 2003. - Vol. 197. – P 397-401).
10. Taams L. S., Akbar A. N. Peripheral generatijn and function of CD4+CD25+ regulatory T cells // Curr. Top. Mikrobiol. Immunol. – 2005. – Vol.6. – P.152-162
11. Vahlemkamp T. W., Tompkins M. B., Tompkins W. A. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells tin viral infection // Vet. Immun. Immunopathol. – 2005 – Vol.108. – P. 219 - 225.).
12. Белоглазова К.В., Шлыкова О.А., Измайлова О.В., Кайдашев И.П. Полиморфизм гена Toll-like рецептора 4 Asp299Gly у больных ревматоидным артритом / Проблеми екол. та мед. – 2009. – Т.13, № 5-6. – С. 15-17.
13. Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Боброва Н.О. та ін. Роль поліморфізму Toll-подібного рецептора 4 Asp299Gly у розвитку бактеріальних інфекцій, що передаються статевим шляхом / Проблеми екол. та мед. – 2009. – Т.13, № 5-6. – С. 3-6.
14. Крючко Т.О., Кайдашев І.П., Вовк Ю.О. и др. Генетичний поліморфізм Toll-подібного рецептора 4 у дітей з атопічною бронхіальною астмою / Клін. імунол. Алергол. Інфектол. – 2011. – № 5. – С. 52-54.
15. Лапшин В.Ф. Бронхіальна астма й фенотипи свистячих хрипів у дітей / В.Ф Лапшин., Т.Р. Уманець // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. - 2010. - № 2. - С. 66-69.
16. Островська Л.Й., Петрушанко Т.О., Кайдашев І.П. Поліморфізм Asp299Gly гена Toll-подібного рецептора 4 у генезі змін ясен у вагітних / Укр. стоматол. альманах. – 2009. – № 6 – С. 17-19.
17. Сульская Ю. В. Генетический полиморфизм Toll-like рецепторов 4 типа у больных сахарным диабетом 2 типа / Таврический медико-биологический вестник. – 2009. – Т. 12, № 3 (47). – С. 72-74.
18. Фрейдин М.Б. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функция// Мед биология. – 2005. – Т.7, №4. – С.347 - 354.
19. Фрейдин М. Б. Генетика бронхіальної астми / М. Б Фрейдин, Л. М. Огородова, А. Н. Цой, Н. Г. Бердникова. - М. : Атмосфера, 2010. - 78 с.
20. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор роста//Иммунология. – 2006 - №3. – С.176 -186

English version: RELATIONSHIP OF GENE'S POLYMORPHISM OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4 WITH CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN ATOPIC ASTHMA*

Lyakhovskaya N. V.

Bronchial asthma is an example of multifactorial disease that occurs in the interaction of environmental factors and genetic predisposition. The aim of the study was to evaluate the significance of polymorphism Asp299Gly change A to G at position 896 (rs4986790) TLR4 gene and its relationship with the immunoregulatory factors in the mechanisms of atopic asthma (AA). Materials and Methods: We examined 45 people AA patients. The diagnosis of the AA and its severity is set in accordance with the approved criteria. Results: TLR4 gene polymorphism 896 A / G statistically significant (p = 0.04) is found in the group of patients with AA than in healthy individuals, which allows us to consider TLR 4 gene as a candidate gene in the disease. In patients who carry the gene TLR4 896G allele the disease began in childhood (p = 0.03), the spectrum of sensitization were dietary factors (p = 0.02), and there were other manifestations of allergic disease (p = 0.045). A single nucleotide polymorphism of TLR4 gene in patients with atopic asthma is characterized by overcompensated significant reduction in IL-10, the absolute number of $CD4^+$ / 25^+/ $Foxp3^+$ - cells and abcence of relationnshifs between these lymphocytes and other immunological parameters. Conclusion: The study of the genetic aspects of atopic asthma optimize diagnostic and treatment protocols of this disease and contribute to the implementation of preventive measures for the development and dissemination of allergic diseases.

Kay words: atopic asthma, Toll like receptor, polymorphism

Bronchial asthma is an example of multifactorial disease that occurs in the interaction of environmental factors and genetic predisposition. In recent years the study of the genetic basis of atopic asthma (AA) is actively pursued, as this approach allows to extend the understanding of the mechanisms of development of this complex pathological phenotype [19]. The study of the genetic aspects of asthma propensity to create new perspectives in the development of diagnostic criteria for individual programs of atopic disease [4,15]. Genetics of innate immunity has become a center of active international studies as a possible pathogenetic link of atopy [1]. Much attention is focused concept on single nucleotide polymorphism in the genome DNA (SNP) coding structure of Toll - like receptor 4, that can be a key factor imbalance various lymphocytes lymphocytes in patients with AA [2, 3]. The important role of these patterns recognition receptors is prove in the pathogenesis of several diseases : atopic asthma in children [14], urogenital infections [13], inflammatory periodontal disease [16], gerpevirusny infection [6], diabetes mellitus [17] rheumatoid arthritis [12], chronic sarcoidosis [5].

* *To cite this English version: Lyakhovskaya N. V. Relationship of Gene's Polymorphism of Toll-like Receptor 4 with Clinical and Immunological Parameters in atopic asthma / / Problemy ekologii ta medytsyny. - 2013. - Vol 17, № 3-4. - P. 30 -33.*