крові. Знайдене збільшення рівня IL-18 в крові хворих на IgE-залежну форми АД за умови зниженої концентрації IL-12 може служити важливим критерієм для диференціальної діагностики різних форм АД.

Ключові слова: атопічний дерматит, цитокін, інтерлейкін.

SUMMARY

SERUM CYTOKINE LEVELS FROM ATOPIC DERMATITIS PATIENTS

Kurchenko A.I.,

O.O. Bogomolec National Medical University

The crossregulation of Th1/Th2 derivation and function in AD patients are incompletely characterized. We investigated serum levels of several cytokines (IL-2, IL-12, IL-10 and IL-18) in patients with IgE-dependent and IgE-independent forms of AD. Serum IL-18 levels in patients with IgE- dependent form of AD were significantly higher than those in IgE-independent form and healthy controls. These results suggest the value of serum IL-18 levels as a parameter of AD activity and may support a possible role for IL-18 in the pathogenesis of AD.

Key words: atopic dermatitis, cytokine, interleukin

УДК [577.21:616.5-002]-053.3/.5

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНУ БІЛКА КЛІТИН КЛАРА У ХВОРИХ НА АТОПІЧНУ БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ

ЛЯХОВСЬКА Н.В., ШЛИКОВА О.А., ІЗМАЙЛОВА О.В., КАЙДАШЕВ І.П.

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

Атопічна бронхіальна астма (АБА) є типовим представником мультифакторного захворювання. Генетичні аспекти астми та атопії широко вивчаються. Генів-кандидатів та локусів хромосом, що вірогідно відповідають за виникнення даної патології велика кількість. Найчастіше в літературних джерелах посилаються на ділянки хромосом 5q23-31,6p21.1-p23, 11q13, 12q14-24.33 і 13q11-32. Необхідність використання широкогеномного скринінгу зумовлена тим що локуси, які зчеплені з БА або бронхіальною гіперреактивністю подекуди не проявляють зчеплення з рівнем IgE та наявністю специфічної сенсибілізації за результатами прик-тесту.

Особливу увагу привертає довгий кінець 11 хромосоми, оскільки тут були ідентифіковані декілька генів – кандидатів, в тому числі поверхневих маркерів лімфоцитів CD20 і бета-ланцюга рецептора з високою афіністю IgE (FcεRI-13), а також ген білка клітин Клара [1]. З моменту описання Максом Кларом в епітелії периферичних повітроносних шляхів людини клітин з цитоплазматичними гранулами пройшло більше 70 років (Clara M., 1937). Є чимало синонімів назви білків клітин Клара (Clara Cell - CC), які пов’язані з вагою та функцією: SCGB1A1, CC10, CC16, CCSP або утероглобін. Однак до теперішнього часу відомості щодо локалізації цих клітин в епітелії легенів суперечливі, а про їх кількісну характеристику при патологічних процесах частіше судять за рівнем специфічного для цих клітин білка, що виявляється в бронхоальвеолярних змивах, сироватці крові (Bernard AM et al., 1992; Singh G. et al., 1997). Існують переконливі дані про його інгібіторну активність щодо фосфоліпази А2, а також про імуномодулюючі властивості даного білка, включаючи пригнічення передачі сигналів гамма інтерферону і регуляцію Th1 та Th2 лімфоцитів [2]. Клітини Клара являються, ніби «цитоекологічним форпостом» легенів. (Plopper C. et al., 1991; Романова Л.К., 2000).

Сьогодні проведена обмежена кількість досліджень щодо впливу генетичних варіантів CC 16 на розвиток АБА, та їх результати неоднозначні (Baldini et al., 1998; Gui et al., 2003; Kalyoncu et al., 2003; Laing et al., 1998a; Laing et al., 1998; Sengler et al., 2003; Sharma and Ghosh, 2004). Більшість наукових розробок в малих популяційних виборках підтверджують асоціацію між поліморфізмом CC16 та ризиком виникнення астми (Candelaria et al., 2005; Kalyoncu et al., 2003; Laing et al., 1998; Mansur et al., 2002; Saadat et al., 2004).

Мета нашої роботи вивчити поліморфізм гену білку клітин Клара (A38G), питомою вагою 16 кДа, (CC16) серед дорослого населення Полтавської популяції та з’ясувати особливості клінічного перебігу АБА та загального IgE в залежності від змін в геномі.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Нами було обстежено 45 дорослих хворих на АБА. Діагноз та ступінь 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 загальноклінічне лабораторне, інструментальне 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 захворювань, гострих інтеркурентних інфекцій та тяжкої супутньої патології, яка б могла вплинути на результати дослідження. В якості групи контролю досліджувались зразки ДНК 46 практично здорових осіб, без алергологічного анамнезу з бази НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Дослідження проводили відповідно наданої письмової на проведення обстеження та ухвали комісії з етичних питань та біоетики даної установи. Виділення геномної ДНК здійснювали методом фенол-хлороформної екстракції [3]. Поліморфну ділянку гена CC16 ампліфікували за допомогою методу ПЛР на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технология», Росія) з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів CC16: F: 5′-CAG TAT CTT ATG TAG AGC CC -3′; R: 5′-CCT GAG AGT TCC TAA GTC CAG G -3′; для ідентифікації алелей проводили рестрикційний аналіз ампліконів при 370С протягом 12 годин з використанням ендонуклеази рестрикції AspS9 I (НПО «СибЭнзим», Росія) [4]. Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc). Розподіл генотипів за досліджуваними поліморфними локусами перевіряли на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга за допомогою критерію χ^2. Порівняння частот генотипів між досліджуваними групами проводили шляхом аналізу таблиць спряженості за допомогою точного тесту Фішера. Для порівняння частот алелей використовували критерій χ^2. Для оцінки достовірності відмінностей між групами використовували точний двосторонній критерій Фішера (для малих груп). Для усіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Нами була проаналізована частота поліморфних варіантів генів CC 16 серед хворих на АБА та в групі популяційного контролю (табл.1). У зразках ДНК 46 осіб, що входили до групи контролю мутантний генотип GG не був виявлений, частота гетерозиготного генотипу AG склала 13% (6 осіб), частота гомозиготного генотипу AA становила 86,9% (40 осіб). У хворих на АБА відповідні дані були такими: GG у 6,52% хворих (3 осіб), AG – 28,9% (13 осіб), генотип AA – 64,4% (29 осіб), тобто між частотами генотипів у групі контролю та у хворих на АБА відмічається достовірна різниця (p = 0,019).

Частота «дикого» алелю A у контрольній групі склала 93,4%, у хворих на АБА – 78,9%. Частота мутантного алелю G серед хворих на АБА склала 7,8%, серед групи контролю - 2,2%, що достовірно не відрізнялось ($\chi 2$=3,42; ВШ= 3,52; ДІ 1,06- 11,66; p=0,06) (табл.1).

Таблиця 1

Розподіл частот генотипів та алелей гену CC16 у хворих на АБА та у групі контролю

Генотип,алель	Популяційний контроль (n=46)	Хворі на АБА (n=45)	p*
AA	86,9 (40)	64,4 (29)	0,019
AG	13 (6)	28,9 (13)	
GG	-	6,52 (3)	
A	93,4 (86)	78,9 (71)	0,008
G	6,52 (6)	21,1 (19)	

При аналізі внутрішньогрупового розподілу частот генотипів та поліморфних алелей гену CC 16 спостерігався нерівномірний розподіл алелей, на що вказує проведений аналіз показника врахування рідкісних алелей ($\mu < 2$) і частки рідкісних алелей ($h > 0$). Для всіх досліджуваних локусів в групах контролю та хворих на АБА розподіли генотипів відповідали очікуваним за рівновагою Харді – Вайнберга. Також виявлено співпадання очікуваної гетерозиготності та гетерозиготності, яка спостерігається, що свідчить про рівновагу генетичної структури даної популяції (табл. 2).

Таблиця 2

Внутрішньогруповий розподіл частот генотипів та поліморфних алелей гену CC 16

Показник	Розподіл генотипів		Порівняння частот генотипів, що спостерігаються з очікуваними (df=2)		Коефіцієнт інбридингу, популяції, F	Адекватне врахування рідкісних алелей (μ)	Частка рідкісних алелей (h)
	Що спостерігаються	Очікувані	χ^2	p			
Поліморфізм 38A/G гену CC16							
Група контролю(n=46)							
AA AG GG	40 6 0	40,20 5,61 0,18	0,21	0,90	-0,07	1,49	0,25
Хворі (n=45)							
AA AG GG	29 13 3	28,04 14,99 1,98	0, 82	0,66	0,13	1,82	0,09

Зважаючи на вищезазначене, що в полтавській популяції хворих на АБА достовірно частіше зустрічаються генотипи, що несуть алель G (AG,GG) ніж у практично здорових осіб без проявів алергії можна зробити висновок, що поліморфізм гену CC 16 асоційований з розвитком АБА - це узгоджується з науковими посиланнями [5] про підвищений ризик виникнення астми у осіб з змінами в гені CC16. Про наявність прямого взаємозв’язку змін в гені CC16 з розвитком атопії (підвищеним рівнем IgE) в літературними джерелах не зазначено.

Нами був проведений аналіз імунологічних показників крові у хворих на АБА з гомозиготними та гетерозиготним генотипом для з’ясування впливу поліморфізму гену CC16 на алергічне запалення. Виявлено, що рівні CD 4+, CD 4+/25+, CD 4+/25+/Foxp3+, лейкоцитів, еозинофілів, лімфоцитів, IL -10, IL-4 статистично не відрізнялись в залежності від змін в гені CC16 у хворих на АБА. Виключенням став рівень загального IgE. У хворих, які є носіями гетерозиготи гену CC16 цей показник склав 244,9 ± 30,33 МОд/мл, мутантної гомозиготи 191,7± 13,0 МОд/мл, гомозиготи за «диким» типом склав 123,7 ± 12,26 МОд/мл, що є статистично вірогідно (метод Краскала-Уоліса, p= 0,0013), тобто спостерігається залежність рівня загального IgE від стану генетичного апарату. Можливо це пов’язано з однаковим розташуванням на хромосомі 11q13, як гену білка клітин Клара, так і високоаффінного FceRI-рецептора- β (FcεRI-β) IgE, хоча за даними Mao X. Q.[6] не знайдено асоціації між атопією та геном CC16.

При розгляді клінічних особливостей відмічено, що в групі з інтермітуючим перебігом АБА 1 хворий мав генотип AG, 2 - GG; з легким перебігом – 8 осіб мали генотип AG; з перебігом середньої тяжкості 4 обстежених – AG, 1- GG.

Отже, статистично значимої різниці в кількості носіїв різних варіантів гену CC 16 не відмічено, тобто поліморфізм вказаного гену не може характеризувати тяжкість перебігу АБА. Спадкова схильність до виникнення АБА відмічена у 70% носіїв генотипу AG та GG гену CC16, ідентично всій групі обстежених. Переважна більшість осіб мали сенсибілізацію до двох і більше алергенів, особливістю цих хворих була гіперчутливість до грибкових алергенів (найчастіше до групи Aspergillus), так в групі з гетерозиготою гену CC16 вказані прояви були у 6 осіб, з мутантною гомозиготою у 2 осіб, що є статистично достовірно при порівнянні з генотипом AA гену CC16 (табл. 3). Отримані нами результати співпадають з даними науковців зі США Claire de Burbure та співавторів [7] про пошкоджуючи дію на епітелій легень грибкових алергенів, проте статистично достовірних показників, на відміну від нас, вони не отримали. Серед супутньої патології звертає на себе увагу достовірна різниця

за точним методом Фішера (табл.3) по кількості осіб, що мають прояви атопічного дерматиту при порівнянні груп з поліморфізмом гену CC 16. Так, серед носіїв генотипу GG 2 особи, що мають інтермітуючий перебіг хворіють на атопічний дерматит, серед носіїв генотипу AG- 4 особи. Насправді, вплив поліморфізму генів епітеліальних клітин легень (CC16) на ушкодження шкіри має суперечливий характер, але є автори [8], які вказують на прямий взаємозв’язок поліморфізму гену CC16 з атопічним дерматитом у дорослих.

Таблиця 3

Клінічні особливості перебігу АБА в залежності від поліморфізму гену CC16

Наявність ознаки		Хворі на АБА носії генотипу AA гену CC16, (n=29)	Хворі на АБА носії генотипу AG гену CC16, (n=16)	p*
Мають прояви атопічного дерматиту	так	4	6	**0,04**
	ні	24	10	
Мали активну форму туберкульозу	так	1	2	0,31
	ні	28	14	
Частіше користуються інгаляційними глюкокортикоїдами	так	3	9	**0,02**
	ні	26	7	
Прояви грибкової сенсибілізації	так	3	8	**0,03**
	ні	26	8	

Ще однією особливістю носіїв мутантного гомозиготного генотипу (GG) є перенесений активний туберкульоз у 2 пацієнтів (8 та 18 років до моменту нашого обстеження); при порівнянні з носіями генотипу AA є статистично вірогідна різниця (p= 0,047) (табл.3). Відомо, що туберкульоз є інфекційним захворюванням, сприйнятливість до якого залежить від багатьох факторів серед них, можливо, і зміни в гені CC16. Проте є дані, що активація TLR2 призводить до внутрішньоклітинного кілінгу M. tuberculosis макрофагами [9] . В нашому дослідженні виявлено, що 1 особа з генотипом GG гену CC16 та 1 особа з генотипом AA гену CC16 мали гетерозиготний варіант (GA) гену TLR2 і мали в анамнезі прояви активного туберкульозу. Можливо саме поліморфний гаплотип гену CC16 та TLR2 є підґрунтям для виникнення туберкульозу.

Під час аналізування лікарських засобів, що приймали хворі з’ясовано, що особи, які були носіями генотипу AG або GG гену CC 16 частіше використовували глюкокортикоїдні препарати (табл.3). Це можна пояснити де в чому схожою дією на молекулярному рівні білків клітин Клара та глюкокортикоїдів. Відомо, що активація гена CC16 інгібує функцію ядерного фактору - κB (NF-κB) шляхом подавлення фосфорилювання IkB-β в епітеліальних клітинах дихальних шляхів, що в свою чергу призводить до зменшення запалення в легеневій тканині [10]. Дослідження останніх років свідчать, що глюкокортикоїди взаємодіють не тільки з GRE (glucocorticoid response element), а і з різними факторами транскрипції, такими як AP-1 і NF-κB та інші. Кортикостероїди впливають на транскрипційну активацію цитоплазматичного інгібітора NF-κB – IkBα. Проте, геномні ефекти глюкокортикоїдів розвиваються в залежності від дози та тривалості прийому препаратів вказаної групи [11]. Також глюкокортикоїди, як і білки клітин Клара подавляють активність фосфоліпази A2, що призводить до гальмування утворення ряду медіаторів запалення – простагландинів, лейкотриєнів та інших. Можливо, прийом стероїдних препаратів виконує, як би замісну функцію білків клітин Клара, що дозволяє хворим з генетичним поліморфізмом CC16 досягати стану ремісії. Отже, світові рекомендації, щодо профілактичного прийому інгаляційних глюкокортикостероїдів є важливою необхідністю для хворих на АБА, особливо з поліморфізмом гену CC16.

ВИСНОВКИ:

1. Поліморфний варіант 38G гену CC16 достовірно частіше зустрічається у хворих з АБА ніж в групі популяційного контролю (p = 0,019)
2. Рівень загального IgE статистично вірогідно вищий у осіб з гетерозиготним (AG) та гомозиготним (GG) варіантом гену CC16.
3. Особливостями клінічних проявів АБА у хворих, які є носіями алелі 38G гену CC16 є: грибкова сенсибілізація, атопічний дерматит та туберкульоз в анамнезі, необхідність в частішому прийомі глюкокортикостероїдів.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Sandford A.J. Localisation of atopy and beta subunit of high-affinity IgE receptor on chromosome 1 lq. / A.J. Sandford, T. Shirakawa, M.F. Moffatt, et al.// Lancet.- 1993.— P. 332-341.
2. Dierynck I. Potent inhibition of both human interferon-gamma production and biologic activity by the Clara cell protein CC16./ I. Dierynck, A. Bernard, H. Roels // Am J. Respir. Cell MolBiol.—1995.-- №12.— P. 205-210.
3. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. / за ред. проф. Кайдашева І.П. – Полтава : Полімет, 2003. – 320 с.
4. Laing A. A polymorphism ofthe CC1 6 gene is associated with an increased risk of asthmaI./ A. Laing // J.Med. Genet.—1998.-- №35.— P.463-467.
5. Laing A. Association between Plasma CC16 Levels, the A38G Polymorphism, and Asthma./ A. Ingrid Laing // Am. J. Resp.Med. – 2000.-- №35.—P.463-467
6. Mao X. Q. Association between asthma and an intragenic variant of CC16 on chromosome 11q13./ X. Q Mao.// Clin Genet.—1998.-- №53.—P.54-56.
7. Claire de Burbure. Uteroglobin-Related Protein 1 and Clara Cell Protein in Induced Sputum of Patients With Asthma and Rhinitis/ Claire de Burbure, Patrizia Pignatti, Massimo Corradi // Chest.—2007.-- №131.—P.172-179.
8. Candelaria P.V. Association between asthma-related phenotypes and the CC16 A38G polymorphism in an unselected population of young adult Danes./ P.V. Candelaria, Backer V, et al // Immunogenetics. - 2005.- №57 - P.25-32.
9. Thoma-Uszynski S. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-like receptor/ S. Thoma-Uszynski // Science.- 2001. – Vol 291. – P. 1544 – 1547.
10. Long Xiao-Bo. Clara Cell 10-kDa Protein Gene Transfection Inhibits NF-kB Activity in Airway Epithelial Cells./ Xiao-Bo Long// April 2012.-- Volume 7. - режим доступу: www.plosone.org
11. Chen L.C. Evaluation of a common variant of the gene encoding clara cell 10 kd protein (CC10) as a candidate determinant for asthma severity and steroid responsiveness among Chinese children. / L.C. Chen and other// J Asthma.— 2012.-- №49(7).—P.665-672)

SUMMARY

POLYMORPHISM OF CLARA CELL PROTEIN IN PATIENTS WITH ATOPIC ASTHMA

Lyakhovska N.V., Shlukova O.A., Izmajlova O.V., Kajdashev I.P.

Research Institute for Genetics and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics of Higher State Educational Establishment of Ukraine «Ukrainian Medical Stomatological Academy», Poltava

Atopic asthma (AA) is a typical representative of multifactorial diseases. The aim of our study was to investigate gene polymorphism Clara cell protein (A38G). We examined 45 adult patients with AA. Diagnosis and its severity is set in accordance with the approved criteria. It was found that a polymorphic variant of the gene 38G CC16 significantly more common in patients with AA than in the control population (p = 0.019). The level of total IgE was significantly higher in patients with heterozygous (AG) and homozygous (GG) gene variant CC16. The features of the clinical manifestations of AA in patients who are carriers of the gene allele 38G CC16 are fungal sensitization, atopic dermatitis and history of tuberculosis, the need for frequent admission GCS. The study of the genetic aspects of the AA, especially gene polymorphism SS16, is important for the prevention and treatment of this disease.

РЕЗЮМЕ

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА БЕЛКА КЛЕТОК КЛАРА У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Ляховская Н.В., Шлыкова О.А., Измайлова О.В., Кайдашев И.П.

Научно-исследовательский институт генетических и иммунологических основ развития патологии и фармакогенетики Высшего государственного учебного заведения Украины *«Украинская медицинская стоматологическая академия», г. Полтава*

Атопическая бронхиальная астма (АБА) является типичным представите лем мультифакторной патологии. Целью нашей работы было изучение полиморфизма гена белка клеток Клара (A38G). Нами было обследовано 45 взрослых больных АБА. Диагноз и степень тяжести установлен в соответствии с утвержденными критериями. Выяснено, что полиморфный вариант 38G гена CC16 достоверно чаще встречается у больных с АБА чем в группе популяционного контроля (p = 0,019). Уровень общего IgE статистически достоверно выше у лиц с гетерозиготным (AG) и гомозиготным (GG) вариантом гена CC16. Особенностями клинических проявлений АБА у больных, которые являются носителями аллеля 38G гена CC16 являются: грибковая сенсибилизация, атопический дерматит и туберкулез в анамнезе, необходимость в частом приеме ГКС. Изучение генетических аспектов АБА, особенно полиморфизма гена CC16, имеет важное значение, как для профилактики так и для лечения данного заболевания .