

Генетичний поліморфізм Toll-подібного рецептора 4 у дітей з atopічною бронхіальною астмою

сторінки: 52-54

Т.О. Крючко, д.м.н., професор, зав. кафедри педіатрії № 2, І.П. Кайдашев, д.м.н., професор, Ю.О. Вовк, О.Я. Ткаченко, к.м.н., О.А. Шликова, к.м.н., О.В. Ізмайлова ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Бронхіальна астма (БА) є класичним прикладом мультифакторної патології, яка реалізується в разі взаємодії численних чинників навколишнього середовища та спадкової схильності [1, 3]. Формування Th1-імунної відповіді дитячого організму починається в ранній постнатальний період від моменту взаємодії мікроорганізмів з патерн-розпізнавальними рецепторами (ПРР), які містяться на всіх клітинах природженої імунної системи [6, 15, 16].

Вроджений імунітет – це еволюційно консервативна структура, специфічність якої реалізується через родину Toll-подібних рецепторів (Toll-like receptors; TLRs) [6, 15, 16, 20]. Згідно із сучасними уявленнями, Toll-подібний рецептор 4 (TLR4) є основним структурно-молекулярним елементом багаторівневої системи ПРР, оскільки відповідає за зв'язування молекулярних патернів патогенів і формування захисної відповіді під час взаємодії з ліпополісахаридом (ЛПС) – екстрацелюлярним компонентом зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій [8, 15].

Молекулярна структура TLR4 характеризується наявністю екстрацелюлярного варіабельного N-термінального домену, який складається з олігопептидних фрагментів із високим вмістом лейцинових повторів (leucine-rich repeats – LRR), що визначає здатність взаємодіяти з ЛПС [8, 16]. Активація TLR4 розпочинається від моменту взаємодії з комплексом LPS/CD14/MD-2 [8, 9, 19]. Утворення цього комплексу супроводжується його конформаційними змінами та запускає інтрацелюлярний каскад реакцій, на кінцевому етапі якого відбувається ініціація транскрипції генів, які регулюють синтез прозапальних цитокінів [15].

Однонуклеотидний поліморфізм (ОНП) може порушувати регуляцію вродженої імунної відповіді під час взаємодії з ЛПС, що є основним чинником дисбалансу T1/T2-хелперів. Подібний механізм може відігравати вирішальну роль у формуванні хронічного запального процесу та привертає особливу увагу як потенційний чинник ризику розвитку atopічної патології, зокрема БА [15].

Гени, що кодують TLR4, виявляють високу варіабельність у популяції [11]. Поширеність поліморфних варіантів гена TLR4 вивчали численні науковці в різних популяційних групах [5, 6]. Згідно з результатами проведених досліджень, частота точкових мутацій дуже низька (<1%). Винятком є поліморфізм Asp299Gly (rs4986790), частота якого становить >5% [2, 6, 8].

ОНП гена TLR4, який кодує позаклітинну структуру ектодомену рецептора, полягає в заміні аспарагінової амінокислоти на гліцинову Asp299Gly 1187 (rs4986790) [7]. Ця місенс-мутація в четвертому екзоні гена TLR4 (хромосома 9q32–33) змінює позаклітинну ділянку TLR4, призводить до

втрати негативного заряду ділянки в позиції 299, що порушує процес розпізнавання бактеріального ЛПС [1, 7].

Практичне значення цього поліморфізму доведено в дослідженнях закордонних учених. Воно пов'язано на кінцевому етапі з пригніченим фосфорильованням I κ B- α після стимуляції ЛПС, що, своєю чергою, призводить до зниження транслокації NF κ B в ядро та позначається на пригніченні синтезу відповідних прозапальних цитокінів [15]. Проте в деяких дослідженнях заперечують взаємозв'язок поліморфізму Asp299Gly і розвитку atopії [14, 18, 20]. Отримані результати доволі суперечливі та не дають однозначної відповіді на питання патогенетичної ролі дефекту гена TLR4 у розвитку atopії [4, 11, 18].

Подібні дослідження серед дітей у нашій країні раніше не проводили, тому для кращого розуміння генетичного підґрунтя схильності до atopічної БА обґрунтованим є вивчення поширеності цієї місенс-мутації серед хворих дітей.

Метою пропонованого дослідження було вивчення ролі поліморфізму Asp299Gly гена TLR4 у реалізації схильності до захворювання на atopічну БА серед дітей Полтавської області.

Матеріали та методи дослідження

Проведено клініко-лабораторне обстеження 64 дітей, хворих на atopічну БА, які перебували на стаціонарному лікуванні в педіатричному відділенні № 2 Полтавської обласної дитячої клінічної лікарні. Діагноз БА встановлювали згідно з «Консенсусом з питань класифікації, діагностики та лікування бронхіальної астми у дітей» (GINA, 2008).

Збирання біологічних зразків у спостережуваних хворих проводили за умови відсутності інфекційних захворювань та загострення БА. За 72 год до забирання крові призупиняли застосування теофілінів, антигістамінних препаратів та інгаляційних глюкокортикостероїдів.

Матеріалом для дослідження була периферійна венозна кров. Генотипування поліморфної ділянки Asp299Gly проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням олігонуклеотидних праймерів. Ампліфікацію здійснювали на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технология», м. Москва).

Поліморфну ділянку Asp299Gly гена TLR4 ампліфікували за допомогою ПЛР у 25 мкл реакційної суміші, в яку входили: 2,5 мкл 10 x B ν f для ампліфікації; 2 мМ магнію хлориду; 0,2 мМ кожного dNTP; 2,5 од. ДНК-полімерази Tag; 20-50 нг геномної ДНК; по 66 нг праймерів для Asp299Gly.

Групу контролю становили 95 практично здорових осіб з бази генетичних зразків НДІ Генетичних та імунних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «УМСА». Від усіх пацієнтів було отримано добровільну письмову згоду на участь у науковому дослідженні, яке проводили з дозволу комісії з біоетики ВДНЗУ «УМСА».

Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми «STATISTICA for Windows 7.0» (StatSoft Inc) і електронних таблиць MS Excel. Розподіл генотипів за досліджуваними поліморфними локусами перевіряли на відповідність рівновазі Харді — Вайнберга за допомогою критерію χ^2 . Для порівняння частот алелей між досліджуваними групами використовували критерій χ^2 Пірсона з поправкою Йетса на безперервність за кількості ступенів свободи, рівній 1. Порівняння частоти генотипів між досліджуваними групами проводили шляхом аналізу таблиць спряженості за допомогою точного тесту Фішера. Для порівняння частот варіантів у незв'язаних групах вираховували відношення шансів (ВШ) із визначенням 95% довірчого інтервалу (ДІ). Для усіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$; при $0,05 < p \leq 0,1$ зазначали тенденцію до відмінності.

Результати дослідження та їх обговорення

Результати аналізу розподілу частоти генотипів за досліджуваним геном у групах спостереження наведено в табл. 1. У контрольній групі спостерігали невідповідність рівноваги Харді – Вайнберга ($\chi^2=22,7$; $df=1$). У 96,85% осіб виявлено «дикий тип» генотипу TLR4; частота гетерозиготного генотипу становила 2,1%, мутантного GG – 1,05%. У дітей, хворих на atopічну БА, відповідні результати були такими: AA – 86,80%, AG – 11,32% та GG – 1,88%, що відповідало теоретично очікуваному по рівновазі Харді – Вайнберга ($\chi^2=1,89$; $df=1$).

Ген, поліморфізм	Частота генотипу	Група контролю, n=95	Хворі на БА, n=53	p
TLR4 Asp299Gly	AA	96,85% (92)	86,8% (46)	0,0385
	AG	2,1% (2)	11,32% (6)	
	GG	1,05% (1)	1,88 (1)	

Примітка: p – рівень значущості, отриманий за допомогою точного тесту Фішера.

Таблиця 1. Розподіл частоти генотипів поліморфізму гена TLR4 Asp299Gly серед здорових осіб і дітей, хворих на БА, % (n)

Як показали проведені дослідження алелі Asp і Gly у групі контролю виявляли із частотою 97,89 і 2,11% відповідно (табл. 2). Мутантний алель Gly достовірно частіше виявляли у дітей із atopічною БА (7,54%) порівняно з групою контролю (2,11%) ($\chi^2=3,876$; ВШ=1,059; ДІ=0,9989-1,122; $p=0,049$).

Ген, поліморфізм	Частота алелей	Група контролю, n=95	Хворі на БА, n=53	χ^2 Пірсона, df=1	ВШ (95% ДІ)	p
TLR4 Asp299Gly	A	97,89% (186)	92,45% (98)	3,876	1,059 (0,9989-1,122)	0,049
	G	2,11% (4)	7,54% (8)			

Примітка: p – рівень значущості, отриманий за допомогою тесту χ^2 .

Таблиця 2. Розподіл частоти алелей поліморфізму гена TLR4 Asp299Gly серед здорових осіб і дітей, хворих на БА, % (n)

Генетичні маркери можуть визначати схильність до захворювання загалом або бути асоційованими з конкретними патогенетично значущими ознаками. Тому в межах пропонованого дослідження важливим етапом було вивчення впливу ОНП Asp299Gly гена TLR4 на перебіг і особливості клінічних проявів atopічної БА у дітей. Для вирішення цього завдання було сформовано дві групи дітей: основну – хворі з гетеро- і гомозиготним за мутантним алелем генотипом (Asp/Gly, Gly/Gly) та контрольну – діти з нормальним розподілом алелей. Аналізуючи симптоми захворювання, ми виявили вірогідні відмінності серед хворих з різними варіантами генотипів (табл. 3).

Клінічні прояви atopічної БА		Хворі з генотипом		χ^2	p
		Asp/Gly, Gly/Gly	Asp/Asp		
Маніфестація БА до 3 років	так	5 (71,44%)	3 (6,52%)	15,22	0,0001
	ні	2 (28,56%)	43 (93,48%)		
Персистувальна II ст.	так	0 (0%)	27 (58,69%)	6,19	0,002
	ні	7 (100%)	19 (41,31%)		
Персистувальна III ст.	так	6 (85,7%)	13 (28,26%)	6,4	0,004
	ні	1 (14,3%)	33 (71,74%)		
Нестійка ремісія	так	6 (85,7%)	11 (23,9%)	8,02	0,001
	ні	1 (14,3%)	35 (76,1%)		
Персистувальний алергійний риніт	так	7 (100%)	21 (45,7%)	5,18	0,007
	ні	0 (0%)	25 (54,3%)		
Атопічний дерматит	так	5 (71,44%)	4 (8,69%)	12,8	0,0001
	ні	2 (28,56%)	42 (91,31%)		

Примітка: p – рівень значущості, отриманий за допомогою тесту χ^2 .

Таблиця 3. Аналіз асоціації генотипів з особливостями клінічних проявів atopічної БА, n (%)

Генотипи Asp/Gly та Gly/Gly у дітей основної групи асоціювалися із ранньою маніфестацією захворювання до 3-річного віку ($\chi^2=15,22$; $p=0,0001$), в той час як у хворих дітей із нормальним розподілом алелей TLR4 спостерігався пізніший дебют БА. Ми проаналізували розподіл частот генотипів та алелей досліджуваних локусів по відношенню до різних ступенів тяжкості захворювання. Виявлено, що генотипи Asp/Gly та Gly/Gly пов'язані з високим ризиком формування персистувального середньотяжкого перебігу астми, який втричі частіше реєструвався у осіб основної підгрупи, ніж у дітей із «диким» генотипом TLR4 ($\chi^2=6,4$; $p=0,004$).

Співставляючи дані клінічної картини, у дітей із мутантним алелем Gly переважала нестійка ремісія, в той час як серед носіїв «дикого типу» генотипу TLR4 частіше зустрічався персистувальний легкий та контрольований перебіг захворювання ($\chi^2=6,19$; $p=0,002$). Встановлена статистично достовірна асоціація мутантного генотипу з розвитком у хворих іншої atopічної патології: персистувального алергійного риніту ($\chi^2=5,18$; $p=0,007$) та atopічного дерматиту ($\chi^2=12,8$; $p=0,0001$).

Таким чином, отримані дані свідчать, що гетеро- і гомозиготний за мутантним алелем генотипи асоціюються із формуванням фенотипових проявів БА, тому їх

можна зарахувати до генетичних чинників ризику розвитку atopічної БА.

Порушення рівноваги T1/T2-хелперів із домінуванням T2-імунної відповіді є основним компонентом atopічної патології [17]. Вивільнення T2-цитокінів у відповідь на вплив алергенів у хворих на atopічну БА індукує активацію еозинофілів, опасистих клітин і підвищений синтез загального IgE В-клітинами. Є відомості, що активація В-клітин відбувається опосередковано через TLR4 [7, 10]. Було вивчено ймовірний вплив поліморфізму TLR4 на рівень гіперпродукції (продукції) загального IgE (табл. 4).

Отже, зв'язку як мутантного алеля, так і генотипів Asp/Gly або Gly/Gly з рівнем гіперпродукції загального IgE не виявлено. Середні значення IgE були вдвічі вищими у хворих із генотипом AA порівняно з носіями мутантного генотипу ($\chi^2=5,05$; $p=0,0189$).

Показник	Кількість дітей	Середнє значення рівня IgE, МО/мл	Квантили	χ^2	p
Генотип: Asp/Asp Asp/Gly Gly/Gly	46 7	813,14±89,69 333,24±101,7	723,45 902,83 231,54 434,94	5,05	0,0189
Алель: Asp Gly	52 7	761,95±82,56 333,24±101,79	679,39 844,51 231,54 434,94	8,41	0,037

Примітка: p – порівняння здійснено за U-критерієм Манна – Уїтні, $p<0,05$.

Таблиця 4. Оцінка залежності рівня загального IgE від наявності генотипів Asp/Asp і Asp/Gly, Gly/Gly та алелей Asp і Gly

Висновки

Таким чином, поліморфізм гена TLR4 є місенс-мутацією, яка змінює екстрацелюлярний домен рецептора, внаслідок чого він втрачає здатність зв'язуватися з бактеріальним ЛПС. Порушення передачі активаційного сигналу NFκB супроводжується дисбалансом синтезу T1/T2 та, відповідно, розвитком хронічного запального процесу в бронхолегеневій системі.

Поліморфізм Asp299Gly TLR4 порушує механізми регуляції вродженої імунної відповіді, визначає зміну характеру перебігу та ступеня вираженості клінічних проявів захворювання.

За результатами проведеного дослідження та їх аналізу, можна висунути припущення про наявність асоціації хоча б одного з мутантних генотипів (Asp/Gly, Gly/Gly) або ж алеля (Gly) гена TLR4 із підвищеним ризиком розвитку atopічної БА у дітей.

Список літератури – в редакції