

© Ляховська Н.В.
УДК [577.21:616.5-002]-053.3/1.5

ЗВ'ЯЗОК ПОЛІМОРФІЗМА ГЕНА TLR4 З КЛІНІКО-ІМУНОЛОГІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ ПРИ АТОПІЧНІЙ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ*

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 А 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 сенсibilизации 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 снижением 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 профілактики 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], уrogenітальних інфекцій [13], запальних хвороб пародонту [16], сприйнятливості до інфекції у ВІЛ-інфікованих [6], цукрового діабету [17], ревматоїдного артриту [12], хронічного саркоїдозу [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 сенсibilізації до алергенів діагностовано шляхом проведення шкірного тестування (прик-тест) з основними аероалергенами (побутовими, пилковими, епідермальними, грибовими) 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 контролю 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

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

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 EPIC 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 імуноферментного аналізу. Математичну обробку от-

риманих 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 складала 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 розвиток 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)	0,04
AG	4,5 (4)	15,6 (7)	
GG	0	0	0,06
G	97,8 (176)	92,2 (83)	
A	2,2 (4)	7,8 (7)	

Особливістю хворих, що є носіями мутантної алелі (табл.2.) є прояви полісенсibilізації, 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’юнктивіт) ($p=0,045$). 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*
Полісенсibilізація, що включає харчові фактори	так	7	7	0,013
	ні	31	0	
Супутні алергічні захворювання (риніт, кон’юнктивіт)	так	6	5	0,045
	ні	32	2	
В анамнезі прояви “атопічного маршу”	так	7	6	0,029
	ні	31	1	
Часті ГРВІ	так	17	5	0,344
	ні	21	2	

При аналізі даних, що характеризують стан імунної системи у носіїв гомо- та гетерозиготи TLR4 - 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 зменшення 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-рег клітин [18, 8]. Зміни рівня IL-10 можна розглядати, як системну імунну реакцію, як натуральних, так й індукованих T-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-рег 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 активуватися тими ж факторами, що активують ефекторні клітини вродженого імунітету [10]. Доведено, що підсилення активності T-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: T-reg- клітин та IL10.

Таблиця 3
Імунологічні показники у хворих на АБА в залежності від генотипу 896A/G гену TLR4

№	Показник	Носії "дикої алелі" (AA), 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

* $p \leq 0,05$ 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" (AA), 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	IL10 та IL4	--	-0,77

*- Всі вказані пари є статистично достовірними ($p \leq 0,05$)

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 негативнаправленого кореляційного взаємозв'язку IL10 та IL4, які характеризують супресивну дію одного з основних медіаторів T-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 сенсibiliзації були харчові чинники ($p=0,02$) та мали місце прояви іншої алергічної патології ($p=0,045$).

3. Одиначний нуклеотидний поліморфізм гену TLR4 у хворих на atopічну 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 atopічної 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 lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children / M. Bottcher // J. Allergy clin. immunol. - 2004. - P. 561-567.
2. Ferwerda B. Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms / B. Ferwerda, M. B. 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 // Immunologia. - 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 coexpressing 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. Измайлова О.В., Шлыкова 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 atopічною бронхіальною астмою / Клін. імунол. Алергол. Інфектол. – 2011. – № 5. – С. 52-54.
 15. Лапшин В.Ф. Бронхіальна астма і 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., Донецькова 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 over-compensated significant reduction in IL-10, the absolute number of CD4⁺ / 25⁺ / Foxp3⁺ - cells and absence of relationships 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.

Key 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].

The aim of the study is to evaluate the significance of polymorphism Asp299Gly change A to G at position 1187 (rs4986790) TLR4 gene and its relationship with the immunoregulatory factors in the mechanisms of AA.

Materials and Methods

We examined 45 people patients with AA. The diagnosis of the AA and its severity is set in accordance with the approved criteria (international recommendations GINA, 2011) on the basis of allergy and pulmonary department of the Poltava Regional Hospital. History data collected using by a special questionnaire. All patients with AA were held general clinical laboratory, instrumental and allergy testing. Sensitization to

* 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.

allergens diagnosed through skin testing (prick test) with the major aeroallergens (household, pollen, epidermal, fungal) and food allergens ("Immunology", Vinnitsa). The survey was conducted in the absence of the patient's worsening primary or concomitant chronic, acute lack of intercurrent infections and severe comorbidity, which could affect the results of the study. The control group included 90 healthy individuals with no allergic history with the bases of DNA Research Institute of Genetic and immunological basis for the development of pathology and pharmacogenetics "Ukrainian Medical Dental Academy." The study was conducted according to the provision of a written survey and determine the commission on ethics and bioethics issues of this institution. Isolation of genomic DNA was performed by phenol - chloroform extraction. The definition of

polymorphism 896A / G TLR4 gene carried by the polymerase chain reaction [13]. Lymphocyte phenotype was analyzed by determining the level of expression of cell surface antigens using the monoclonal antibodies, CD4, CD25 (production of "Sorbert", Russia), and intracellular protein Foxp3 («eBioscience», USA) by flow cytometry. At flow cytofluorometry EPIX LX - MCL (Beckman Coulter, USA) using a program System II TM software, serum total IgE, IL -4, 10 (OOO "Ukrmed - Don," Ukraine) in serum was determined by indirect IFA. Mathematical processing of the data was performed using the program «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc). Results. We analyzed the frequency of polymorphism Asp299Gly change of adenine to guanine at position 1187 (rs 4986790) in the TLR4 gene in patients with AA and in the group of population controls (Table 1).

Table 1
The Frequency Distribution of Genotypes and Alleles gene's TLR4

Genotypes, alleles	Control group (n=90)	Patients with atopic asthma (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)	
A	2,2 (4)	7,8 (7)	0,06

*p ≤ 0,05 in comparison with the control group

In DNA samples of 90 people that were part of a control group, the mutant genotype GG was not identified, the frequency of the heterozygous genotype AG was 4.5 % (4 people), the frequency of "wild" AA genotype was 95.6 % (86 people). Patients with AA had next results : GG - was not detected, AG - 15,6% (7 people), the genotype AA -84.4 % (38 people). etween the frequencies of genotypes in the control group and patients with AA noted a significant difference (p = 0.04),

it's characterizing the TLR 4 gene, as the gene - candidate for the development of AA. The patients who are carriers of the allele G (Table 2) has polysensibilisation: domestic and/or pollen allergies with dietary factors - is observed in all 7 patients (p = 0.013). 6 persons in this group (p = 0.03) has manifestations of the AA in early childhood, and 4 patients underwent standard procedures "atopic march."

Table 2
The Clinical Features of Atopic Asthma

Attribute		Patients with atopic asthma "wild" allele (A) TLR4 carriers, (n=38)	Patients with atopic asthma mutant allele (G) TLR4 carriers, (n=7)	p
Polysensibilisation that including food allergens	yes	7	7	0,013
	no	31	0	
Comorbidities (rhinitis, conjunctivitis)	yes	6	5	0,045
	no	32	2	
"Atopic march" in the history of deases	yes	7	6	0,029
	no	31	1	
Frequent SARS	ye	17	5	0,344
	no	21	2	

The characteristic clinical feature of this TLR4 SNP was associated with allergic pathology (rhinitis and conjunctivitis) (p = 0.045). The vast majority of patients had gastrointestinal diseases and frequent manifestations of SARS. We identified a number of interesting facts that can play an important role in understanding the characteristics of the immunopathogenesis of the AA in the analysis of data on

the state of the immune system in carriers homo - and heterozygotes Toll - like receptor 4. Based on the classic principles of modern immunological science [7] you may notice signs of an imbalance in the immune system in these groups of patients with compensated over AA. This is particularly true for the high activity of CD4 - cells. A characteristic feature (Table 4)

Tabl.4
Strength of the Correlation due Immunological Parameters depending on the genotype 896A/G gene's TLR4

	The pair correlation *	Patients with atopic asthma "wild" allele (A) TLR4 carriers, (n=38)	Patients with atopic asthma mutant allele (G) TLR4 carriers, (n=7)
1	CD4 ⁺ and CD4 ⁺ /25 ⁺	0,47	--
2	CD4 ⁺ and CD4 ⁺ /25 ⁺ /Foxp3 ⁺	0,54	--

3	CD4 ⁺ and Leucocytes	0,73	0,93
4	CD4 and Eosinophils	0,49	--
5	CD4 ⁺ and Lymphocytes	0,87	0,99
6	CD4 ⁺ /25 and Lymphocytes	0,54	--
7	CD4 ⁺ /25 ⁺ and Leucocytes	--	0,81
8	CD4 ⁺ /25 ⁺ /Foxp3 ⁺ and Leucocytes	0,46	--
9	CD4 ⁺ /25 ⁺ /Foxp3 ⁺ and Lymphocytes	0,41	--
10	CD4 ⁺ /25 ⁺ /Foxp3 ⁺ and IL10	0,52	--
11	Leucocytes and Eosinophils	0,59	--
12	Leucocytes and Lymphocytes	0,75	0,92
13	Eosinophils and Lymphocytes	0,60	--
14	IgE and IL4	0,63	0,96
15	IL10 and IL4	--	-0,77

*- All of the pairs are statistically significant ($p \leq 0,05$)

AA compensated flow in patients with heterozygous changes TLR4 is a decrease in the number (from 17 to 6), statistically significant relationships and a significant increase in the strength of correlation of these links, as an example - a direct correlation between the levels of

IgE and IL4, which reflects the typical for AA relationship immunoregulatory and effector pathogenesis. There was a significant change in the level of CD4 + / 25 + / Foxp3 + and IL10 in patients with polymorphism 896A / G gene TLR4 (Table 3).

Table 3
Immunological parameters Dependency Genotypes 896A/G гену TLR4

№	Index	Homozygous (AA), (n=38)	Heterozygous (AG), (n=7)
1.	CD 4 ⁺ G/l	0,67 ± 0,07	0,78 ± 0,17
2.	CD 4 ⁺ /25 ⁺ , G/l	0,16 ± 0,02	0,27 ± 0,08
3.	CD 4 ⁺ /25 ⁺ /Foxp3 ⁺ , G/l	0,07 ± 0,01 *	0,03 ± 0,01*
4.	Leucocytes, G/l	6,55 ± 0,4	8,7 ± 1,89
5.	Eosinophils, G/l	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,02
6.	Lymphocytes, G/l	1,47 ± 0,13	2,05 ± 0,45
7.	IgE, IU / ml	163,8 ± 14,4	170,8 ± 45,8
8	IL10, pg/l	0,45 ± 0,02 *	0,35 ± 0,03*
9	IL 4, pg/l	63,09 ± 9,28	38,6 ± 8,18

* $p \leq 0,05$ in comparison with the homozygous

Interleukin-10 is one of the two main mediators of effector T - reg cells [18, 8]. Changes in the level of IL - 10 can be regarded as a systemic immune response, both natural and induced T - lymphocytes regulators - this is confirmed by a number of authors [11]. The significant reduction in the level of CD4 + / 25 + / Foxp3 + in conjunction with its main mediator - IL10 heterozygous carriers of TLR4 gene variant may be an important factor in the pathogenesis of immunogenetic AA. T - reg cells control reactions not only adaptive, but innate immunity, including TLR [9]. It is known that due to the presence of Toll - like receptor on the surface of these regulatory cells may be activated by the same factors which activate the effector cells of innate immunity [10]. It is proved that the increased activity of T - regulatory cells after repeated stimulation of pathogens due not only to the formation of memory B cells, but also the expansion of these regulatory cells through Toll - like receptors [9]. On this basis, it is logical to assume that the genetic changes TLR4 may lead to a breach in the performance of the other component of this mechanism, in our case - the suppression of the link : T - reg - cells and IL10.

Conclusions:

1. TLR4 gene polymorphism 896 A / G statistically significant ($p = 0,04$) is found in the group of patients ABA than in healthy individuals can be considered TLR 4 gene as a candidate gene in the development of this disease.

2. 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 ($p = 0,045$).

3. A single nucleotide polymorphism of TLR4 gene in patients with atopic asthma is characterized by over-compensated significant reduction in IL-10, the absolute number of CD4 + / 25 + / Foxp3 + - cells and absence of relationship between these lymphocytes other immunological parameters.

4. The study of 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...

Література

1. Bottcher M. TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children / 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 // Immunologia. - 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 coexpressing 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. Beloglazova K.V., Shlykova O.A., Izmaylova O.V., Kaydashev I.P. Polimorfizm gena Toll-like receptora 4 Asp299Gly u bol'nyh revmatoidnym artritom / Problemi ekol. ta med. – 2009. – T.13, № 5-6. – S. 15-17.
13. Izmaylova O.V., Shlikova O.A., Bobrova N.O. ta in. Rol' polimorfizmu Toll-podibnogo receptora 4 Asp299Gly u rozvitku bakterial'nyh infekzij, scho peredayut'sya statevim shlyachom / Problemi ekol. ta med. – 2009. – T.13, № 5-6. – S. 3-6.
14. Kryuchko T.O., Kaydashev I.P., Vovk Yu.O. i dr. Genetichniy polimorfizm Toll-podibnogo receptora 4 u ditey z atopichnoyu bronchial'noyu astmoyu / Klin. imunol. Alergol. Infektol. – 2011. – № 5. – S. 52-54.
15. Lapshin V.F. Bronchial'na astma y fenotipi svistyachich chripiv u ditey / V.F Lapshin., T.R. Umanez' // Klinichna imunologiya. Alergologiya. Infektologiya. - 2010. - № 2. - S. 66-69.
16. Ostrovs'ka L.Y., Petrushanko T.O., Kaydashev I.P. Polimorfizm Asp299Gly gena Toll-podibnogo receptora 4 u genezi zmin yasen u vagitnich / Ukr. stomatol. al'manach. – 2009. – № 6 – S. 17-19.
17. Sul'skaya Yu. V. Geneticheskiy polimorfizm Toll-like receptorev 4 tipa u bol'nyh sacharnym diabetom 2 tipa / Tavricheskiy mediko-biologicheskij vestnik. – 2009. – T. 12, № 3 (47). – S. 72-74.
18. Freydin M.B. Regulyatornye T-kletki: proischozhdenie i funkziya// Med biologiya. – 2005. – T.7, №4. – S.347 -354.
19. Freydin M. B. Genetika bronchial'noї astmi / M. B Freydin, L. M. Ogorodova, A. N. Zoy, N. G. Berdnikova. - M. : Atmosfera, 2010. - 78 s.
20. Yarinin A.A., Donezkova A.D. Estestvennye regulyatornye T-kletki i faktor rosta//Immunologiya. – 2006 - №3. – S.176 -186

Матеріал надійшов до редакції 27.09.2013 р.