

УДК [577.21:616.5-002]-053.3/5

Ляховська Н. В.

ПОЛІМОРФІЗМ 896A/G ГЕНУ TLR4, 2258G/A ГЕНУ TLR2 ТА ОСОБЛИВОСТІ КЛІНІКИ АТОПІЧНОЇ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДОРОСЛИХ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Атопічна бронхіальна астма (АБА) має багатофакторний характер формування, особливу роль в якому відіграє спадкова схильність до алергічних захв. Метою нашої роботи стало вивчення поліморфізмів 2258G / A гена TLR2 (rs5743708) і 896A / G гена TLR4 (rs4986791) серед хворих АБА. Нами було з'ясовано, що в групі хворих АБА достовірно частіше зустрічається генотип GA (11,1%) гена TLR2 ($p = 0,04$) в порівнянні з фактори контролю. При вивченні поліморфізму гена TLR 4 визначено, що генотип AG статистично достовірно ($p = 0,04$) зустрічається в групі з АБА (15,6%), ніж у контрольній групі. У пацієнтів, що є носіями мутантної алелі A гена TLR2 в анамнезі частіше відзначалися пневмонії ($p = 0,046$), а також були ознаки кандидозу ($p = 0,034$) порівняно з пацієнтами без поліморфізму. У хворих з поліморфізмом 896A / G гена TLR4 захворювання починалося з дитинства ($p = 0,03$), в спектрі сенсibiliзації були харчові фактори ($p = 0,02$) і були прояви іншої алергічної патології ($p = 0,045$).

Ключові слова: атопічна бронхіальна астма, поліморфізм.

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

Вступ

Алергічні захворювання залишаються актуальною проблемою науки останніх століть. Атопічна бронхіальна астма (АБА) має багатофакторний характер формування, особливу роль в якому відіграє спадкова схильність до появи алергічних проявів. Генетичні передумови виникнення АБА широко вивчаються в усьому світі. В цьому плані в останнє десятиріччя викликають великий інтерес роботи пов'язані зі зміною генетичного регулювання образрозпізнавальних рецепторів [1], у першу чергу – Toll-подібних рецепторів (TLR). Деякі автори вказують на асоціацію між рівнем секреторного IgE та генами TLR4 [2], інші науковці стверджують, що локуси генів, які пов'язані з АБА, в певних випадках не мають взаємозв'язку із специфічною сенсibiliзацією [3].

Поліморфізм TLR2 2258 G/A асоційований з гіпореактивністю у відповідь на ліпопротеїди та пептидоглікани Грам-позитивних бактерій, дріжджеподібні грибки, збудник туберкульозу. Результати роботи E.Gali та співав. [4] не знайшли асоціації між екземою, харчовою алергією та місенс-мутацією TLR2, тоді як інші дослідження підтверджують зв'язок між концентрацією IL4, IgE та порушеннями у вказаному гені [5].

В 2004 році поліморфізм генів TLR 4 (Toll-like рецепторів 4) почали розглядати, як потенційний чинник ризику розвитку атопічної патології, зокрема АБА. Однонуклеотидний поліморфізм (ОНП) TLR4 може порушувати регуляцію вродженої імунної відповіді під час взаємодії з ЛПС [6], що є основним чинником дисбалансу T1/T2-хелперів. ОНП гена TLR4, який кодує позаклітинну структуру ектодомену рецептора, полягає в заміні аспарагінової амінокислоти на гліцинову Asp299Gly 1187 (rs4986790) та на кінцевому етапі пов'язано з пригніченим фосфорилуванням 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. Частота точкових мутацій дуже низька (<1%), винятком є поліморфізм Asp299Gly (rs4986790), частота якого становить >5%. За результатами багатьох досліджень можна зробити висновок, що наявність поліморфних варіантів генів TLR у дітей, хворих на АД, може сприяти чутливості до вірусних інфекцій та обтяжувати перебіг захворювання [7]; визначає зміну характеру перебігу та ступеня вираженості клінічних проявів у дітей з БА [8].

Метою нашої роботи стало вивчення поліморфізмів 2258G/A гена TLR2 (rs5743708) та 896A/G гена TLR4 (rs4986791) серед дорослого населення Полтавської популяції хворих на АБА та зв'язок вказаних генетичних варіантів із особливостями клінічного перебігу даної патології.

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 (прик-тест). 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 зразки ДНК 90 практично здорових осіб, без алергологічного анамнезу з бази ДНК НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Виділення геномної ДНК здійснювали методом фенол-хлороформної екстракції. Визначення поліморфізмів 2258G/A гена TLR2 та

896A/G гену TLR4 проведено методом полімеразної ланцюгової реакції [6].

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 дослідження та їх обговорення

Серед обстежених у 5 (11,1%) пацієнтів захворювання мало інтермітуючий характер, у 23 (51,2%) осіб була легка ступінь, у 17(37,7%) хворих – середня ступінь тяжкості перебігу АБА. Спадкова схильність до atopії склала 70%. Характерною ознакою АБА є прояви полівалентної сенсibilізації, тобто гіперчутливість виявляється до 3 і більше алергенів. Найтипovішим поєднанням алергенів були: побутові + харчові + епідермальні та пилкові + харчові + епідермальні + побутові.

Нами була проаналізована частота зустріча-

ємості поліморфних варіантів генів TLR 2 та TLR4 серед хворих на АБА та в групі популяційного контролю (табл.1). В осіб, що входили до групи контролю, частота «дикого типу» генотипу TLR2 GG становила 97,8%; частота гетерозиготного генотипу GA – 2,2%, мутантний генотип AA не був виявлений. У хворих на АБА відповідні результати були такими: GG – 88,9%, GA – 11,11% та AA також не був виявлений, тобто відмічається статистично значима різниця ($p = 0,04$) між частотами генотипів у групі контролю та у хворих на АБА. Частота мутантного алелю А серед групи контролю склала 1,1%, а серед хворих на АБА – 5,6%, що достовірно не відрізнялось ($\chi^2=3,1$; ВШ= 4,59; ДІ 1,007-20,94; $p=0,08$).

При дослідженні поліморфізму 896A/G гену TLR4 в групі контролю частота «дикого типу» генотипу AA становила 95,6%, гетерозиготного генотипу AG – 4,5%, мутантний генотип GG не виявлений. У хворих на АБА відповідно: AA – 84,4%, AG – 15,6%, GG – не знайдено. Між частотами генотипів у групі популяційного контролю та хворих на АБА виявлена достовірна різниця ($p < 0,05$), що може характеризувати дану патологію, як спадкове порушення імунної відповіді. Частота мутантної алелі G у групі хворих на АБА була статистично вища ($\chi^2 = 3,42$; $p = 0,064$) та склала 7,8%, у порівнянні з групою контролю (табл. 1).

Таблиця 1
Розподіл частот генотипів поліморфізмів генів TLR 2 та TLR4 серед груп контролю і хворих на АБА% (n)

| Ген, поліморфізм | Частота генотипу | Група контролю (n=90) | Хворі (n=45) | P* | Частота алелі | Група контролю (n=90) | Хворі на БА, (n=45) | χ^2 Пірсона, df=1 | ВШ* (95% ДІ) | P** |
|------------------|------------------|-----------------------|--------------|------|---------------|-----------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|------|
| TLR2 2258G/A | GG | 97,8 (88) | 88,9 (40) | 0,04 | G | 98,9 (178) | 94,4 (85) | 3,10 | 4,59 (1,007-20,94) | 0,08 |
| | GA | 2,2 (2) | 11,1 (5) | | A | 1,1 (2) | 5,6 (5) | | | |
| | AA | - | - | | | | | | | |
| TLR4 896A/G | AA | 95,6 (86) | 84,4 (38) | 0,04 | A | 97,8 (176) | 92,2 (83) | 3,42 | 3,52 (1,06-11,66) | 0,06 |
| | AG | 4,5 (4) | 15,6 (7) | | G | 2,2 (4) | 7,8 (7) | | | |
| | GG | - | - | | | | | | | |

У групах з поліморфізмами 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).

Важливе значення для розуміння впливу ОНП генів TLR мають клінічні прояви АБА. Гетерозиготний генотип GA гену TLR 2 (n=5) спостерігався тільки у жінок (100%). Достовірно частіше у носіїв мутантної алелі А ($p = 0,046$) в анамнезі були пневмонії (2 і більше раз за життя), а також відмічались ознаки кандидозу ($p = 0,034$) в порівнянні з пацієнтами без поліморфізму. Внаслідок змін в генах TLR2 відбувається порушення розпізнавання інфекційних агентів (в тому числі грибових),

що призводить до дисбалансу функціонування системи вродженого імунітету та розвитку хронічних запальних захворювань. Поліморфізм Asp299 Gly TLR4 зі зміною алелю Asp на Gly був виявлений у 7 осіб. У 6 осіб цієї групи ($p=0,03$) прояви АБА починалися в ранньому дитинстві; 4 пацієнти пройшли типові етапи «атопічного маршу». Достовірно частіше ($p=0,02$) у цих хворих у порівнянні з пацієнтами без вказаних генетичних змін визначалась харчові фактори сенсibilізації. Характерною клінічною ознакою вказаного ОНП TLR4 була супутня алергічна патологія (ринокон'юнктивальний синдром та дерматит) ($p=0,045$) та захворювання ШКТ. Науковці трактують поліморфізм гена TLR4 як мутацію, що призводить до втрати рецептором здатності зв'язуватися з бактеріальним ЛПС. Подальше порушення передачі активаційного сигналу NF κ B супроводжується дисбалансом синтезу Tx1/Tx2, та визначає ступінь вираженості клінічних проявів захворювання та наявність супутньої патології.

Таблиця 2.

Внутрішньогруповий аналіз розподілу частот генотипів та поліморфних алелей генів TLR 2 та TLR 4

| 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 2258G/A гену TLR2 | | | | | | | |
| Група контролю (n=90) | 88 | 88,2 | 0,32 | 0,98 | -0,01 | 1,21 | 0,4 |
| GG | 2 | 1,8 | | | | | |
| GA | | 0,009 | | | | | |
| AA | 0 | | | | | | |
| Хворі (n=45) | 40 | 39,6 | 0,2 | 0,9 | -0,06 | 1,46 | 0,27 |
| GG | 5 | 4,95 | | | | | |
| GA | | 0,2 | | | | | |
| AA | 0 | | | | | | |
| Поліморфізм 896A/G гену TLR4 | | | | | | | |
| Група контролю (n=90) | 86 | 86,4 | 0,01 | 0,99 | -0,02 | 1,3 | 0,35 |
| AA | 4 | 3,6 | | | | | |
| AG | | 0,04 | | | | | |
| GG | 0 | | | | | | |
| Хворі (n=45) | 38 | 38,3 | 0,28 | 0,87 | -0,08 | 1,54 | 0,23 |
| AA | 7 | 6,8 | | | | | |
| AG | | 0,3 | | | | | |
| GG | 0 | | | | | | |

При вивченні частот гаплотипів поліморфізмів 2258G/A гену TLR2 та 896A/G гену TLR4

(табл.3) не виявлено статистично достовірного зв'язку між наявністю мутантних алелей та АБА.

Таблиця 3

Розподіл частот гаплотипів поліморфізмів Toll- подібних рецепторів 896A/G гену TLR4 та 2258G/A гену TLR2

| TLR 2 TLR4 | AAGG | AGGG | GGGG | AAGA | AGGA | GAGG | AAAA | AGAA | AAGG |
|------------------------|-----------|----------|------|---------|---------|------|------|------|------|
| Група контролю (n= 90) | 93,3 (84) | 8,8 (4) | 0 | 4,4 (2) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Хворі на АБА (n= 45) | 75,5 (34) | 13,3 (6) | 0 | 8,8 (4) | 2,2 (1) | 0 | 0 | 0 | 0 |

Висновки:

1. В групі хворих на АБА достовірно частіше зустрічається генотип GA (11,1%) гену TLR2 ($p=0,04$) в порівнянні з групою контролю.

2. При вивченні поліморфізму гену TLR 4 з'ясовано, що генотип AG статистично вірогідніше ($p =0,04$) зустрічається в групі з АБА (15,6%) ніж в контрольній групі.

3. У пацієнтів, які є носіями мутантної алелі А гену TLR2, в анамнезі частіше відмічались пневмонії ($p = 0,046$), а також були ознаки кандидозу ($p = 0,034$) в порівнянні з пацієнтами без поліморфізму.

4. У хворих з поліморфізмом 896A/G гену TLR4 захворювання починалось з дитинства ($p=0,03$), в спектрі сенсibilізації були харчові чинники ($p=0,02$) та мали місце прояви іншої алергічної патології ($p=0,045$).

Отже, поліморфізм 896A/G гену TLR4 та 2258G/A гену TLR2 має важливе значення в розвитку АБА та асоційований з патогенетично значущими ознаками даного захворювання.

Література

- Postma D. Genetics of asthma: where are we and where do we go? / D. Postma G. Koppelman // American Thoracic Society. – 2009. – V. 6. – P.283-287.
- Куценко Н.Л. Ассоциация полиморфизма Toll-подобного рецептора 4 Asp299Gly с повышенным уровнем продукции аллерген-специфических иммуноглобулинов E у пациентов с аллергическими заболеваниями / Н.Л. Куценко, О.В. Измайлова, Л.Э. Веснина [та ін.] // Иммунология. – 2011. – №6. – С.310-313.
- Michael S. D. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma / S. D. Michael // J. Allergy and clinical immunology. – 2008. – V.122. – P. 86-92.
- Galli E. Eczema and food allergy in an Italian pediatric cohort: no association with TLR-2 and TLR-4 polymorphisms / E. Galli, A. Ciucci, S. Cersosimo [et al.] // J. Immunopathol. – 2010. – №2. – P. 671-675.
- Yoshika M. Lipoteichoic acid downregulates Fc α RI expression on human mast cells through Toll-like receptor 2 / M. Yoshika, N. Fukuishi, S. Iriguchi [et al.] // J. Allergy. Clin. Immunol. – 2007. – V.120. – P. 452-461.
- Ізмайлова О.В. Зв'язок поліморфізмів генів TLR2 та TLR4 зі схильністю до окремих урогенітальних інфекцій / О.В. Ізмайлова, О.А. Шликова, Н.О. Боброва [та ін.] // Цитология і генетика. – 2011. – № 4. – С. 29-35.
- Левченко Л. Ю. Поліморфізм 896 A/G гену TLR4, а не гену 1196 C/T гену TLR4 та 2258 G/A гену TLR2, визначає тяжкий перебіг atopічного дерматиту у дітей / Л. Ю. Левченко, О.В. Ізмайлова, О. А. Шликова [та ін.] // Цитология і генетика. – 2013. – №1. – С. 41-45.
- Крючко Т.О. Генетичний поліморфізм Toll-подібного рецептора 4 у дітей з atopічною бронхіальною астмою / Т.О. Крючко, І.П. Кайдашев, Ю.О. Вовк [ті ін.] // Клін. імунол. Алергол. Інфектол. – 2011. – № 5. – С.52-54.

Реферат

ПОЛИМОРФИЗМ 896A/G ГЕНА TLR4, 2258G/A ГЕНА TLR2 И ОСОБЕННОСТИ КЛИНИКИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ВЗРОСЛЫХ

Ляховская Н. В.

Ключевые слова : атопическая бронхиальная астма, полиморфизм.

Атопическая бронхиальная астма (АБА) имеет многофакторный характер формирования, особую роль в котором играет наследственная предрасположенность к аллергическим проявлениям. Целью нашей работы стало изучение полиморфизмов 2258G / А гена TLR2 (rs5743708) и 896A / G гена TLR4 (rs4986791) среди больных АБА. Нами было установлено, что в группе больных АБА достоверно чаще встречается генотип GA (11,1%) гена TLR2 ($p = 0,04$) по сравнению с группой контроля. При изучении полиморфизма гена TLR 4 определено, что генотип AG статистически чаще ($p = 0,04$) встречается в группе с АБА (15,6%), чем в контрольной группе. У пациентов, являющихся носителями мутантной аллели А гена TLR2 в анамнезе чаще отмечались пневмонии ($p = 0,046$), а также были признаки кандидоза ($p = 0,034$) по сравнению с пациентами без полиморфизма. У больных с полиморфизмом 896A / G гена TLR4 заболевания начиналось с детства ($p = 0,03$), в спектре сенсibilизации были пищевые факторы ($p = 0,02$) и были проявления другой аллергической патологии ($p = 0,045$).

Summary

POLYMORPHISM 896A / G GENE TLR4, 2258G / A GENE TLR2 AND CLINICAL CHARACTERISTIC OF ATOPIC ASTHMA IN ADULTS
Lyakhovska N.V.

Key words: atopic bronchial asthma, polymorphism.

Atopic asthma (AA) is of a multifactorial nature in which a special role is played by genetic predisposition to allergic manifestations. Genetic predictors of ABA are widely studied all over the world. The last decade submitted of great deal of interesting works associated with the change in the genetic regulation of Toll-like receptors (TLR).

The aim of our research was to study the polymorphism 2258G / A gene TLR2 (rs5743708) and 896A / G gene TLR4 (rs4986791) in the adult with atopic asthma who are residents of Poltava city and determine these genetic variants with the peculiarities of the clinical course of the disease.

Results and discussion. We analyzed the occurrence rate of polymorphic variants of genes TLR 2 and TLR4 in ABA patients and in the control group (Table 1). In individuals who made up the control group, the frequency of "wild-type" TLR2 GG genotype was 97.8%, the frequency of the heterozygous genotype GA - 2,2%, the mutant genotype AA was not identified. Patients ABA corresponding results were as: GG - 88,9%, GA - 11,11% and AA also was not detected, i.e. there is a statistically significant difference ($p = 0.04$) between the frequencies of genotypes in the control group and patients ABA. The frequency of the mutant allele among the control group was 1.1%, and among patients with AAA - 5.6%, which did not differ significantly ($\chi^2 = 3,1$; OR = 4.59, CI 1,007-20,94, $p = 0,08$). In the study of polymorphism 896A / G TLR4 gene in the control frequency of the "wild-type" AA genotype was 95.6%, heterozygous genotype AG - 4,5%, the mutant genotype GG was not revealed. In patients with AAA, respectively: AA made up 84,4%, AG - 15,6%, GG was not found. Between the frequencies of genotypes in a population-based control group and patients with AAA a significant difference ($p < 0.05$), which may characterize this pathology is an inherited disorder of immune response. The frequency of the mutant G allele in patients ABA was statistically higher ($\chi^2 = 3,42$, $p = 0.064$) and was 7.8%, compared with the control group (Table 1). Important for understanding the impact of TLR genes SNPs have clinical manifestations of the ABA. Heterozygous genotype GA gene TLR 2 ($n = 5$) was observed only in women (100%). Significantly more frequent in carriers of the mutant allele ($p = 0.046$), a history of pneumonia (2 or more times in my life), and there were signs of candidiasis ($p = 0.034$) compared with patients without polymorphism Asp299 Gly TLR4 polymorphism with change of Asp to Gly allele was detected in 7 patients. At 6 persons in this group ($p = 0.03$) manifestations of the AA began in early childhood, and 4 patients underwent standard procedures "atopic march." Significantly more often ($p = 0.02$) in these patients compared with patients without these genetic alterations was determined dietary factors sensitization. The characteristic clinical feature of this TLR4 SNP was associated with allergic pathology (ринконъюнктивальный синдром и дерматит) ($p = 0.045$) and gastrointestinal diseases. Scientists interpret polymorphisms TLR4, as the mutation causes the loss of receptor binding ability with bacterial LPS. Further disruption of NF κ B activation signal is accompanied by an imbalance of Th1/Th2 synthesis and determines the severity of the clinical manifestations of the disease and the presence of comorbidities.

Conclusions: 1. In the group of patients with atopic asthma were significantly more common genotype GA (11,1%) gene TLR2 ($p = 0.04$) compared with the control group. 2. In the study of gene polymorphism TLR 4 determines that the AG genotype is significantly ($p = 0.04$) found in the group with ABA (15.6%) than in control group. 3. Patients who are carriers of a mutant allele of the gene TLR2 are observed to often manifest history of pneumonia ($p = 0.046$) and signs of candidiasis ($P = 0.034$) compared with patients who have no polymorphism. 4. In patients with polymorphism 896A / G TLR4 gene disease begins in childhood ($p = 0.03$), the spectrum of sensitization were dietary factors ($p = 0.02$), and there are other manifestations of allergic disease ($p = 0.045$).