

Н. В. Ляховська, В. Д. Сакевич, В. І. Ляховський, Ю. О. Капустник

*Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія»
Полтава, Україна*

N. V. Lyakhovska, V. D. Sakevich, V. I. Lyakhovsky, Yu. O. Kapustnik

*The Higher State Educational Establishment of Ukraine «Ukraine Medical Stomatological Academy»
Poltava, Ukraine*

ПРОГНОЗ ПЕРЕБІГУ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДОРΟΣЛИХ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ПОЛІМОРФІЗМУ 896A/G ГЕНУ TLR4, 2258G/A ГЕНУ TLR2

The forecast of bronchial asthma current at adults in polymorphism dependence in 896A/G gene TLR4 and 2258A/G gene TLR2

Резюме

Бронхіальна астма (БА) має багатофакторний характер формування, особливу роль в якому відіграє спадкова схильність до алергічних захворювань. Метою нашої роботи стало вивчення поліморфізмів 2258G/A гена TLR2 (rs5743708) і 896A/G гена TLR4 (rs4986791) серед хворих БА. Нами було з'ясовано, що в групі хворих БА достовірно частіше зустрічається генотип GA (11,1%) гена TLR2 ($p = 0,04$) в порівнянні з групою контролю. При вивченні поліморфізму гена TLR 4 визначено, що генотип AG достовірно частіше ($p = 0,04$) зустрічається в групі з БА (15,6%), ніж у контрольній групі. У пацієнтів, що є носіями мутантної алелі А 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 сенсibiлізації були харчові фактори ($p = 0,02$) і були прояви іншої алергічної патології ($p = 0,045$), у цих пацієнтів відмічається несприятливий перебіг БА.

Ключові слова: поліморфізм, Toll-подібні рецептори, бронхіальна астма.

Abstract

Bronchial asthma (BA) has a multifactorial character of formation, a special role in which the hereditary predisposition to allergic manifestations plays. The purpose of our study was to study polymorphisms of 2258G/A gene TLR2 (rs5743708) and 896A/G gene TLR4 (rs4986791) among patients with asthma. We found that the genotype GA (11,1%) of the TLR2 gene ($p = 0,04$) is significantly more frequent in the group of patients with asthma compared with the control group. When we studying the polymorphism of the TLR 4 gene, it is determined that the AG genotype is statistically more common ($p = 0,04$) in the BA group (15,6%) than in the control group. Patients who carry the mutant allele A of the TLR2 gene had a history of pneumonia ($p = 0,046$), and there were signs of candidiasis ($p = 0,034$) compared with patients without polymorphism. In patients with 896A/G polymorphism of the TLR4 gene, the disease began in childhood ($p = 0,03$), in the sensitization spectrum there were nutritional factors ($p = 0,02$), there were manifestations of other allergic pathology ($p = 0,045$), these patients noted progressive deterioration of the course of asthma.

Keywords: bronchial asthma, toll like receptor, polymorphism.

ВСТУП

Астма є поширеним гетерогенним захворюванням, що характеризується хронічним запаленням дихальних шляхів і визначається повторюваними респіраторними симптомами (такими як хрипи, кашель, задишка і судома), а також обструкцією повітряного потоку

відповідно до критеріїв GINA [1]. Бронхіальна астма (БА) викликає серйозну загрозу для здоров'я пацієнтів всіх вікових груп та накладає важкий тягар на системи охорони здоров'я і на суспільство за рахунок зниження працездатності. Генетичні передумови виникнення БА широко вивчаються в усьому світі. В цьому

плані в останнє десятиріччя викликають великий інтерес роботи пов'язані зі зміною генетичного регулювання образрозпізнавальних рецепторів [2]. Поліморфізм генів TLR можуть відповідати за індивідуальну сприйнятливість і тяжкість астми. Генетична різноманітність в певних алелях певною мірою визначає схильність до конкретного захворювання [3]. Одиначні нуклеотидні поліморфізми (ОНП) в гені TLR4 впливають на чутливість до алергенів [4]. Zhang et al. [5] виявив шкідливий вплив алелі гомозиготи TT в гені TLR4 rs1927914 на обсяг примусового видиху в 1 секунду (FEV1), що призвело до порушення функції легенів. Крім того, генотип гомозиготи AA і аллель A в Asp299 Gly гена TLR4 можуть корелювати зі зменшеним ризиком астми, про що свідчить зв'язок між поліморфізмом TLR4 і розвитком астми в дослідженні Tizaoui et al. [6]. Деякі автори вказують на асоціацію між рівнем секреторного Ig E та генами TLR4 [7], інші науковці стверджують, що локуси генів, які пов'язані з БА в певних випадках не мають взаємозв'язку із специфічною сенсibiliзацією [8].

Повідомлялося, що а поліморфізм TLR2 впливає на ризик астми і функцію легенів [9, 10]. Результати роботи E. Galі та співав. [11] не знайшли асоціації між екземою, харчовою алергією та місенс-мутацією TLR2, тоді як інші дослідження підтверджують зв'язок між концентрацією IL4, Ig E та порушеннями у вказаному гені [12].

Вивчення стану TLR при БА має важливе значення, адже нові дослідження показують, що терапія, орієнтована на TLR, потенційно грає ключову роль в ефективному контролі запалення дихальних шляхів.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Вивчення поліморфізмів 2258G/A гена TLR2 (rs5743708) та 896A/G гена TLR4 (rs4986791) серед дорослого населення хворих на БА та зв'язок вказаних генетичних варіантів із особливостями клінічного перебігу даної патології в динаміці.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Під нашим спостереженням, протягом 6 років, було 45 осіб хворих на БА (група А). Діагноз БА та ступінь її тяжкості встановлено відповідно до затверджених критеріїв (наказ МОЗ України № 767 та міжнародні рекомендації GINA, 2014) на базі алергологічного і пульмонологічного відділення Полтавської обласної клінічної лікарні. Анамнестичні дані зібрані шляхом анкетування з використанням спеціального опитувальника. Усім пацієнтам з БА були проведені загальноклінічні лабораторні, інструментальні та алергологічне обстеження (прик-тест). Обстеження проводили за умови

відсутності у пацієнта загострення основного чи супутніх хронічних захворювань, відсутності гострих інфекційних захворювань та тяжкої супутньої патології, яка б могла вплинути на результати дослідження.

До групи контролю (група К) 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 гена TLR4 проведено методом полімеразної ланцюгової реакції [13].

Статистична обробка отриманих даних виконана з використанням комп'ютерних програм пакету STATISTICA (StatSoft Statistica v.6.0.).

Порівняння частот генотипів між досліджуваними групами проводили шляхом аналізу таблиць спряженості за допомогою точного критерію Фішера. Для порівняння частот алелей використовували критерій χ^2 Пірсона з поправкою Йетса. Для оцінки відмінностей між групами використовували точний двосторонній критерій Фішера. Для всіх процедур статистичного аналізу критичний рівень значимості (p) приймали рівним або менше 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час першого обстеження серед усіх пацієнтів у 5 (11,1%) захворювання мало інтермітуючий характер, у 23 (51,2%) осіб була легка ступінь, у 17 (37,7%) хворих – середня ступінь тяжкості перебігу БА. Спадкова схильність до атопії склала 70%. Характерною ознакою БА є прояви полівалентної сенсibiliзації, тобто гіперчутливість виявляється до 3 і більше алергенів. Найтипівшим поєднанням алергенів були: побутові + харчові + епідермальні та пилкові + харчові + епідермальні + побутові.

Нами була проаналізована частота поліморфних варіантів генів TLR2 та TLR4 серед хворих на БА 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%, генотип AA не був виявлений. У хворих на БА відповідні результати були такими: GG – 88,9%, GA – 11,1% та AA також не був виявлений, тобто відмічається статистично значуща різниця (p = 0,04) між частотами генотипів у групі контролю та у хворих на БА. Частота мутантного алелю A серед групи контролю склала 1,1%, а серед хворих на БА – 5,6%, що достовірно не відрізнялось.

Розподіл частот генотипів поліморфізмів генів TLR2 та TLR4 серед груп контролю і хворих на бронхіальну астму

Поліморфізм Ген	Частота генотипу	Групи		p	Частота алелі	Групи		p*
		К (n = 90)	А (n = 45)			К (n = 90)	А (n = 45)	
		n/%	n/%			n/%	n/%	
2258G/A TLR2	GG	88/97,8	40/88,9	0,04	G	178/98,9	40/88,9	0,08
	GA	2/2,2	5/11,1					
	AA				A	2/1,1	5/5,6	
896A/G TLR4	AA	86/95,6	38/84,4	0,04	A	176/97,8	83/92,2	0,06
	AG	4/4,5	7/15,6					
	GG				G	4/2,2	7/7,8	

Примітки: – p – рівень значущості, отриманий точним тестом Фішера

p* – рівень значущості, отриманий тестом χ^2 – для груп контролю (К) та хворих на БА (А)

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

Важливе значення для розуміння впливу ОНП генів TLR мають клінічні прояви БА. Гетерозиготний генотип GA гену TLR2 ($n = 5$) спостерігався тільки у жінок (100%). Достовірно частіше у носіїв мутантної алелі A ($p = 0,046$) в анамнезі були пневмонії (2 і більше випадків 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 грибкових), що призводить до дисбалансу функціонування системи вродженого імунітету та розвитку хронічних запальних захворювань. Розподіл поліморфного алелю A гену TLR2 у групах хворих з різним ступенем тяжкості БА відбувся наступним чином: в групі з легким перебігом – у 4 осіб, з інтермітуючим перебігом у 1 особи, що не є статистично достовірно, в групі із середньою тяжкістю ОНП TLR2 не виявлено.

Поліморфізм Asp299 Gly TLR4 зі зміною алелю Asp на Gly був виявлений у 7 осіб. По групам за тяжкістю захворювання розподіл гетерозиготного генотипу AG гену TLR4

відбувся наступним чином: з інтермітуючою астмою у жодного хворого, з легким перебігом БА у 4 осіб, з перебігом середньої тяжкості у 3 осіб. У 6 осіб носіїв алелі G ($p = 0,03$) прояви БА 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 сенсibiliзації. 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 (ліпополісахаридом). Подальше порушення передачі активаційного сигналу NF κ B супроводжується дисбалансом синтезу Tx1/Tx2, та визначає ступінь клінічних проявів захворювання та наявність супутньої патології.

При аналізі перебігу захворювання через 5 років після первинного обстеження з'ясовано, що у пацієнтів носіїв алелі A гену TLR2 відмічається контрольований перебіг БА, тяжкість перебігу БА не змінилась. У хворих, які є носіями гетерозиготного генотипу AG гену TLR4 відбулося погіршення стану: збільшилася частота загострень БА, зменшилися показники ОФВ1, з'явилася необхідність у підвищенні дози інгаляційних препаратів для лікування, один пацієнт потребував перорального прийому глюкокортикоїдів. Розподіл по тяжкості перебігу у осіб, які є носіями алелі G гену TLR4 також змінився: 6 осіб мали перебіг БА середньої тяжкості, одна – тяжкий перебіг БА.

ВИСНОВКИ

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

2. При вивченні поліморфізму гену TLR4 з'ясовано, що генотип AG статистично вірогідніше ($p = 0,04$) зустрічається в групі з БА (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 сенсibiliзації були харчові чинники ($p = 0,02$) та мали місце прояви іншої алергічної патології ($p = 0,045$).

5. Носійство алелі G гену TLR4 зумовлює несприятливий перебіг БА.

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

ЛІТЕРАТУРА

1. Global Initiative for Asthma, «GINA report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention», Documents/Resources, GINA.

http://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/01/GINA_Report_2015_Aug11-1.pdf.

2. Postma D., Koppelman G. Genetics of asthma: where are we and where do we go? // American Thoracic Society. – 2012. – V. 6. – P. 283–287.

3. Lee S. W., Kim D. R., Kim T. J. et al. The association of down-regulated toll-like receptor 4 expression with airflow limitation and emphysema in smokers // Respiratory Research. – 2012. – V. 13. – article 106.

4. Werner M., Topp R., Wimmer K. TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2013. – V. 112. – P. 323–330.

5. Zhang Q., Qian F. H., Zhou L. F. Polymorphisms in toll-like receptor 4 gene are associated with asthma severity but not susceptibility in a Chinese Han population // Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology – 2011. – V. 21. – № 5. – P. 370–377.

6. Tizaoui K., Kaabachi W., Hamzaou K., Hamzaou A. Association of single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor genes with asthma risk: a systematic review and meta-analysis // Allergy, Asthma & Immunology Research. – 2015. – V. 7. – P. 130–140.

7. Куценко Н. Л., Измайлова О. В., Веснина Л. Э. и соавт. Ассоциация полиморфизма Toll-подобного

рецептора 4 Asp299Gly с повышенным уровнем продукции алергенспецифических иммуноглобулинов E у пациентов с аллергическими заболеваниями // Иммунология. – 2011. – № 6. – С. 310–313.

8. Michael S. D. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma / S. D. Michael // J. Allergy and clinical immunology. – 2014. – Vol. 122. – P. 86–92.

9. Qian F. H. et al. Polymorphisms in the toll-like receptor 2 subfamily and risk of asthma: a case-control analysis in a Chinese population // Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. – 2012. – V. 20. – P. 340–346.

10. Kormann M. S. et al. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2008. – V. 122. – P. 86–88.

11. Galli E. et al. Eczema and food allergy in an Italian pediatric cohort: no association with TLR-2 and TLR-4 polymorphisms // J. Immunopathol. – 2010. – № 2. – P. 671–675.

12. Yoshika M. et al. Lipoteichoic acid downregulates FcεRI expression on human mast cells through Toll-like receptor 2 // J. Allergy. Clin. Immunol. – 2016. – V. 120. – P. 452–461.

13. Левченко Л. Ю. и співавт. 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 // Цитологія і генетика. – 2013. – № 1. – С. 41–45.

REFERENCE

1. Global Initiative for Asthma, «GINA report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention», Documents/Resources, GINA.

http://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/01/GINA_Report_2015_Aug11-1.pdf.

2. Postma D., Koppelman G. (2012) Genetics of asthma: where are we and where do we go?

American Thoracic Society, vol. 6, pp. 283–287.

3. Lee S. W. et al. (2012) The association of down-regulated toll-like receptor 4 expression with airflow limitation and emphysema in smokers. Respiratory Research, vol. 13, article 106.

4. Werner M., Topp R., Wimmer K. (2013) TLR4 gene variants modify endotoxin effects

on asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 112, pp. 323–330.

5. Zhang Q., Qian F. H., Zhou L. F. (2011) Polymorphisms in toll-like receptor 4 gene are associated with asthma severity but not susceptibility in a Chinese Han population. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, vol. 21, no 5, pp. 370–377.

6. Tizaoui K. et al. (2015) Association of single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor genes with asthma risk: a systematic review and meta-analysis. *Allergy, Asthma & Immunology Research.*, vol. 7, pp. 130–140.

7. Kutsenko N. L., Izmaylova O. V., Vesnin L. V. et al. (2011) Assotsiatsiya polimorfizma Toll-podobnogo retseptora 4 Asp299Gly s povyshennym urovnem produktsii allergenspetsificheskikh immunoglobulinov Eupatsiyentovs allergicheskimi zabolevaniyami [Association of polymorphism of Toll-like receptor 4 Asp299Gly with increased production of allergen-specific immunoglobulin E in patients with allergic diseases]. *Immunologiya*, no 6, pp. 310–313.

8. Michael S. D. (2014) Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *J. Allergy and clinical immunology*,

vol. 122, pp. 86–92.

9. Qian F. H. et al. (2012) Polymorphisms in the toll-like receptor 2 subfamily and risk of asthma: a case-control analysis in a Chinese population. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, vol. 20, pp. 340–346.

10. Kormann M. S., Depner M., Harlt D. (2008) Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 122, pp. 86–88.

11. Galli E. et al. (2010) Eczema and food allergy in an Italian pediatric cohort: no association with TLR-2 and TLR-4 polymorphisms. *J. Immunopathol.*, no 2, pp. 671–675.

12. Yoshika M. Et al. (2016) Lipoteichoic acid downregulates FcαRI expression on human mast cells through Toll-like receptor 2. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, vol. pp. 452–461.

13. Levchenko L. Yu. et al. (2013) Polimorfizm 896A/G genu TLR4, a ne genu 1196S/T, genu TLR4 ta 2258G/A genu TLR2, viznachae tyazhkiy perebig atopichnogo dermatitu u ditey [The 896A/G gene TLR4, and not the gene 1196C/T gene TLR4 and 2258G/A gene TLR2 polymorphism, define severe abortion atopie dermatitis in children] *Tsitologiya i genetika*, no 1, pp. 41–45.

Стаття надійшла до редакції 25.07.2017