© Сакевич В. Д.
УДК [577.21:616.5-002]-053.3/.5

# РОЗПОВСЮДЖЕНІСТЬ ГАПЛОТИПІВ ПОЛІМОРФНИХ ГЕНІВ TLR 2, TLR 4, CLC-10 ТА ЇХ ЗВ'ЯЗОК З ОКРЕМИМИ ІМУНОЛОГІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ У ХВОРИХ НА АЛЕРГІЧНИЙ РИНІТ*

*Сакевич В. Д.*

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

*С целью определения роли полиморфизма отдельных генов , которые контролируют структурные и регуляторные элементы неспецифической резистентности организма , в развитии аллергического ринита определена распространенность полиморфизма 2258G / A гена TLR2 ( rs5743708 ), гена TLR 4 ( rs4986790 ) и гена CLC -10 (rs420297) в группе наблюдения и в группе популяционного контроля , проведен анализ иммунологических показателей и клинических проявлений у больных с полиморфными вариантами исследуемых генов. Для выяснения возможного сочетания различных генотипов всех генов , которые определяются проведен анализ гаплотипов . При сравнении частот гаплотипов определенных полиморфизмов генов TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) и CLC-10 (rs420297) в группах больных АР и популяционного контроля не выявлено достоверной зависимости между наличием в генотипе аллеля Т гена галектину -10, аллеля А гена TLR 2 или аллеля G гена TLR 4 и развитием АР. При изучении распространенности возможного сочетания генотипов генов TLR 4 ( Asp299Gly ) и CLC10 (rs420297 )) обнаружено , что чаще встречается гаплотип ААСС , как в группе контроля ( 30%) , так и у больных АР ( 24%) , в группах больных АР и популяционного контроля не выявлено достоверной зависимости между наличием в генотипе аллеля Т гена галектину -10 и аллеля G гена TLR 4 с развитием АР . У больных АР носителей гаплотипов TLR4 / CLC 10 содержащие полиморфные аллели G и Т выявлен достоверно более высокий уровеньэкспрессии молекул CD4 CD25 Foxp3 Treг клеток (критерий Манна- Уитни U ( n = 4; n = 41 ) = 25,50 ; p = 0,024), составивший 6,29 ± 0,50 % ( тыс / мкл ) со снижением содержания IL- 10 и повышением IL- 4 ( 55,9 ± 11,33 пг / мл). Полученные результаты позволяют рассматривать ОНП генов TLR 4 (rs4986790) и CLC-10 (rs420297), как дополнительный прогностический показатель при патогенетических исследованиях.*

Ключові слова: поліморфізм, Toll-подібні рецептори, галектин-10, алерічний риніт.

## Вступ

На сьогодні існує тенденція до стрімкого поширення алергічних захворювань у світі, що становить серйозну проблему в зв'язку з широким розповсюдженням, щорічним повсюдним зростанням захворюваності, частими ускладненнями, а також різким зниженням працездатності та якості життя пацієнтів.

Алергічний риніт (АР) розглядають як важливу проблему алергології, оскільки це захворювання в більшості випадків є першим клінічним проявом атопії з подальшою трансформацією в бронхіальну астму (БА) [4].

Вивчення генетичних основ атопії є актуальною проблемою сьогодення, необхідною для встановлення взаємозв'язку між спадковими та середовищними факторами в реалізації досить складного патологічного фенотипу та розумінню механізмів взаємодії полігених систем в процесі реалізації спадкової інформації на рівні цілісного організму. Знаючи молекулярні та клітинні механізми формування захворювань, можливо намітити гени, білкові продукти яких є найбільш значущими. Згідно досліджень, гени атопії та пов'язаних з нею станів сконцентровано в основному у 10 ділянках геному людини.

За даними досліджень існують відомості щодо асоціації алергічного риніту із поліморфізмом гену TIM-1 9], CD14 5],TLR 2-46], RNA se 3 7].

Специфічність системи вродженого імунітету реалізується через родину Toll-подібних рецепторів (TLRs). Важливими структурно-молекулярними елементами системи патерн - розпізнавальних рецепторів (ППР) є Toll-подібний рецептор 2 (TLR 2) та Toll-подібний рецептор 4 (TLR4). Гени, що кодують TLR2 та TLR4, виявляють високу варіабельність у популяції [1]. Останнім часом з'являються відомості, щодо виявлення функціонального поліморфізму генів TLR, зумовленого заміною одиничних нуклеотидів (від англ. Single nucleotide polymorphism – SNP). В результаті таких замін знижується здатність до розпізнання відповідних лігандів та ефективність проведення сигнальних імпульсів, що призводить до порушення активації клітин імунної системи. Функціональний поліморфізм TLR 2-4 порушує регуляцію вродженої імунної відповіді, що є основним чинником дисбалансу Т1/Т2-хелперів . Подібний механізм може відігравати вирішальну роль у формуванні хронічного запального процесу та привертає увагу, як потенційний чинник ризику розвитку атопічної патології, зокрема АР [6].

В дослідженнях закордонних учених вивчається асоціація алергічного риніту із поліморфізмом гену галектину-10 (CLC-10) [3]. Галектин-10 є представником родини ендогенних лектинів (відомий, як лізофосфоліпаза, білок Шарко - Лейдена), виявлений в еозинофілах та базофілах. Точні дослідження довели

* *Цитування при атестації кадрів: Сакевич В. Д. Розповсюдженість гаплотипів поліморфних генів TLR 2, TLR 4, CLC-10 та їх зв'язок з окремими імунологічними показниками у хворих на алергічний риніт // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 16 –20.*

значну внутріклітинну експресію галектину-10 в CD25+ $T_{reg}$ клітинах. В зв'язку з цим, він безпосередньо не приймає участі в пригніченні функції CD25+ $T_{reg}$ клітин, однак специфічна блокада галектину-10 відновлює проліферативну здатність CD25+ $T_{reg}$ клітин та підсилює їх супресивні функції. Отже галектин - 10 є необхідним для здійснення регуляторної активності $T_{reg}$ клітин [8].

З метою визначення ролі поліморфізму окремих генів, які контролюють структурні та регуляторні елементи неспецифічної резистентності організму, в розвитку алергічного риніту визначена розповсюдженість поліморфізму 2258G/A гену TLR2 (rs5743708), гену TLR 4 (rs4986790) та гену CLC-10 (rs420297) в групі спостереження і в групі популяційного контролю, проведено аналіз імунологічних показників та клінічних проявів у хворих з поліморфними варіантами досліджуваних генів. Для з'ясування можливого поєднання різних генотипів всіх генів, що визначаються проведено аналіз гаплотипів.

### Матеріали та методи дослідження

Для вирішення висунутих завдань проведено обстеження 45 хворих на АР віком від 19 до 65 років (35,6 ± 1,57) (чоловіки склали 51% (23 хворих), а жінки – 49 % (22 хворих)). На момент обстеження хворі знаходились в стадії клінічної ремісії та припиняли прийом протиалергічних препаратів за 72 години, хворі не мали важкої супутньої патології.

Діагноз АР встановлювали на основі критеріїв діагностики ARIA (2008) за алгоритмом діагностики прийнятим в Україні та затвердженим МОЗ України. Якість життя хворих визначали за допомогою загальновизнаних опитувальників (Adult Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire).

Сенсибілізацію до алергенів діагностували на підставі комплексу алергологічних методів обстеження: збір алергологічного анамнезу, позитивних шкірних скарифікаційних тестів на алергени з використанням стандартних наборів (ТОВ «Імунолог», Україна).

За стандартною методикою проведене визначення числа лейкоцитів в крові та підрахунок формених елементів крові в мазках. Фенотип лімфоцитів аналізували у венозній крові, використовуючи моноклональні антитіла до CD4,CD25 (виробництво «Сорбент», Росія) та внутрішньоклітинного білку Foxp3 **(**«Bioscience», США) методом проточної цитофлюориметрії за допомогою проточного цитофлюориметра EPIX LX-MCL (Beckman Coulter, США), використовуючи програму System II TM software.

Рівні загального IgE, інтерлейкіну-4 (ІЛ-4) та інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) визначали за допомогою тест-систем ІФА (ТОВ «Укрмед-Дон», Україна) з використанням імуноферментного аналізатора "Stat - Fax 2100" (США).

Для визначення поліморфізму rs420297 гену CLC-10 проводили виділення геномної ДНК з периферичної крові обстежуваних за допомогою набору «ДНК-экспресс-кровь» (ООО НПФ «Литех», Россия). Визначення поліморфізму генів TLR2 (rs5743708) та TLR 4 (rs4986790) проведено методом полімеразної ланцюгової реакції [1].

Тип алелей (C\T) гену CLC-10 ампліфікували за допомогою алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції в 35 мкл реакційної суміши, що містила: 2,5 мкл 10 х Buf для ампліфікації; 2 мМ хлориду магнію; 0,2 мМ кожного dNTP; 2,5 од. ДНК-полімерази Tag з додаванням по 5 пкмоль специфічних праймерів: CLC_up 5'-CCC AGC AAC CAT GCT TCT TGT TAC-3'; CLC_low 5'-TGA GCA AAC CCA CCT-3' та по 5 пкмоль специфічних зондів мічених флуоресцентними барвниками FAM і R6G з 5'- кінця і BHQ-1, BHQ-2 з 3'-кінця, відповідно:

CLC_wt (FAM)CG-CTG-GAG-GAA-CAG-GAA-AA(BHQ-1);

CLC_m (R6G)CG-CTG-GAG-GAA-CAA-GAA-AAA(BHQ-2)

До суміші додавали 20-50 нг геномної ДНК обстежуваних. Ампліфікацію гену галектину-10 проводили на ампліфікаторі детектуючому ДТ-322 (ООО „НПО ДНК-Технология", Россия) в режимі реального часу, наступним чином:

– перший цикл - $95^0$C/3 хвилини;

– 40 циклів - $95^0$C/15 секунд;

$63^0$C/40 секунд

Продукти ампліфікації гену CLC-10 ідентифікували за допомогою флуорисцентної реєстрації накопичення ДНК за каналами флюоресценції: для «дикої» алелі (wt): 1 канал – барвник FAM, для мутантної алелі (m): 2 – канал барвник R6G, безпосередньо в ході реакції.

Групу контролю становили 95 практично здорових осіб з бази генетичних зразків НДІ Генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «УМСА». В групу контролю для вивчення поліморфізму гену CLC-10 відібрано 45 зразків ДНК осіб, що не страждали на алергічну патологію. Дослідження проводили відповідно наданої письмової згоди на проведення обстеження та заключення комісії з етичних питань та біоетики Української медичної стоматологічної академії.

Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc). Порівняння частот генотипів між досліджуваними групами проводили шляхом аналізу таблиць спряженості за допомогою точного тесту Фішера. Для порівняння частот алелей використовували критерій $\chi^2$. 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 їх обговорення

При вивченні сімейного алергологічного анамнезу у хворих на АР виявлені різноманітні прояви алергії в сім'ї у 76%. Наявність алергічних захворювань у родичів I-II ступеню спорідненості з боку матері виявлена в 35%, з боку батька – у 30%, з боку обох батьків - у 11% усіх обстежених хворих на АР. Не виявлено даних про обтяжений алергологічний анамнез у 24% хворих на АР. Отримані результати узгоджуються з даними, що свідчать про переважний зв'язок з атопічними захворюваннями з боку матері [2].

Як вище зазначалося, у результаті спостереження за перебігом захворювання в динаміці у хворих на АР було встановлено ступені тяжкості АР: легкий перебіг – у 11 (25%), середньо-важкий – у 32 (71%), важкий – у 2 (4%). Також виявлена наявність спадкової алергічної схильності у родичів I-II ступеня спорідненості з боку матері виявлена в 35%, з боку батька – у 30%, з боку обох батьків - у 11% усіх обстежених хворих на АР. У 44% перебіг АР був пов'язаний з різними нозологічними формами алергічної патології. У 20% обстежених хворих на АР був установлений супутній діагноз БА, у 15% присутня симптоматика АД, повна

тріада атопії виявлена у 11% обстежених нами хворих на АР. При алергологічному обстеженні хворих на АР у 89% пацієнтів були виявлені позитивні шкірні проби на пилкові, грибкові, побутові, епідермальні та харчові алергени. При чому, у 7% мала місце сенсибілізація до однієї групи алергену, у 29% - до двох груп, у 36% - до трьох груп, у 13% - до чотирьох груп, а в 4% - до всіх п'яти груп алергенів. У 11% хворих шкірні проби були негативними до всіх використаних алергенів.

Для з'ясування можливого поєднання різних генотипів всіх генів, що визначаються проведено аналіз гаплотипів. Виявлено, що найчастіше зустрічається гаплотип GGAACC, як в групі контролю (30%), так і у хворих на АР (23%) (табл.1).

*Таблиця 1.*

*Розподіл частот гаплотипів поліморфізму TLR 2, TLR 4 та гену галектину-10 серед осіб полтавської популяції та хворих на алергічний риніт, %(n)*

| CLC10<br>TLR 4<br>TLR 2 | GG AA CC | **GA** AA CC | **AA** AA CC | GG AA **CT** | **GA** AA CT | **AA** AA **CT** | GG AA **TT** | **GA** AA **TT** | **AA** AA **TT** | GG **AG** CC | GA AG CC | **AA AG** CC | GG **AG CT** | GA AG CT | AA AG CT | GG **AG TT** | **GA AG** TT | **AA AG TT** | GG **GG** CC | **GA GG** CC | **AA GG** CC | GG **GG CT** | **GA GG CT** | **AA GG CT** | GG **GG** TT | **GA GG TT** | **AA GG TT** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Група контролю (n=45) | 66,7 (30) | 4,4 (2) | 0 | 17,8 (8) | 2,2 (1) | 0 | 2,2 (1) | 0 | 0 | 4,4 (2) | 0 | 0 | 2,2 (1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Хворі на АР (n=45) | 51,1 (23) | 2,2 (1) | 0 | 20,0 (9) | 0 | 0 | 11,1 (5) | 4,4 (2) | 0 | 4,4 (2) | 0 | 0 | 4,4 (2) | 0 | 0 | 2,2 (1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CLC10 | CT/TT носії алелі Т | | | $\chi^2$ = 2,45; ВШ = 2,26 (0,92-5,56); p = 0,118 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TLR 4 896A/G | AG/GG носії алелі G | | | $\chi^2$ = 0,49; ВШ = 2,15 (0,50-9,21); p = 0,482 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TLR 2 2258G/A | GA/AA носії алелі А | | | $\chi^2$ = 0,18; ВШ = 1,00 (0,19-5,24); p = 0,673 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

При порівнянні частот гаплотипів визначених поліморфізмів генів TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 ( rs420297) у групах хворих на АР та популяційного контролю не виявлено достовірної залежності між наявністю у генотипі алеля Т гену галектину -10, алеля А гену TLR 2 або алеля G гену TLR 4 та розвитком АР.

Однак при вивченні сімейного алергологічного анамнезу у даної групи хворих на АР виявлені різноманітні прояви алергії в сім'ї у 100%. У результаті спостереження за перебігом захворювання в динаміці у хворих було встановлено ступені тяжкості АР (середньо-тяжкий – у 89%, легкий перебіг – у 11%) та визначені клінічні форми АР ( цілорічний (або персистуючий) – 100%). При алергологічному у 100% пацієнтів були виявлені позитивні шкірні проби на пилкові, грибкові, побутові, епідермальні та харчові алергени.

Аналіз клінічного перебігу захворювання у даних хворих показав наявність супутньої патології: часті ГРВІ, що відзначались тривалим перебігом та ускладненнями з боку бронхо-легеневої системи (бронхіти, пневмонії) – у 83%; полипозний риносинусит – 67%; гастродуоденіти – 50%.

При аналізі імунологічних показників серед носіїв гаплотипів виявлена різниця на рівні статистичної тенденції (p≤ 0,06) за показником $CD4^+/25^+/Foxp3^+$ у носіїв гаплотипів з мутантним алелем.

Для кращого вивчення та розуміння генетичної схильності до виникнення АР обґрунтованим є вивчення поширеності можливого поєднання генотипів генів TLR 4 та CLC10 (табл.2).

*Таблиця 2.*

*Розподіл частот гаплотипів поліморфізму TLR 4 та гену галектину-10 серед осіб полтавської популяції та хворих на алергічний риніт, %(n)*

| CLC 10<br>TLR4 | | AA CC | AA CT | AA TT | AG CC | AG CT | AG TT | GG CC | GG CT | GG TT |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Група контролю (n=45) | | 66,7 (30) | 17,8 (8) | 2,2 (1) | 4,4 (2) | 2,2 (1) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Хворі на АР (n=45) | | 53,3 (24) | 20 (9) | 13,3 (6) | 4,4 (2) | 4,4 (2) | 4,4 (2) | 0 | 0 | 0 |
| (CLC10)<br>( TLR 4) | CT/TT,<br>AG/GG | $\chi^2$ = 0,26; ВШ = 3,14 (0,31-31,42); p = 0,609 | | | | | | | | |

Виявлено, що найчастіше зустрічається гаплотип ААСС, як в групі контролю (30%), так і у хворих на АР (24%). При порівнянні частот гаплотипів визначених поліморфізмів генів TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 (rs420297) у групах хворих на АР та популяційного контролю не виявлено достовірної залежності між наявністю у генотипі алеля Т гену галектину -10 та алеля G гену TLR 4 з розвитком АР.

Для більш детальної оцінки стану клітинного та гуморального імунітету у хворих на АР залежно від гаплотипів поліморфізмів TLR4 та CLC-10 були оцінені показники імунограм хворих на АР з гаплотипом TLR4/CLC 10 (табл.3) в порівняні з показниками обстежених хворих на АР, що не є носіями зазначених гаплотипів.

Як зазначалося раніше, порушення рівноваги Т1\Т2-хелперів з переважанням Т-2 імунної відповіді відіграє провідну роль в розвитку АР. У відповідь на вплив алергенів у хворих на АР відбувається вивільнення Т2-цитокінів та індукується активація еозинофілів, опасистих клітин та підвищений синтез Ig E. Існують відомості, зазначені реакції відбуваються опосередковано через TLR4. Галектин-10 безпосередньо не приймає участі в пригніченні функції CD25□ $T_{reg}$ клітин, однак є необхідним для здійснення регуляторної активності $T_{reg}$ клітин [8]. Були оцінені показники імунограм хворих на АР з гаплотипом TLR4/CLC 10 (табл.3) в порівняні з показниками обстежених хворих на АР, що не є носіями визначених гаплотипів.

*Таблиця 3*

*Імунологічні показники у хворих на АР залежно від гаплотипів поліморфізмів TLR4 та CLC 10*

| Показник | Показники практично здорових осіб | Хворі на АР з гаплотипом AG/(CT+TT), (n=4) | Хворі на АР, з гаплотипом AA+AG/CC+TT+CT (n=41) |
|---|---|---|---|
| Лейкоцити, $10^9$/л | 4,0 - 8,8 | 4,72 ± 0,60 | 5,69 ± 0,33 |
| Лімфоцити, % | 18 – 40 | 28,75 ± 3,75 | 28,73 ± 1,19 |
| Еозинофіли, % | 0 - 5 | 6,25 ± 1,03 | 4,10 ± 0,45 |
| Загальний IgE, МОд/мл | 0 – 130 | 206,78 ± 5,08 | 197,41 ± 12,53 |
| $CD4^+$, % | 39 ± 5 | 41,68 ± 3,14 | 40,43 ± 1,30 |
| $CD4^+/CD25^+$,% | 9,4 ± 2,05 | 13,83 ± 2,87 | 17,21 ± 2,10 |
| $CD4^+CD25^+Foxp3^+$,% (тис/мкл) | 5-10% від $CD4^+$ | 6,29 ± 0,50 | 4,5 ± 0,40 |
| ІЛ-10, пг/мл | 0- 50 пг/мл | 0,34 ± 0,02 | 0,36 ± 0,02 |
| ІЛ-4,пг/мл | 0-20пг/мл | 55,9 ± 11,33 | 49,84 ± 3,80 |

При дослідженні показників периферичної крові хворих на АР носіїв зазначених гаплотипів виявлено, що рівень лейкоцитів в середньому склав 4,72 ± 0,60*$10^9$/л, тобто не виходив за межі показників практично здорових осіб (4,0 - 8,8*$10^9$/л). Відносна кількість лімфоцитів у середньому склала 28,75 ± 3,75%, що також не виходить за межі показників практично здорових осіб (18 – 40%); виявлена помірна еозинофілія зі збільшенням відносної кількості еозинофілів, що в середньому склала 6,25 ± 1,03%. За результатами обстеження хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4 CLC 10 в імунологічних показниках рівень експресії молекул $CD4^+$ у хворих на АР мав тенденцію до збільшення, та в середньому склав 41,68 ± 3,14% при показниках практично здорових людей 39±5%; рівень експресії $CD4^+/CD25^+$ становив 13,83 ± 2,87%, що перевищує показники здорових людей (9,4 ± 2,05%). Показник рівню експресії молекул $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ мав тенденцію до збільшення (в середньому склав 6,29 ± 0,50%). При визначенні рівню загального IgE в середньому концентрація в групі хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4 CLC 10 становила 206,78 ± 5,08 МО/мл при показниках у практично здорових осіб 0 – 130 МО/мл.

Уміст у сироватці ІЛ-10 у хворих на АР у середньому склав 0,34 ± 0,02 пг/мл, що не перевищує показники практично здорових людей 0- 50 пг/мл; відзначається збільшення вмісту ІЛ-4 у сироватці та становив 55,9 ± 11,33 пг/мл при показниках у практично здорових осіб 0 – 20 пг/мл.

З метою виявлення відмінностей за імунологічними показниками у хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4 CLC 10 було проведене порівняння відповідних груп з використанням критерію Манна-Уітні (таб.4).

*Таблиця 4*

*Відмінності за імунологічними показниками у хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4 CLC 10*

| Показник | Хворі на АР з гаплотипом TLR4 CLC 10 , (n=4) | Хворі на АР, (n=41) |
|---|---|---|
| $CD4^+CD25^+Foxp3^+$,% (тис/мкл) | 6,29 ± 0,50 | 4,5 ± 0,40 |
| U, p | $U_{(n=4;n=41)}$ = 25,50; p=0,024 | |

*U, p - відмінності між групами за критерієм Манна- Уітні.*

При з'ясуванні залежності рівня експресії молекул $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ у хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4 CLC 10 відмічено, що в зазначеній групі показник був статистично значимо вищий (критерій Манна-Уітні $U_{(n=4;n=41)}$ = 25,50; p=0,024) та склав 6,29 ± 0,50% (тис/мкл).

Отримані результати дозволяють розглядати ОНП генів TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 ( rs420297), як додатковий прогностичний показник при патогенетичних дослідженнях.

## Висновки

1. При порівнянні частот гаплотипів визначених поліморфізмів генів TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) та CLC-10 ( rs420297) у групах хворих на АР та популяційного контролю не виявлено достовірної залежності між наявністю у генотипі алеля Т гену галектину -10, алеля А гену TLR 2 або алеля G гену TLR 4 та розвитком АР.

2. При вивченні поширеності можливого поєднання генотипів генів TLR 4 (rs4986790) та CLC10 ( rs420297) ) виявлено, що найчастіше зустрічається гаплотип ААСС, як в групі контролю (30%), так і у хворих на АР (24%), у групах хворих на АР та популяційного контролю не виявлено достовірної залежності між наявністю у генотипі алеля Т гену галектину -10 та алеля G гену TLR 4 з розвитком АР.

3. У хворих на АР носіїв гаплотипів TLR4/ CLC 10, які містять поліморфні алелі G та Т виявлено достовірно вищий рівень експресії молекул $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Трег клітин (критерій Манна-Уітні $U_{(n=4;n=41)}$ = 25,50; p=0,024),що склав 6,29 ± 0,50% (тис/мкл) із зниженням вмісту IL-10 та підвищенням IL-4 (55,9 ± 11,33 пг/мл).

## Література


1. 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 и генетика 2011; № 4: 29-35.
2. Охотникова Е.Н. Аллергический «марш»: связь поколений и эскалация аллергии у детей (лекция) // Современ. педиатрия. - 2008. - №4(21). - С.190-197.
3. Bryborn M., Hallden C., Sall T., Cardell L. O. CLC-a novel susceptibility gene for allergic rhinitis?//Allergy.-2010.-65(2).-P.220-228
4. Ciprandi G., Cirillo I., Pistorio A. Impact of allergic rhinitis on asthma: effects on spirometric parameters // Allergy.-2007.- P.18-20.
5. Han D., She W., Zhang L. Association of the CD14 gene polymorphism C-159 T with allergic rhinitis\\ Am I Phinol Allergy.- 2010. -24(I). – P.1-3
6. Identification of polymorphisms in the Toll-like receptor gene and the association with allergic rhinitis |\\Eur Arch Otorhinolaryngol.- 2010.-267 (3).-P.385-389
7. Kang I., An X.H., Oh Y.K. et al. Identification of polymorphisms in the RNA se 3 gene and the association with al-

lergic rhinitis // Eur Arch Otorhinolaryngol.-2010.-267(3).-P.391-5
8. Kubach I.,Lutter P., Bopp T.,et al. Human CD4 CD25 regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin -10 as a novel marker essential for their anergi and suppressive function // Blood.- 2007.-110(5).-p.1550-1558
9. Mou Z, Shi J, Tan Y. Et al. Association between TIM-1 gene polymorphisms and allergic rhinitis in a Han Chinese population \\ J Invest Allergol Clin Immunol.-2010.–20(1).-P.3-8.

# English version: PREVALENCE OF HAPLOTYPES OF POLYMORPHIC GENES TLR 2, TLR 4, CLC-10 AND THEIR ASSOCIATION WITH SOME IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN PATIENTS WITH ALLERGIC RHINITIS*

*Sakevych V. D.*

State Higher School of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava

*To determine the role of specific polymorphisms of genes that control the structural and regulatory elements nonspecific resistance of the organism in the development of allergic rhinitis prevalence determined polymorphism 2258G / A gene TLR2 (rs5743708), TLR 4 gene (rs4986790) and CLC- 10 gene (rs420297) in the group surveillance and population control group , the analysis of immunological parameters and clinical manifestations in patients with polymorphic variants studied genes. To clarify a possible combination of different genotypes of all genes that define haplotype analyzes . When comparing the frequencies of haplotypes defined by polymorphisms of genes TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) and CLC-10 (rs420297) in patients with AR and population control were found reliable relationship between the presence of T allele genotype halektynu -10 gene, allele A gene TLR 2 or TLR gene allele G 4 and the development of RA. In the study of the prevalence of possible combinations of genotypes TLR 4 gene (Asp299Gly) and CLC10 (rs420297)) found that the most common haplotype AASS as in the control group (30% ) and in patients with AR ( 24%) in patients with AR and population control were found reliable relationship between the presence of T allele genotype halektynu -10 gene and allele G TLR 4 gene with the development of RA. In patients with AR haplotype carriers TLR4 / CLC 10 containing polymorphic alleles G and T were found significantly higher levels of expression of molecules CD4 CD25 Foxp3 MPER cells ( Mann- Whitney U (n = 4 ; n = 41 ) = 25,50; p = 0.024 ), which was 6,29 ± 0,50% ( thousands / ml ) of reducing the amount of IL -10 and IL -4 increase (55,9 ± 11,33 pg / ml). The results obtained can be considered gene TLR 4 SNPs (rs4986790) and CLC-10 (rs420297), as an additional prognostic indicator in pathogenetic studies.*

Keywords: polymorphism, Toll-like receptors, halektyn-10 , allergic rhinitis.

## Introduction

There is a tendency to a rapid spread of allergic diseases in the world, which become a serious issue because of the widespread, annual growth of widespread disease, frequent complications, as well as a sharp decline in performance and quality of life of patients.

AR is seen as a major problem of allergology , since the disease in most cases is the first clinical manifestation of atopy , followed by transformation of bronchial asthma (BA ) [4 ].

The study of the genetic basis of atopy is a key issue, which is necessary to establish the relationship between hereditary and environmental factors in the implementation of very complex pathological phenotype and understanding the mechanisms of interaction polygenic systems in the implementation of genetic information at the level of the whole organism . Knowing the molecular and cellular mechanisms of disease, we may identify genes, whose protein products are the most significant. According to studies , the genes of atopy and associated states are concentrated mainly in the 10 areas of the human genome .

According to studies , there are data about the association of allergic rhinitis with gene polymorphisms TIM-1 [9], SD14 [5], TLR 2-4 [6], RNA se 3 [7].

Specificity of the innate immune system is realized through family Toll- like receptors (TLRs). Important structural and molecular elements of the pattern - distinctive receptor (SPR) is a Toll- like receptor 2 (TLR 2) and Toll- like receptor 4 (TLR4). The genes encoding TLR2 and TLR4 show high variability in the population [1]. Recently the information has appeared about the identification of functional polymorphisms of genes TLR, due to the replacement of single nucleotides (from Eng. Single nucleotide polymorphism - SNP). As a result of these substitutions there is a reduction of ability to recognize appropriate ligands and efficiency of signal pulses, which leads to disruption of the activation of immune cells. A functional polymorphism of TLR 2-4 gives the regulation of innate immune response that is essential imbalance T1/T2-helpers. Similar mechanism may play a crucial role in the formation of chronic inflammation and has attracted attention as a potential risk factor for the development of atopic diseases, including AR [6].

In studies of foreign scientists the association of allergic rhinitis with gene polymorphisms halektyn -10 (CLC-

* *To cite this English version: Sakevych V. D. Prevalence of haplotypes of polymorphic genes TLR 2, TLR 4, CLC-10 and their association with some immunological parameters in patients with allergic rhinitis - / / Problemy ekologii ta medytsyny. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 20 -23.*

10) is studied [3]. Halektyn -10 is representative of a family of endogenous lectins (known as lizofosfolipaza , protein Charcot - Leyden) , found in eosinophils and basophils. Exact studies have shown a significant intracellular expression of halektynu -10 to SD25+ Treg cells. In this connection, it does not participate directly in the suppression SD25+ Treg cells, but the specific blockade of halektyn -10 restores proliferative capacity SD25+ Treg cells and enhances their suppressive function. So halektyn -10 is necessary for the regulatory activity of Treg cells [8].

To determine the role of specific polymorphisms of genes that controls the structural and regulatory elements nonspecific resistance of the organism in the development of allergic rhinitis prevalence determined polymorphism 2258G / A gene TLR2 (rs5743708), TLR 4 gene (rs4986790) and CLC-10 gene (rs420297) in the group surveillance and population control group, the analysis of immunological parameters and clinical manifestations in patients with polymorphic variants studied genes.

**Materials and methods.**

To address the challenges put forward were examined 45 patients with AR aged 19 to 65 years (35,6 ± 1,57) (men accounted for 51 % (23 patients) , and women - 49% (22 patients )). At the time of the survey , patients were in clinical remission stage and stopped receiving allergy medications 72 hours , the patients had severe comorbidity.

Diagnosis is established based on the AR diagnostic criteria ARIA (2008) diagnostic algorithm adopted in Ukraine and approved by the Ministry of Health of Ukraine. Quality of life of patients was determined using generally recognized questionnaires (Adult Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire).

Sensitization to allergens diagnosed on the basis of complex allergy diagnostic testing: collection allergic history, a positive skin scarificating test to allergens using standard sets (of "Immunologist ', Vinnitsa, Ukraine).

According to the standard procedure was conducted to determine the number of white blood cells in the blood and counting of blood cells in smears. Lymphocyte phenotype was analyzed in venous blood using monoclonal antibodies to CD4, SD25 (production of "sorbent", Russia) and intracellular protein Foxp3 («Bioscience», USA) by flow tsytoflyuorymetriyi by flow tsytoflyuorymetra EPIX LX-MCL (Beckman Coulter, USA) using a program called System II TM software.

The levels of total IgE, interleukin-4 (IL-4) and interleukin-10 (IL-10) were determined using ELISA test kits (of "Ukrmed Don", Ukraine) using ELISA analyzer "Stat - Fax 2100" (USA).

To determine gene polymorphism rs420297 CLC-10 conducted the selection of genomic DNA from peripheral blood of examined using a set of "DNA Express-blood" (OOO NPF «Lyteh", Russia). Determination of gene polymorphism TLR2 (rs5743708) and TLR 4 (rs4986790) conducted by polymerase chain reaction [1].

Type allele (C \ T) CLC-10 gene was amplified using allele-specific polymerase chain reaction in 35 ml reaction mixture contained: 2.5 ml 10 x Buf for amplification, and 2 mM magnesium chloride, 0.2 mM of each dNTP , 2.5 units. Tag DNA polymerase with the addition of 5 pkmol specific primers: CLC_up 5'-CCC AGC AAC CAT GCT TCT TGT TAC-3 '; CLC_low 5'-TGA GCA AAC CCA CCT-3' and 5 pkmol specific probes labeled with fluorescent dyes FAM and R6G from the 5 'end and BHQ-1, BHQ-2 from the 3' end, respectively:

CLC_wt (FAM) CG-CTG-GAG-GAA-CAG-GAA-AA (BHQ-1);

CLC_m (R6G) CG-CTG-GAG-GAA-CAA-GAA-AAA (BHQ-2)

Genomic DNA of examined of 20-50 ng was added to the mixture. Gene amplification halektynu-10 was performed on Thermocyclers detecting DT-322 (OOO "NPO DNA-technology", Russia) in real time, as follows:

- First cycle – 95°C / 3 minutes;
- 40 cycles – 95°C/15 seconds;
  63°C/40 seconds

Products gene amplification CLC-10 were identified using fluorescent registration accumulation of DNA fluorescence channels: for the "wild" allele (wt): 1 channel - dye FAM, for the mutant allele (m): 2 - channel dye R6G, directly in the reaction.

The control group was consisted of 95 healthy individuals from a database of genetic samples SRI Genetic and immunological bases of pathology and pharmacogenetics VDNZU "UMSA." In the control group for the study of gene polymorphism SLC-10 were selected 45 DNA samples of persons not suffering from allergic diseases. The study was conducted in accordance with provided written consent to the inspection and conclusion of the Commission on ethical issues and bioethics Ukrainian Medical Dental Academy.

Mathematical analysis of the data was carried out using the program «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc). Comparison of genotype frequencies between the study groups was performed by analysis of contingency tables using Fisher's exact test. To compare allele frequencies used criterion $\chi 2$. To assess the reliability of differences between groups using Fisher's exact two-sided test (for small groups). For all types of analysis considered differences statistically significant at $p < 0.05$.

**Results and discussion.**

In the study of family allergic history in patients with AR were found various manifestations of allergy in the family in 76%. The presence of allergic diseases in relatives and II degree relatives of the mother was found in 35% of the father - in 30% of both parents - 11% of all patients examined in AR. There were no data on the burdened history of allergy in 24% of patients with RA. The results are consistent with data indicating preferential relationship with atopic diseases of the mother [2].

As noted above , as a result of observation of the dynamics of the disease in patients with AR were installed AR severity: mild course - in 11 (25%) , medium -heavy - in 32 (71%), heavy - in 2 (4%). Also was revealed the presence of genetic predisposition to allergic relatives and II degree relatives of the mother was found in 35% of the father - in 30% of both parents - 11% of all patients examined in AR. In 44% of the course AR has been associated with various nosological forms of allergic disease. In 20% of the patients on concomitant AR was established diagnosis of asthma, 15% present symptoms of AD, the full triad of atopy was found in 11% of patients surveyed by us in AR. With Allergic examination of patients with AR in 89% of patients were found positive skin

tests to pollen, fungal, household, epidermal and food allergens. Moreover, 7% occurred sensitization to one allergen group, 29% - to two groups, 36% - up to three groups, 13% - to the four groups, and 4% - of all five groups of allergens. In 11 % of patients had negative skin tests to all allergens used .

To clarify a possible combination of different genotypes of all genes that define haplotypes were analyzed. We found that the most common haplotype GGAASS as in the control group (30%) and in patients with AR (23%) (Table 1).

*Table 1.*

*The distribution of haplotype frequencies polymorphism TLR 2, TLR 4 and halektynu-10 gene among Poltava population and patients with allergic rhinitis,% (n)*

| CLC10<br>TLR 4<br>TLR 2 | GG AA CC | **GA** AA CC | **AA** AA CC | GG AA **CT** | **GA** AA CT | **AA** AA **CT** | GG AA **TT** | **GA** AA **TT** | **AA** AA **TT** | GG **AG** CC | GA AG CC | **AA AG** CC | GG **AG CT** | GA AG CT | AA AG CT | GG **AG TT** | **GA AG** TT | **AA AG TT** | GG **GG** CC | **GA GG** CC | **AA GG** CC | GG **GG CT** | **GA GG CT** | **AA GG CT** | GG **GG** TT | **GA GG TT** | **AA GG TT** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Group control (n=45) | 66,7 (30) | 4,4 (2) | 0 | 17,8 (8) | 2,2 (1) | 0 | 2,2 (1) | 0 | 0 | 4,4 (2) | 0 | 0 | 2,2 (1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Patients in AR (n=45) | 51,1 (23) | 2,2 (1) | 0 | 20,0 (9) | 0 | 0 | 11,1 (5) | 4,4 (2) | 0 | 4,4 (2) | 0 | 0 | 4,4 (2) | 0 | 0 | 2,2 (1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CLC10 | CT/TT allele carriers T | | | $\chi^2$ = 2,45; ВШ = 2,26 (0,92-5,56); p = 0,118 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TLR 4 896A/G | AG/GG allele carriers G | | | $\chi^2$ = 0,49; ВШ = 2,15 (0,50-9,21); p = 0,482 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TLR 2 2258G/A | GA/AA allele carriers A | | | $\chi^2$ = 0,18; ВШ = 1,00 (0,19-5,24); p = 0,673 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

In comparison of the frequencies of haplotypes defined by polymorphisms of genes TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) and CLC-10 (rs420297) in patients with AR and population control were found reliable relationship between the presence of T allele genotype halektynu -10 gene, allele A gene TLR 2 or TLR gene allele G 4 and the development of RA.

However, the study of family allergic history in this group of patients with AR found various manifestations of allergy in the family in 100%. As a result of observation of the dynamics of the disease in patients was found severity of AR (medium-difficult - 89%, mild course - 11%) according to the clinical form of AR (year-round (or persistent) - 100%). When Allergic to 100% of patients were found positive skin tests to pollen, fungal, household, epidermal and food allergens.

Analysis of the clinical course of disease in these patients showed the presence of comorbidity: frequent SARS that were more prolonged course and complications of the bronchopulmonary system (bronchitis, pneumonia) - 83%; polypous rhinosinusitis - 67% gastroduodenitises - 50%.

In the analysis of immunological parameters including carrier haplotypes revealed a difference in the level of statistical trend ($p \leq 0,06$) in terms of CD4 / 25 / Foxp3 in carriers of the mutant allele haplotypes.

In order to better study and understanding of genetic predisposition to the emergence of AR reasonable is to study the prevalence of possible combinations of genotypes 4 and TLR genes CLC10 (Table 2).

*Table 2.*

*Frequency distribution of haplotypes 4 and TLR polymorphisms halektynu-10 gene among Poltava population and patients with allergic rhinitis,% (n)*

| CLC 10<br>TLR4 | | AA CC | AA CT | AA TT | AG CC | AG CT | AG TT | GG CC | GG CT | GG TT |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Group control (n=45) | | 66,7 (30) | 17,8 (8) | 2,2 (1) | 4,4 (2) | 2,2 (1) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Patients in AR (n=45) | | 53,3 (24) | 20 (9) | 13,3 (6) | 4,4 (2) | 4,4 (2) | 4,4 (2) | 0 | 0 | 0 |
| (CLC10) ( TLR 4) | CT/TT, AG/GG | $\chi^2$ = 0,26; ВШ = 3,14 (0,31-31,42); p = 0,609 | | | | | | | | |

We found that the most common haplotype AASS as in the control group (30%) and in patients with AR (24%). When comparing the frequencies of haplotypes defined by polymorphisms of genes TLR 4 (rs4986790) and CLC-10 (rs420297) in patients with AR and population control were found reliable relationship between the presence of T allele genotype halektynu -10 gene and allele G TLR 4 gene with the development of RA.

For a more detailed assessment of cellular and humoral immunity in patients with AR depending on TLR4 polymorphisms and haplotypes CLC 10 immunological parameters were evaluated in patients with AR haplotype TLR4 CLC 10 (Table 3) in comparison with those of the patients in the AR that are not carriers of these haplotypes.

As noted earlier, the imbalance T1\T2 -helper cells with a predominance of T-2 immune response plays a major role in the development of RA. In response to exposure to allergens in patients with AR is the release of T2- induced cytokines and activation of eosinophils, mast cells and increased synthesis of IgE. There is information of mentioned reactions that occur indirectly via TLR4. Halektyn -10 does not directly take part in the suppression SD25+ Treg cells, but is necessary for the regulatory activity of Treg cells [ 8]. Immunological parameters were evaluated in patients with AR haplotype TLR4/CLC 10 (Table 3) in comparison with those of the patients in the AR which is not specified haplotype carriers .

*Table 3.*
*Immunological parameters in patients with AR depending on TLR4 polymorphisms and haplotypes CLC 10*

| Index | Indicators of healthy individuals | Patients with AR haplotypes AG/(CT+TT), (n=4) | Patients with RA, with haplotype AA+AG/CC+TT+CT (n=41) |
|---|---|---|---|
| L, $10^9$/л | 4,0 - 8,8 | 4,72 ± 0,60 | 5,69 ± 0,33 |
| Lymphocytes, % | 18 – 40 | 28,75 ± 3,75 | 28,73 ± 1,19 |
| Eosinophils, % | 0 - 5 | 6,25 ± 1,03 | 4,10 ± 0,45 |
| Total IgE, IU / ml | 0 – 130 | 206,78 ± 5,08 | 197,41 ± 12,53 |
| $CD4^+$, % | 39 ± 5 | 41,68 ± 3,14 | 40,43 ± 1,30 |
| $CD4^+/CD25^+$,% | 9,4 ± 2,05 | 13,83 ± 2,87 | 17,21 ± 2,10 |
| $CD4^+CD25^+Foxp3^+$,% | 5-10% від $CD4^+$ | 6,29 ± 0,50 | 4,5 ± 0,40 |
| IL-10, pg / ml | 0- 50 пг/мл | 0,34 ± 0,02 | 0,36 ± 0,02 |
| IL-4, pg / ml | 0-20пг/мл | 55,9 ± 11,33 | 49,84 ± 3,80 |

In the study of peripheral blood of patients with AR carriers listed haplotypes was revealed that the level of white blood cells averaged 4,72 ± 0,60 * 109 / L , that did not go beyond the parameters of healthy individuals (4.0 - 8.8 * 109 / l). The relative number of lymphocytes in the average of 28,75 ± 3,75%, which is also not beyond the parameters of healthy individuals (18 - 40%) revealed mild eosinophilia with an increase in the relative number of eosinophils that averaged 6,25 ± 1, 03 %. According to a survey of patients with AR haplotype carriers TLR4 CLC 10 immunological parameters in the expression of CD4 molecules in patients with AR had a tendency to increase, and the average was 41,68 ± 3,14% in terms of healthy subjects 39 ± 5% level expression of CD4 / CD25 was 13,83 ± 2,87%, higher than that of healthy people (9,4 ± 2,05%). Indicator of the level of expression of CD4 CD25 Foxp3 molecules tended to increase ( on average was 6,29 ± 0,50%). In determining the level of total IgE in the average concentration in patients with AR haplotype carriers TLR4 CLC 10 was 206,78 ± 5,08 IU / ml at performance in healthy persons 0 - 130 IU / ml.

The content of serum IL-10 in patients with AR is averaged 0,34 ± 0,02 pg / ml, which is not higher than in healthy people 0 - 50 pg / ml; marked increase in the content of IL-4 and serum was 55, 9 ± 11,33 pg / ml at performance in healthy persons 0 - 20 pg / ml.

In order to detect differences in immunological parameters in patients with AR haplotype carriers TLR4 CLC 10 compared the respective groups using the Mann-Whitney (tab.4).

*Tab.4*
*Differences in immunological parameters in patients with AR haplotype carriers TLR4 CLC 10*

| Index | Patients with AR haplotypes TLR4 CLC 10 , (n=4) | Patients with RA, (n=41) |
|---|---|---|
| $CD4^+CD25^+Foxp3^+$,% | 6,29 ± 0,50 | 4,5 ± 0,40 |
| U, p | $U_{(n=4;n=41)}$ = 25,50; p=0,024 | |

*U, p - differences between groups by Mann-Whitney.*

In clarifying the dependence of the level of expression of CD4 CD25 Foxp3 molecules in patients with AR Media TLR4 CLC 10 haplotypes observed in this group rate was statistically significantly higher (Mann-Whitney U (n = 4; n = 41) = 25.50; p = 0,024) and was 6,29 ± 0,50% (thousands / ml).

The results can considered gene TLR 4 SNPs (rs4986790) and CLC-10 (rs420297), as an additional prognostic indicator in pathogenetic studies.

## Conclusions

1. When comparing the frequencies of haplotypes defined by polymorphisms of genes TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) and CLC-10 (rs420297) in patients with AR and population control were found reliable relationship between the presence of T allele genotype halektynu -10 gene, allele A gene TLR 2 or TLR gene allele G 4 and the development of RA.

2. In the study of the prevalence of possible combinations of genotypes TLR 4 gene (rs4986790) and CLC10 (rs420297)) was found that the most common haplotype AASS as in the control group (30%) and in patients with AR (24%) in patients with AR and population control were found reliable relationship between the presence of T allele genotype halektynu -10 gene and allele G TLR 4 gene with the development of RA.

3. In patients with AR haplotype carriers TLR4 / CLC-10 containing polymorphic alleles G and T were found significantly higher levels of expression of molecules CD4 CD25 Foxp3 MPER cells (Mann-Whitney U (n = 4; n = 41) = 25,50; p = 0.024), which was 6,29 ± 0,50% (thousands / ml) of reducing the amount of IL-10 and IL-4 increase (55,9 ± 11,33 pg / ml).

## References


1. Izmailova O.V. How polymorphisms TLR2 and TLR4 gene with susceptibility to certain urogenital infections. / O. Izmailov, AA Shlykova, NA Beaver [and others].. / / Cytology and Genetics 2011; № 4: 29-35.
2. Ohotnikova EN Allergic "march": the link between generations and the escalation of allergies in children (lecture) / / modern. pediatrics. - 2008. - № 4 (21). - P.190-197.
3. Bryborn M., Hallden C., Sall T., Cardell L. O. CLC-a novel susceptibility gene for allergic rhinitis?//Allergy.-2010.-65(2).-P.220-228
4. Ciprandi G., Cirillo I., Pistorio A. Impact of allergic rhinitis on asthma: effects on spirometric parameters // Allergy.-2007.- P.18-20.
5. Han D., She W., Zhang L. Association of the CD14 gene polymorphism C-159 T with allergic rhinitis\\ Am I Phinol Allergy.- 2010. -24(I). – P.1-3
6. Identification of polymorphisms in the Toll-like receptor gene and the association with allergic rhinitis |\\Eur Arch Otorhinolaryngol.- 2010.-267 (3).-P.385-389
7. Kang I., An X.H., Oh Y.K. et al. Identification of polymorphisms in the RNA se 3 gene and the association with allergic rhinitis // Eur Arch Otorhinolaryngol.-2010.-267(3).-P.391-5
8. Kubach I.,Lutter P., Bopp T.,et al. Human CD4 CD25 regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin -10 as a novel marker essential for their anergi and suppressive function // Blood.- 2007.-110(5).-p.1550-1558
9. Mou Z, Shi J, Tan Y. Et al. Association between TIM-1 gene polymorphisms and allergic rhinitis in a Han Chinese population \\ J Invest Allergol Clin Immunol.-2010.–20(1).-P.3-8.


*Матеріал надійшов до редакції 3.12.2013*