

© Сакевич В. Д., Шликова О. А., Кайдашев І. П.
УДК 616.5-002.2.:575

ОСОБЛИВОСТІ ІМУННОГО СТАТУСУ ХВОРИХ НА АЛЕРГІЧНИЙ РИНИТ У ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ TLR 2,4 ТА ГАЛЕКТИНУ-10*

Сакевич В. Д., Шликова О. А., Кайдашев І. П.

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

В исследовании приведены теоретическое обобщение и новое решение научной задачи иммунологии и аллергологии по определению генетической детерминированности при аллергическом рините путем исследования роли толл-подобных рецепторов врожденного иммунитета с полиморфизмом TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) и CLC-10 (rs420297). В обследованных больных АР в 76% случаев имеет наследственную природу преимущественно со стороны матери (36%), начинается преимущественно в детском и подростковом возрасте (88%) и в 44% сопровождается другой аллергической патологией. При исследовании иммунного статуса больных АР у 15% больных наблюдали умеренную и высокую эозинофилию, повышение среднего уровня общего иммуноглобулина E, высокие значения которого достоверно были установлены у больных со средне-тяжелой формой течения ($p = 0,0008$), рост относительного количества $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ Трег клеток со снижением содержания IL-10 и повышением IL-4. Выявлена достоверная разница между частотами генотипов в группах контроля и больных АР за полиморфизмом гена TLR 4 (Asp299Gly). Впервые исследованы популяционную распространенность полиморфизма rs420297 гена галектину-10 среди лиц, проживающих в Полтавской области (CC-76%; CT-22%; TT-2%) Обнаружена достоверная разница между частотами генотипов в группах контроля и больных АР ($p = 0,04$), полиморфизм rs420297 гена CLC-10 достоверно чаще встречается в группе больных АР. Выявлена достоверная ассоциация между наличием полиморфной аллели гена CLC-10 и уровнями $CD4^+$, $CD4^+ CD25^+$, в группе гомозиготных носителей полиморфной аллели T и аллеля C гена CLC-10 установлена достоверная ассоциация между наличием полиморфной аллели гена CLC-10 и уровнями $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$, $CD4^+$.

Ключевые слова: аллергический ринит, состояние клеточного и гуморального иммунитета полиморфизм, Toll-подобные рецепторы, галектин-10.

Алергічні захворювання, зокрема, такі поширені, як бронхіальна астма, алергічний риніт, atopічний дерматит з кожним роком стають все більш актуальною та серйозною проблемою [Kumar A., Yhosh B., 2009]. Алергічний риніт (АР) – це захворювання, що характеризується IgE-опосередкованим імунологічним запаленням, що розвивається в результаті попадання алергенів на слизову оболонку носа [Van Cauwenberge P.B. et al., 2001].

У даний час визнана точка зору, згідно з якою АР є мультифакторним захворюванням (МФЗ). Сьогодні поширеною концепцією є наслідування алергічних захворювань та визначена досить велика кількість генів, що опосередковує їх маніфестацію. Однак результати численних досліджень суперечливі: молекулярно-генетичні основи формування захворювання поки вивчені недостатньо. Все це перетворює АР в серйозну медико-соціальну проблему і диктує необхідність дослідження причин і імунологічних механізмів розвитку даного захворювання для розробки адекватних лікувально-профілактичних заходів, що враховують етнічну приналежність, імунологічну реактивність і генетичні особливості хворих.

Метою дослідження було визначення ролі поліморфізмів генів, що контролюють структурні та регуляторні елементи неспецифічної резистентності організму (толл-подібних рецепторів: 2258G/A гену TLR2 (rs5743708), 896A/G гену TLR4 (rs4986790) та гену галектину-10 (rs420297 C/T)) у патогенезі АР, для по-

глиблення знань про імунологічні механізми розвитку цього захворювання.

Матеріали та методи дослідження.

Для вирішення висунутих завдань проведено обстеження 45 пацієнтів віком від 19 до 65 років хворих на АР, на стадії клінічної ремісії захворювання, які перебували на диспансерному обліку в поліклінічному відділенні четвертої міської клінічної лікарні та алергологічному відділенні Полтавської обласної клінічної лікарні ім.Скляфосовського. Групу порівняння склали 95 практично здорових осіб з банку ДНК Науково-дослідного інституту генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія», які були анкетовані та клінічно обстежені для виключення алергічних захворювань.

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 загальноновизнаних опитувальників (Adult Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire). Алергологічне обстеження проводилося за загальноприйнятою методикою шляхом постановки шкірних ріск-тестів (ТОВ «Імунолог», Вінниця, Україна).

Отримання периферичної крові пацієнтів здійснювали шляхом забору крові з кубітальної вени натще-серце одноразовим пластиковим шприцом в об'ємі 1

* Цитування при атестації кадрів: Сакевич В. Д., Шликова О. А., Кайдашев І. П. Особливості імунного статусу хворих на алергічний риніт у залежності від поліморфізму генів TLR 2,4 та галектину-10 // Проблеми екології і медицини. – 2014. – Т. 18, № 3-4. – С. 34 – 39.

мл у стерильну суху скляну пробірку з гепарином (25 ОД/мл) для отримання суспензії мононуклеарних клітин периферичної крові; в об'ємі 4 мл у вакуумну пробірку з ЕДТА (8,4 мг К3ЕДТА) для виділення ДНК; та в об'ємі 5 мл у стерильну суху скляну пробірку без додавання антикоагулянтів для отримання сироватки.

Отримання суспензії мононуклеарних клітин периферичної крові здійснювали шляхом центрифугування в градієнті щільності фікол-верографіну (1,077 г/мл). Сироватку виділяли з периферичної крові, зібраної натщесерце у стерильну суху скляну пробірку без додавання антикоагулянтів, шляхом інкубування та центрифугування [Беркало Л.В. та ін., 2003]. Виділення геномної ДНК проводили методом фенол-хлороформної екстракції [Епринцев А.Т. и др. 2008]. Визначення поліморфізмів толл-подібних рецепторів: 2258G/A гену TLR2, 896A/G гену TLR4 проведено методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Ампліфікацію проводили за допомогою ампліфікатора «Терцик» («ДНК-Технологія», Москва) за відповідною програмою з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів із наступним рестрикційним аналізом [Змайлова О.В. та ін., 2011]. Детекція продуктів ампліфікації проведена за допомогою електрофорезу в 3% агарозному гелі («Helikon», Москва) в 1 x TBE (50 мМ трис-Н₃ВО₃ та 2 мМ ЕДТА, рН 8.0) з подальшою візуалізацією результатів у УФ-світлі та фотографуванням.

Для визначення поліморфізму генів проводили виділення геномної ДНК з периферичної крові обстежуваних за допомогою набору «ДНК-експрес-кровь» (ООО НПФ «Литех», Росія), ампліфікували за допомогою алей-специфічної полімеразної ланцюгової реакції в 35 мкл реакційної суміші з додаванням по 5 пкмоль специфічних праймерів. Продукти ампліфікації гену галектину-10 ідентифікували за допомогою флуорисцентної реєстрації накопичення ДНК за каналами флуоресценції.

Фенотип лімфоцитів аналізували за допомогою визначення рівнів експресії поверхневих антигенів клітин CD4, CD25 та внутрішньоклітинного білка Foxp3⁺ методом проточної цитофлуориметрії («EPICS XL-MCL» («Beckman Coulter», США) за стандартною методикою, використовуючи відповідні моноклональні антитіла (виробництво «Сорбент», Росія; «eBioscience», США).

З метою визначення стану гуморальної ланки імунітету хворих на АР визначали рівень загального IgE в сироватці крові визначали за принципом двосайтового (сендвіч) імуноферментного аналізу за допомогою тест-системи ІФА для кількісного визначення загального IgE (ТОВ «Укрмед-Дон», Україна). Кількісне визначення інтерлейкіну-4 та інтерлейкіну – 10 у хворих на АР проводили за допомогою тест-системи ІФА для кількісного визначення інтерлейкіну – 4 та інтерлейкіну – 10 ТОВ «Укрмед-Дон» (Україна) згідно інструкцій до наборів. Оптичну густину досліджуваних зразків визначали на імуноферментному аналізаторі «Stat-Fax 2100» (USA) при довжині хвилі 450 нм.

Статистичну обробку отриманих результатів провели за допомогою статистичного пакету STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., USA) згідно з рекомендаціями. 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 використову-

вали точний двосторонній критерій Фішера (для малих груп). Для усіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення.

Вивчення обстежуваних 45 хворих на АР віком від 19 до 65 років (серед яких жінки склали 49%, а чоловіки 51%) показало, що в залежності від періодичності впливу алергену, характеру перебігу та частоти симптомів у 27% (12 хворих) виявлений цілорічний (або персистуючий) АР та у 73% (33 хворих) сезонний (або інтермітуючий) АР. Ступінь тяжкості захворювання оцінювався на основі загальноприйнятих критеріїв діагностики ARIA (2008) [Brozek J.L. et al., 2008] з урахуванням анамнестичних показників, тяжкості клінічних проявів, їх впливу на загальний стан та якість життя (працездатність, навчання, відпочинок, денну активність, сон та ін.), частоти застосування лікарських засобів та їх ефективності. На основі цього встановили легкий перебіг – у 11 (25%), середньо-важкий – у 32 (71%), важкий – у 2 (4%) обстежених хворих на АР. Ускладнений АР виявлений у 32% обстежених хворих. Серед них найбільш поширеними виявились: риносинусит полипозний-18%, середній отит-9%, дисфункція евстахієвих труб та ларингіт – 6%.

Анамнестично встановлено, що розвиток захворювання пов'язаний із впливом алергенів на організм переважно в дитячому віці – 56% (25 хворих), а також в підлітковому та молодому відповідно – 32% (14 хворих) та 12% (6 хворих), що зумовлено особливостями імунної системи в дитячому віці [Дранник Г.Н., 2010]. 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, що узгоджується з науковими даними щодо переважного зв'язку з алергічними захворюваннями з боку матері [Охотникова Е.Н., 2008].

При алергологічному обстеженні хворих на АР у 89% пацієнтів були виявлені позитивні шкірні проби на пилокві, грибокві, побутові, епідермальні та харчові алергени, при чому у 7% мала місце сенсibiliзація 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.

Концепція наслідування АР, що реалізується дисфункцією імунної системи, доведена клінічними спостереженнями та в наш час не викликає сумнівів [Охотникова Е.Н., 2008]. У патогенезі АР зазвичай провідними розглядають IgE-опосередковані імунні реакції [Дранник Г.Н., 2010]. Результати численних досліджень спонукали учених до пошуку нових концепцій імунопатогенезу АР. Відкриття Т-регуляторних (T_{reg}) клітин визначає шлях до розуміння механізмів периферичної толерантності та індукції T_H1-та T_H2 – опосередкованих імунних реакцій, дисбаланс яких супроводжує розвиток АР. Відомо, що важливим є не стільки співвідношення T_H1 > T_H2, скільки активація відповідних Т-регуляторів імунної відповіді [Титова Н.Д., 2009]. Крім того, вважається доведеним, що лише на ранніх стадіях формування АР домінує T_H1 вплив, а пізніше дисбаланс T_H1/T_H2 визначається на користь T_H2. Слід зазначити, що в більшості випадків чхання, свербіж у носі, ринорея, закладеність носа були сильніше виражені саме в пізню фазу алергічної реакції 1 типу, де провідну роль відіграють T_H2 [Lityakova L.I. et al., 2001].

Досліджені показники периферичної крові та показники імунного статусу хворих на АР в стадії ремісії (рівень лейкоцитів, відносна кількість лімфоцитів, від-

носна кількість еозинофілів) в цілому відповідали нормальним показникам практично здорових осіб (табл.1) [Литвинов А.В., 2007].

Таблиця 1
Імунологічні показники обстежених хворих на АР

Показник	Показники практично здорових осіб	Показники хворих на АР, n=45
Загальний ІgЕ, МОд/мл	0 – 130	198,2 ± 11,42
CD4 ⁺ , %	39 ± 5	40,5 ± 1,02
CD4 ⁺ /CD25 ⁺ %,	9,4 ± 2,05	16,5 ± 1,9 (0,25)
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ , %	5-10% від CD4 ⁺	4,66 ± 0,38
ІЛ-10, пг/мл	0-50 пг/мл	0,35 ± 0,016
ІЛ-4, пг/мл	0-20 пг/мл	50,34 ± 3,58

Однак у 15% пацієнтів виявлена еозинофілія зі збільшенням абсолютної та відносної кількості еозинофілів. При визначенні рівня загального ІgЕ у 76% пацієнтів відзначається достовірне підвищення показників, рівень загального ІgЕ становив 198,2 ± 11,42 МО/мл, що підтверджує провідну роль ІgЕ-опосередкованих імунних реакцій при atopії [Johansson S.G.O et al., 2001; Kaidashev I.P., 2009].

Слід зазначити зростання відносної кількості CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Трег клітин у порівнянні з показниками практично здорових людей, що узгоджується з результатами сучасних досліджень [Bellinghausen I. et al., 2003; Schmidt-Weber C.V. et al., 2005]. Отримані дані підтверджують концепцію, що імунна відповідь на алергени у здорових осіб та хворих на алергію є результатом співвідношення між алергенспецифічними Трег клітинами та Th2 клітинами [Bellinghausen I. et al., 2003; Takahashi T. et al., 2000].

Виявлені порушення цитокинової регуляції у обстежених хворих на АР, а саме підвищення вмісту ІЛ-4 (84%) – що підсилює виживання еозинофілів. В середньому показник складав 50,34 ± 3,58 пг/мл, що в 2,5 рази перевищує значення показників здорових осіб.

Важливими складовими клітинної імунної відповіді є Трег клітини, що регулюють функцію Т-хелперів та Т-цитотоксичних клітин, забезпечуючи спрямованість Th1/Th2 типів імунної відповіді. Дослідження останніх років вказують на існування індукційних ІЛ-10-продукуючих Трег клітин [Фрейдлин І.С., 2005; Березная Н.М., 2013]. За нашими даними рівень супресорного цитокіна ІЛ-10 у хворих на АР у середньому склав 0,35 ± 0,016 пг/мл.

Згідно з сучасними дослідженнями, гени atopії та пов'язаних з нею станів сконцентровано в основному у 10 ділянках геному людини [Carroll W., 2005]. Існують відомості щодо асоціації алергічного риніту із поліморфізмом гену TIM-1 [Mou Z. et al., 2010], CD14 [Han D et al., 2010], TLR 2-4 [Kang I. et al., 2010], RNase 3 [Kang I. et al., 2010].

З метою визначення ролі поліморфізму окремих генів, які контролюють структурні та регуляторні елементи неспецифічної резистентності організму, в розвитку алергічного риніту, визначена розповсюдженість поліморфізму 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. Шляхом молекулярно-генетичного дослідження серед хворих на АР було виділено носіїв поліморфних алелей та проведено аналіз розподілу генотипів за досліджуваними поліморфізмами.

В осіб, що входили до групи контролю, частота генотипу TLR2 GG становила 97,8%; частота гетерозиготного генотипу GA – 2,2%, поліморфний генотип AA не був виявлений. У групі хворих на АР відповідні результати були такими: GG – 93,3%, GA – 6,6% та AA також не був виявлений. Не виявлено достовірного зв'язку між частотою появи поліморфної алелі А в групі контролю та хворих на АР ($\chi^2 = 0,74$; $p = 0,34$). Отримані результати відсутності асоціації поліморфізму 2258G/A гену TLR2 з АР узгоджуються з іншими науковими даними [Modrzynski M., 2007].

При дослідженні поліморфізму гену rs4986790 TLR4 в групі контролю частота поліморфного генотипу AA становила 95,6%, гетерозиготного генотипу AG – 4,5%, поліморфний генотип GG не виявлений. У хворих на АР відповідно: AA – 92,3%, AG – 7,7% та GG – не виявлений. Достовірно значно вищою виявилася різниця між частотами генотипів у групах контролю та хворих на АР ($p = 0,03$). Частота поліморфної алелі G в групі хворих на АР склала 7,7% ($\chi^2 = 3,58$; $p = 0,06$) у порівнянні з групою контролю, виявлена різниця на рівні статистичної тенденції [Davila I. et al., 2009].

Функціональний поліморфізм гену TLR4 полягає в заміні аспарагінової кислоти на гліцинову Asp299Gly1187 (rs4986790) [Montes A.H. et al., 2006]. У результаті знижується здатність TLR4 до розпізнавання відповідних лігандів або до проведення внутрішньоклітинних сигналів, що призводить до менш вираженої активації клітин імунної системи після зустрічі з патогеном. [Schnare M. et al., 2006; Байракова О.Л. и др., 2008]. Функціональний поліморфізм TLR4 порушує регуляцію вродженої імунної відповіді, що є основним чинником дисбалансу T1/T2-хелперів [Симбирцев А.С., 2005]. Подібний механізм відіграє вирішальну роль у формуванні хронічного запального процесу та привертає увагу як потенційний чинник ризику розвитку atopічної патології, зокрема АР [Kang I. et al., 2010].

При дослідженні поліморфізму rs420297 C/T гену CLC-10 у групі контролю частота генотипу CC становила 75,56%, гетерозиготного генотипу CT – 22,22%, генотип TT – 2,22%. У хворих на АР відповідно: CC – 57,78%, CT – 24,44% та TT – 17,78%.

Виявлена достовірна різниця між частотами генотипів у групах контролю та хворих на АР ($p = 0,04$). Достовірно значно вищою виявилася різниця за частотою поліморфної алелі Т в групі хворих на АР-30% ($\chi^2 = 6,42$; $p = 0,011$), у порівнянні з групою контролю. У дослідженнях закордонних учених вивченню асоціації алергічного риніту із поліморфізмом гену галектину-10 (CLC-10) останнім часом приділяється особлива увага [Bryborn M. et al., 2010].

Генетичні маркери можуть визначати схильність до захворювання або бути асоційованими з відповідними патогенетично значущими показниками. Тому в межах запропонованого дослідження було вивчено вплив поліморфізму гену TLR2 (rs5743708), гену TLR 4 (Asp299Gly) та гену CLC-10 (rs420297) на перебіг та особливості клінічних проявів АР. Під час аналізу відмінності за частотою виявлення цілорічної та сезонної форми перебігу між групами хворих на АР залежно від генотипів поліморфізму 2258G/A гену TLR2 та гену TLR 4 (Asp299Gly) не мали статистичної значущості.

Слід зазначити наявність вірогідних відмінностей між групами залежно від генотипів поліморфізму гену TLR4 Asp 299 Gly за наявності супутніх алергічних захворювань. Достовірно, що частіше у цих хворих на АР виявляли супутню БА (p=0,0003), супутній АД (0,0031) та БА у поєднанні з АД (p=0,0005). Вірогідні відмінності між групами залежно від генотипів поліморфізму rs420297 C/T гену галектину-10 були виявлені за клінічними формами АР. Достовірно, що частіше у хворих на АР з поліморфною алеллю галектину-10 виявляли цілорічну форму АР (p=0,0001).

Як зазначалося раніше, порушення рівноваги T_H1/T_H2-хелперів з переважанням Th-2 імунної відповіді відіграє провідну роль в розвитку АР. У відповідь на вплив алергенів у хворих на АР відбувається вивіль-

нення Th2-цитокінів та індукується активація еозинофілів, опасистих клітин та підвищений синтез IgE. Існують відомості, що зазначені реакції відбуваються опосередковано через TLR2,4 [Крючко Т.О. та ін., 2011; Ahmad-Nejad P. et al., 2004]. Відомо також, що галектин-10 є необхідним для здійснення регуляторної активності T_{reg} клітин [Kubach I. et al., 2007].

З метою виявлення відмінностей між хворими на АР залежно від досліджуваних поліморфізмів гену імунологічними показниками було проведено порівняння відповідних груп з використанням критерію Манна-Уїтні.

Виявлена достовірна різниця між групами хворих на АР з наявністю алелі А гену TLR2 та гомозиготними носіями алелі G за показником CD4⁺ (U_(n=42;n= 3) = 12,00; p=0,020).

Виявлена достовірна різниця між групами хворих на АР з наявністю поліморфної алелі Т гену CLC-10 та гомозиготними носіями алелі С за показником CD4⁺ (U_(n=26;n= 9) = 139,50; p=0,014). Слід зазначити, що рівень експресії молекул CD4⁺ у хворих на АР з алеллю Т гену галектину-10 в середньому мав тенденцію до збільшення, а у хворих на АР носіїв алелі С не виходив за межі показників практично здорових осіб (табл.2).

Таблиця 2
Відмінності за імунологічними показниками хворих на АР залежно від генотипів поліморфізму гену галектину-10

Показник	Хворі на АР з генотипами СТ+ТТ, (n=19)	Хворі на АР з генотипом СС, (n=26)
CD4 ⁺ , %	44,14±1,92	37,92±1,37
U, p	U _(n=26;n= 19) = 139,50; p=0,014	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	11,09±1,32	21,16±2,96
U, p	U _(n=26;n= 19) = 136,00; p=0,012	
Загальний IgE, МОд/мл	234,86±12,46	171,48±15,74
U, p	U _(n=26;n= 19) = 138,50; p=0,013	
ІЛ-4, пг/мл	61,61±5,30	42,11± 4,22
U, p	U _(n=26;n= 19) = 123,00; p=0,004	
ІЛ-10, пг/мл	0,303±0,11	0,394±0,024
U, p	U _(n=26;n= 19) = 136,50; p=0,011	

U, p відмінності між групами за критерієм Манна-Уїтні

Також група хворих на АР з алеллю Т гену CLC-10 достовірно відрізнялась за вищим значенням рівня CD4⁺CD25⁺ (U_(n=26;n= 9) = 136,00; p=0,012) від групи хворих на АР гомозиготних носіїв алелі С. Отже, галектин-10 є необхідним для здійснення регуляторної активності T_{reg} клітин.

При порівнянні показників загального IgE у груп хворих залежно від генотипів поліморфізму гену CLC-10 достовірно були встановлені вищі значення рівню IgE у хворих на АР з алеллю Т гену CLC-10 (U_(n=26;n= 9) =138,50; p=0,013) який становив 234,86±12,46 МО/мл.

Виявлені порушення цитокінової регуляції з достовірним підвищенням показників ІЛ-4, що підсилює живання еозинофілів. Між групами хворих залежно від поліморфізму гену CLC-10 встановлені достовірно вищі значення показників ІЛ-4 у хворих на АР з алеллю Т гену CLC-10 (U_(n=26;n= 9) =123,00; p=0,004), рівень якого становив 61,61±5,30 пг/мл.

Рівень супресорного цитокіна ІЛ-10 у хворих на АР у середньому склав 0,35 ± 0,016 пг/мл. Це може бути пов'язаним з різними формами АР, коли у хворих з

хронічною формою процесу рівень концентрації ІЛ-10 може значно знижуватись порівняно з показниками гострої стадії захворювання (може пояснюватися збільшенням концентрації у сироватці цитокінів Тх-1 профілю) або залишатись підвищеним відповідно до показників норми [Дранник Г.Н., 2010]. Між групами хворих залежно від поліморфізму гену галектину-10 була виявлена різниця за показниками рівню ІЛ10; вищі значення якого достовірно були встановлені у хворих на АР гомозиготних носіїв алелі С (U_(n=26;n= 9) =136,50; p=0,038) та склали 0,394±0,024 пг/мл.

Виявлена достовірна різниця між групами хворих на АР гомозиготними носіями алелі Т гену CLC-10 та гомозиготними носіями алелі С за показником CD4⁺ (U_(n=26;n= 19) = 37,00; p=0,006). Також група хворих на АР гомозиготних носіїв алелі Т гену CLC-10 достовірно відрізнялась за вищим значенням рівня CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺% (U_(n=26;n=8) = 52,50; p=0,037) від групи хворих на АР гомозиготних носіїв алелі гену CLC-10 (табл. 3).

Таблиця 3
Відмінності за імунологічними показниками хворих на АР залежно від генотипів поліморфізму гену галектину-10 гомозиготних носіїв

Показник	Хворі на АР з генотипом ТТ гену галектину-10, (n=8)	Хворі на АР з генотипом СС гену галектину-10, (n=26)
----------	---	--

CD4 ⁺ , %	46,96±2,30	37,91± 1,37
U, p	U _(n=8;n=26) = 37,00; p=0,006	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ , % (тис/мкл)	6,61±1,54	4,08± 0,35
U, p	U _(n=8;n=26) = 52,50; p=0,037	

U, p – відмінності між групами за критерієм Манна-Уїтні.

Отримані результати підтверджують, що, незважаючи на значну внутріклітинну експресію галектину-10 в CD25⁺ T_{reg} клітинах, він безпосередньо не бере 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 [Kubach I. et al., 2007].

Отже, виявлені в результаті дослідження зміни і взаємозв'язки клініко-імунологічних показників у хворих на АР носіїв поліморфних алелей генів TLR2, TLR4, CLC-10 дозволяють припустити важливе значення зазначених поліморфізмів у визначенні перебігу АР, наявності супутньої патології, полівалентної алергії у хворих на АР та реалізації імунних механізмів у патогенезі захворювання.

Висновки

1. В обстежених хворих АР у 76% випадків має спадкову природу переважно з боку матері (36%), розпочинається переважно в дитячому і підлітковому віці (88%) і в 44% супроводжується іншою алергічною патологією. Визначені клінічні форми АР-у 27% цілорічний та у 73% сезонний, за ступенем тяжкості виявили: легкий – у 32%, середньотяжкий – у 62%, тяжкий – у 6% перебіг захворювання. При алергологічному обстеженні у 89% хворих на АР виявили позитивні шкірні проби на побутові, епідермальні, пилкові, харчові та грибкові алергени. У 82% хворих виявлена полівалентна сенсibiliзація до двох і більше груп алергенів.

2. При дослідженні імунного статусу хворих АР у 15% хворих спостерігали еозинofilію, підвищення середнього рівня загального імуноглобуліну Е, зростання відносної кількості CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T_{reg} клітин із зниженням вмісту IL-10 та підвищенням IL-4.

3. У групі хворих на АР встановлена розповсюдженість поліморфізму гену TLR2 (rs5743708): генотип GG становив 93,3%, генотип GA – 6,6%, генотип AA не зустрічався. Виявлена достовірна різниця між групами хворих на АР з наявністю поліморфної алелі гену TLR2 та гомозиготними носіями алелю G за показником CD4⁺ (U_(n=42;n=3) = 12,00; p=0,020).

4. У групі хворих на АР встановлена розповсюдженість поліморфізму гену TLR4 (Asp299Gly): генотип AA становив 92,3%, генотип AG – 7,7%, генотип GG не зустрічався. Виявлена достовірна різниця між частотами генотипів у групах контролю та хворих на АР (p = 0,03). У хворих на АР носіїв алелю G за поліморфізмом 896A/G гену TLR4 виявлена atopічна патологія: супутня БА (p=0,0003), супутній АД (0,0031) та БА у поєднанні з АД (p=0,0005).

5. Розповсюдженість поліморфізму rs420297 гену галектину-10 серед осіб, що проживають в Полтавській області складає СС-76%; СТ-22%; ТТ-2%. Виявлена достовірна різниця між частотами генотипів у групах контролю та хворих на АР (p = 0,04), поліморфізм rs420297 гену CLC-10 достовірно частіше зустрічається в групі хворих на АР. Виявлена достовірна різниця за частотою алелю Т CLC-10 в групі хворих на АР-

30%, у порівнянні з групою контролю-13% ($\chi^2 = 6,42$; p = 0,011). Розвиток та перебіг алергічного риніту асоційований з поліморфізмом rs420297 гену CLC-10 (достовірно частіше у хворих на АР з мутантною алеллю CLC-10 виявляли цілорічну форму АР (p=0,0001)).

6. Виявлена достовірна асоціація між наявністю поліморфної алелі гену CLC-10 та рівнями CD4⁺ (p=0,014), CD4⁺CD25⁺ (p=0,012), в групі гомозиготних носіїв поліморфної алелі Т та алелі С гену CLC-10, встановлена достовірна асоціація між наявністю поліморфної алелі гену CLC-10 та рівнями CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (p=0,037), CD4⁺ (p=0,014). Встановлено, що особи які несуть поліморфну алель гену CLC-10 мають достовірно вищі рівні IgE (p=0,013) та IL-4 (p=0,004) та нижчий рівень IL10 (p=0,038).

Література.

1. Van Cauwenberge P.B., Ciprandi G., Vermeiren J.S.J. Epidemiology of Allergic Rhinitis. - The UCB Institute of allergy, 2001. – 27p
2. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О. та ін.]; під ред. проф. Кайдашева І.П. – Полтава : Полімет, 2003. – 320 с.
3. 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. – P. 29-35.
4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю.Реброва – М.: МедиаСфера, 2002.- 312 с.
5. Brozek J.L., Baena-Cagnani C.E, Bonini S. et al. Methodology for development the Allergic Rhinitis and its Impact of Asthma Guideline 2008 update // Allergy. - 2008.- Vol.63(1).- P.38-46
6. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология / Георгий Николаевич Дранник. – К.: ООО «Полиграф плюс», 2010. – 552 с.
7. Охотникова Е.Н. Аллергический «марш»: связь поколений и эскалация аллергии у детей (лекция) // Современ. педиатрия. - 2008. - №4(21). - С.190-197
8. Титова Н.Д. Значение врожденной системы иммунитета в возникновении аллергических заболеваний.// Иммунология, алергология, инфектология.-2009-(3).- P.32-39.
9. Lityvakova L.I., Baraniuk J.N. Nasal provocation testing: a review. Ann. Allergy Asthma Immunol. – 2001. - Vol. 86. - P. 355-364.
10. Норма в медицинской практике: Справочное пособие / Составит. А.В. Литвинов. – М.: МЕДпресс-информ, 2007. – 144 с.
11. Kaidashev I.P. The allergen-specific IgE reactivity pattern of Ukrainian allergic patients // Проблеми екології та медицини. -2009.- №2-3.- С.8-14
12. Bellinghausen I., Klostermann B., Knop J., Saloga J. HumanCD4⁺CD25⁺ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress Th1 and Th2 cytokine production // J. Allergy Clin. Immunol. – 2003. - Vol. 111. - P. 862-868
13. Фрейдін М.Б., Брагина Е.Ю., Огородова Л.М., Пузырев В.П. Полиморфизм генов глутатионтрансфераз q1 и m1 (GSTT1 и GSTM1) у больных atopической бронхальной астмой в Западно-Сибирском регионе // Молекулярная биология. - 2002. - Т.36. - № 4. - С.630-634.
14. Han D., She W., Zhang L. Association of the CD 14 gene polymorphism C-159 T with allergic rhinitis// Am J Phinol Allergy. – 2010. – 24 (1). – P.1-3
15. Куценко, Н. Л. Полиморфизм Toll-подобного рецептора 2Arg753Gln связан с повышенным уровнем синтеза

- специфических иммуноглобулинов Е у больных аллергическими заболеваниями / Н.Л. Куценко, О. В. Измайлова, Л. Э. Веснина // Аллергология и иммунология. – 2011. –Т.12, №3. – С. 233 – 236.
16. I Dávila, J Mullol, M Ferrer, J Bartra, A del Cuvillo, J Montoro, I Jáuregui, J Sastre, A Valero; Genetic Aspects of Allergic Rhinitis // J Investig Allergol Clin Immunol. – 2009. - Vol. 19., Suppl. 1. – P. 25-31
17. Presymptomatic differences in Toll-like receptor function in infants who have allergy / S.L. Prescott, P. Noakes, B.W.Y. Chow [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2008. – V. 122, № 2. – P. 391–399
18. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin -10 as a novel marker essential for their anergi and suppressive function//Kubach I.,Lutter P., Bopp T. [et al.] //Blood.- 2007.-Vol.110(5).-P.1550-1558

ENGLISH VERSION: FEATURES OF THE IMMUNE STATUS OF PATIENTS WITH ALLERGIC RHINITIS, DEPENDING ON TLR 2,4 AND 10 «GALECTIN» GENE POLYMORPHISM*

Sakevych V. D., Shlykova O.A., Kaidashev I. P.

Research Institute for Genetic and Immunological Bases of Pathology and Pharmacogenetics of Higher State Education Establishment of Ukraine " Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava

The study presented theoretical generalization and a new resolve of scientific task in Immunology and Allergology concerning the definition of genetic determinism in allergic rhinitis by examining the role of Toll-like receptors of innate immunity by polymorphisms TLR2 (rs5743708), TLR 4 (rs4986790) and CLC-10 (rs420297). In examined patients in 76% of cases, AR is predominantly hereditary nature of the mother (36%), mostly begin in childhood and adolescence (88%) and 44% is accompanied by other allergic diseases. In the study of the immune status of patients with AR in 15% of patients one observed moderate and high eosinophilia, increase the average level of total immunoglobulin E, which is significantly higher values have been established in patients with moderate and severe forms of motion (p = 0.0008) increase in the relative number of CD4 CD25 MPER Foxp3 cells with reducing the amount of IL-10 and IL-4 increase. Significant differences between the frequencies of genotypes in the control group and patients with AR gene polymorphism by TLR 4 (Asp299Gly) were found. For the first time the population-based prevalence of polymorphism rs420297 gene «Galectin»u-10 among persons living in Poltava region (SS-76%, ST-22%, TT-2%) revealed significant differences between the frequencies of genotypes in the control group and patients with AR (p = 0.04), rs420297 polymorphism of the gene CLC-10 was significantly more common in patients with RA. Significant association between the presence of polymorphic alleles of the gene CLC-10 levels and CD4⁺, CD4⁺ CD25⁺, in the group of homozygous carriers of polymorphic alleles T and C alleles of the gene CLC-10 were revealed. The authentic association between the presence of polymorphic alleles of the gene CLC-10 levels and CD4+CD25+Foxp3+, CD4+was found.

Keywords: allergic rhinitis, cellular and humoral immunity polymorphism, Toll-like receptors, «Galectin»-10.

Allergic diseases, including asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis every year become more urgent and serious problem. Allergic rhinitis (AR) is a disease characterized by IgE-mediated immunological inflammation that is caused by penetration of allergens on the nasal mucosa [1].

Currently recognized point of view, according to which AR is a multifactorial disease (MFZ). Now prevalent concept is an imitation of allergic diseases and identified quite a number of genes that mediate their demonstration. However, the results of numerous studies are controversial molecular genetic basis of disease formation yet insufficiently studied. This turns the AR into a serious medical and social problem and necessitates the study of the causes and immunological mechanisms of this disease to develop adequate therapeutic and preventive measures, taking into account ethnicity, immunological reactivity and genetic characteristics of patients.

The aim of the study was to determine the role of polymorphisms of genes that control the structural and regulatory elements of nonspecific resistance of the organism (Toll-like receptors: 2258G /A gene TLR2 (rs5743708), 896A / G gene TLR4 (rs4986790) and «Galectin»u-10 gene (rs420297 C / T)) in the pathogenesis of RA, to further the understanding of the immunological mechanisms of this disease.

Materials and methods.

To solve the nominated tasks examined 45 patients aged 19 to 65 patients with AR at the stage of clinical remission who were dispensary in outpatient department of the Fourth City Hospital and Allergic department of Poltava Regional Hospital im.Sklifosovskoho. Comparison group consisted of 95 healthy persons from DNA ofbank Research-Research Institute for Genetic and immunological bases of pathology and pharmacogenetics State Higher School of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", which were surveyed and clinically examined to rule out allergies.

The 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. The quality of life of patients was determined using generally recognized questionnaires (Adult Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire). Allergic survey conducted by the conventional method by setting skin prick-tests (LLC «Immunologist', Vinnitsa, Ukraine).

Getting the peripheral blood of patients was done by sampling blood from the vein kubitalnoyi fasting disposable plastic syringe in a volume of 1 ml in sterile dry glass tube with heparin (25 U / ml) to obtain a suspension of peripheral blood mononuclear cells ; in a volume of 4 ml in a vacuum tube with EDTA (8.4 mg K3EDTA) for DNA

* To cite this English version: Sakevych V. D., Shlykova O.A., Kaidashev I. P. Features of the immune status of patients with allergic rhinitis, depending on the gene polymorphism TLR 2,4 and 10 halektynu // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2014. - Vol 18, № 3-4. - P. 39 -43.

isolation ; and in the volume of 5 ml of sterile dry glass tube without the addition of anticoagulants for serum.

Getting the suspension of peripheral blood with mononuclear cells was carried out by centrifugation in density gradient fikol-verohrafinu (1,077g / ml). Serum was isolated from peripheral blood collected on an empty stomach in a sterile dry glass tube without the addition of anticoagulants by incubation and centrifugation [2]. Bold genomic DNA was performed by phenol-chloroform extraction. Determination of polymorphisms Toll-like receptors: 2258G / A gene TLR2, 896A / G TLR4 gene carried by polymerase chain reaction (PCR). Amplification was performed using Thermocyclers "Tertsyk" ("DNA Technology", Moscow) for the corresponding program using specific oligonucleotide primers followed by restriction analysis [3]. Detection of amplification products carried by electrophoresis in 3% agarose gel («Helikon», Moscow) in 1 x TBE (50 mM Tris-H3BO3 and 2 mM EDTA, pH 8.0), followed by visualization of the results in UV light and taking pictures.

To determine gene polymorphism isolation of genomic DNA from peripheral blood of subjects with a set of "DNA Express-blood" (OOO NPF «Lyteh», Russia), amplified by allele-specific PCR in 35 ml of the reaction mixture with the addition of 5 pkmol specific primers was performed. Products gene amplification «Galectin»u 10 identified using fluorystsentnoyi registration accumulation of DNA fluorescence channels.

The phenotype of lymphocytes was analyzed by determining the expression levels of cell surface antigens CD4, CD25 and intracellular Foxp3 protein by flow tsytoflyuometriyi («EPICS XL-MCL» («Beckman Coulter», USA) by the standard method using the appropriate monoclonal antibody (production of " sorbent " Russia; «eBioscience», USA).

In order to determine the status of humoral immunity of patients with AR serum total IgE vyznachaly in serum were determined on the basis dvosaytovoho (sandwich) ELISA using ELISA test kits for the quantitative determination of total IgE (LLC "Ukrmed Don", Ukraine). Assay interleykinu-4 and interleukin-10 in patients with AR was performed using ELISA test kits for the quantitative determination of interleukin-4 and interleukin-10 of "Ukrmed Don" (Ukraine) according to the instructions sets. Optical density of the samples was determined by enzyme-linked immunosorbent analyzer "Stat-Fax 2100" (USA) at a wavelength of 450 nm.

Statistical analysis of the results conducted by using the statistical package STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., USA) according to the recommendations [4]. 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 χ^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.

The study examined 45 patients with AR aged 19 to 65 years (of which women accounted for 49% and men 51%) showed that, depending on the frequency of allergen exposure, the nature of the course and frequency of symptoms in 27% (12 patients) found year-round (or persistent) AR and 73% (33 patients) seasonal (or intermittent) AR. The severity of disease was assessed on the basis of generally accepted diagnostic criteria ARIA (2008) [5] on the basis of anamnestic indicators of severity of clinical manifestations and their impact on the overall status and quality of life (hard work, education, leisure, daily activities, sleep, etc.), the frequency of use of drugs and their effectiveness. Based on this set easy course-in 11 (25%), medium-heavy-in 32 (71%), heavy-in 2 (4%) patients suffering from RA. Complicated AR detected in 32% of patients. Among the most common were: rhinosinusitis polypoznyy-18%, otitis media-9%, dysfunction of Eustachian tubes and laryngitis-6%.

Medical history revealed that the disease is associated with allergen exposure on the body mainly in childhood-56% (25 patients) and in adolescence and young respectively-32% (14 patients) and 12% (6 patients), due to features of the immune system in children [6]. 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 surveyed patients with RA, which is consistent with the scientific evidence regarding preferential connection with allergic diseases of the mother [7].

When examining patients with AR in 89% of patients were found positive skin tests to pollen, fungal, household, epidermal and food allergens, with 7% occurred sensitization to one allergen group, 29%-to two groups, 36%-up to three groups, 13%-up to four groups, and 4%-to all five groups of allergens.

The concept of inheritance AR implemented dysfunction of the immune system, proven by clinical observations and nowadays there is no doubt [7]. In the pathogenesis of AR is usually considered major IgE-mediated immune responses [6]. Numerous studies have prompted scientists to explore new concepts immunopathogenesis of RA. Opening of T regulatory (Treg) cells determines the path to understanding the mechanisms of peripheral tolerance and the induction of Th1-and Th2-mediated immune responses, an imbalance which accompanies the development of RA. We know that it is important to not only the ratio of Th1 > < Th2, as appropriate activation of T regulatory immune response [8]. In addition, it is considered proven only in the early stages of forming AR dominated Th1 effect and later the imbalance of Th1 / Th2 determined in favor of Th2. It should be noted that in most cases, sneezing, itchy nose, rhinorrhea, nasal zakladennist were more pronounced in late phase of allergic reaction type 1, where the leading role was played by Th2 [9].

Were studied peripheral blood and indicators of immune status of patients with AR in remission (WBC, the relative number of lymphocytes, the relative number of eosinophils) generally answered the normal range of healthy individuals (tabl.1) [10].

Table 1
Immunological parameters examined patients with AR

Index	Indicators of healthy individuals	Performance of patients with AR, n=45
Total IgE, IU / mL	0 – 130	198,2 ± 11,42
CD4 ⁺ ,%	39 ± 5	40,5 ± 1,02
CD4 ⁺ /CD25 ⁺ ,%	9,4 ± 2,05	16,5 ± 1,9 (0,25)
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ ,%	5-10% of the CD4 ⁺	4,66± 0,38
IL-10 pg / ml	0-50 pg / ml	0,35 ± 0,016
IL-4 pg / ml	0-20 pg / ml	50,34 ± 3,58

However, in 15% of patients had eosinophilia with increasing absolute and relative number of eosinophils in determining the level of total IgE in 76% of patients have a significant increase in performance, the level of total IgE was $198,2 \pm 11,42$ IU / ml, which confirms the leading role of IgE-mediated immune responses in atopy [11].

It should be noted increase in the relative number of CD4 CD25 Foxp3 MPER cells compared to healthy people, which is consistent with the results of current research [12]. These data support the concept that the immune response to allergens in healthy individuals and patients with allergies are the result of the ratio between allergenspecific MPER cells and Th2 cells [12].

The identified violations of cytokine regulation in the investigation of patients with RA, namely increasing the content of IL-4 (84%)-which enhances the survival of eosinophils. The average figure was $50,34 \pm 3,58$ pg / ml, which is 2.5 times higher than the values of healthy individuals.

Important components of the cellular immune response is MPER cells that regulate the function of T-helper and T-cytotoxic cells, providing direction Th1 / Th2 type immune response. Recent studies indicate the existence of inducible IL-10-producing cells MPER [13]. According to our data, the level of suppressor cytokine IL-10 in patients with AR averaged $0,35 \pm 0,016$ pg / ml.

According to current research, atopy genes and associated states are concentrated mainly in the 10 areas of the human genome [14]. There are data on the association of allergic rhinitis with gene polymorphism of TIM-1, SD14, TLR 2-4, RNase.

To determine the role of polymorphisms of individual genes that control the structural and regulatory elements of nonspecific resistance of the organism in the development of allergic rhinitis, determined the prevalence of gene polymorphisms TLR2 (rs5743708), TLR 4 gene (rs4986790) and CLC-10 gene (rs420297) in group supervision and group of population control, the analysis of immunological parameters and clinical manifestations in patients with polymorphic variants studied genes. By molecular genetic study among patients with AR were allocated carriers of polymorphic alleles and analyzed the distribution of genotypes for the studied polymorphisms.

In individuals who were part of the control group, the frequency of TLR2 GG genotype was 97.8%; frequency of heterozygous genotype GA-2,2%, polymorphic genotype AA was not detected. In the group of patients with AR corresponding results were as follows: GG-93,3%, GA-6,6% and AA was also not detected. There was no significant association between the frequency of occurrence polymorphic allele A in the control group and patients with AR ($\chi^2 = 0,74$; $p = 0,34$). The results are the lack of association of polymorphism 2258G / A gene TLR2 with AR are consistent with other scientific data [15].

To study the gene polymorphism rs4986790 TLR4 in the control group the frequency of polymorphic genotype AA was 95.6%, heterozygous genotype AG-4,5%, polymorphic genotype GG was not found. In patients with AR, respectively: AA-92,3%, AG-7,7% and GG-not found. Reliably was significantly higher difference between the frequencies of genotypes in the control group and patients with AR ($p = 0,03$). The frequency of polymorphic allele G in the group of patients with AR was 7,7% ($\chi^2 = 3,58$; $p = 0,06$) compared with the control group, the difference was found at the level of a statistical trend [16].

Functional TLR4 gene polymorphism is the replacement of aspartic acid glycine Asp299Gly1187 (rs4986790). As a result of reduced ability to recognize relevant TLR4 ligands or for the intracellular signals, leading to a less pronounced activation of immune cells after meeting with the pathogen..Funktionalnyy TLR4 polymorphism violates the regulation of the innate immune response that is essential imbalance T1 / T2-helper. This mechanism plays a crucial role in the formation of chronic inflammation and attracts attention as a potential risk factor for the development of atopic diseases, including AR [17].

Group, the frequency of CC genotype was 75.56% heterozygous genotype CT-22,22%, genotype TT-2,22%. In patients with AR, respectively: CC-57,78%, CT-24,44% and TT-17,78%.

Revealed significant differences between the frequencies of genotypes in the control group and patients with AR ($p = 0,04$). Reliably was significantly higher difference in frequency polymorphic allele T in a group of patients with AR-30% ($\chi^2 = 6,42$; $p = 0,011$) compared with the control group. In studies of foreign scientists study the association of allergic rhinitis with gene polymorphism «Galectin»u-10 (CLC-10) has recently been given special attention [18].

Genetic markers may determine susceptibility to disease or be associated with the relevant pathogenetic significant figures. Therefore, within the proposed research studied the effect of the gene polymorphism of TLR2 (rs5743708), TLR 4 gene (Asp299Gly) and CLC-10 gene (rs420297) on the course and features of the clinical manifestations of RA. When analyzing the differences in the incidence of seasonal and year-round shape flow between groups of patients with AR depending on genotype polymorphism 2258G / A gene TLR2 and TLR 4 gene (Asp299Gly) had no statistical significance.

Note the presence of possible differences between groups based on genotype polymorphism of the gene TLR4 Asp 299 Gly in the presence of concomitant allergic diseases. Significantly, more commonly in those patients with AR showed concomitant asthma ($p = 0,0003$), concomitant AD (0.0031) and asthma in combination with AD ($p = 0,0005$). Probable differences between groups based on genotype polymorphism rs420297 C / T gene «Galectin»u-10 were detected in the clinical forms of AR. Significantly, more commonly in patients with AR polymorphic allele «Galectin»u-10 showed year-round shape AR ($p = 0,0001$).

As noted earlier, the imbalance T1 \ T2-helper cells with a predominance of Th-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 cytokines and Th2-induced activation of eosinophils, mast cells and increased synthesis of IgE. There is evidence that these reactions occur indirectly through TLR2,4. We also know that «Galectin»-10 is necessary for the regulatory activity of Treg cells.

In order to detect differences between patients with AR, depending on the gene polymorphisms the study of immunological parameters was carried out by comparison of groups using Mann-Whitney.

Significant differences between the groups of patients with AR with the presence of allele A TLR2 gene and homozygous carriers of allele G in terms of CD4 (U (n = 42; n = 3) = 12,00; $p = 0,020$) were found.

Significant differences between the groups of patients with AR with the presence of polymorphic alleles of the T

gene CLC-10 and homozygous carriers of allele C in terms of CD4 (U (n = 26; n = 9) = 139,50; p = 0,014) were revealed. It should be noted that the level of expression of CD4 molecules in patients with AR gene al-

lele T «Galectin»u 10 on average tended to increase, and in patients with AR allele C carriers should not go beyond indicators of healthy individuals (Table 2).

Table 2
Differences in immunological parameters of patients with AR depending on genotype polymorphism of the gene «Galectin»u 10

Index	Patients with genotypes CT AR TT, (n = 19)	Patients with AR genotype CC, (n = 26)
CD4 ⁺ , %	44,14±1,92	37,92±1,37
U, p	U _(n=26;n= 19) = 139,50; p=0,014	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	11,09±1,32	21,16±2,96
U, p	U _(n=26;n= 19) = 136,00; p=0,012	
Total IgE, IU / mL	234,86±12,46	171,48±15,74
U, p	U _(n=26;n= 19) = 138,50; p=0,013	
IL-4 pg / ml	61,61±5,30	42,11± 4,22
U, p	U _(n=26;n= 19) = 123,00; p=0,004	
IL-10 pg / ml	0,303±0,11	0,394±0,024
U, p	U _(n=26;n= 19) = 136,50; p=0,011	

U, p-the differences between the groups on the criterion Manna-Whitney

Also the group of patients with AR with T allele of the gene CLC-10 differed significantly at higher levels of the value CD4 CD25 (U (n = 26; n = 9) = 136,00; p = 0,012) from a group of patients with AR homozygous carriers of allele C. So «Galectin»-10 is necessary for the regulatory activity of Treg cells.

Comparing indicators of total IgE in patients based on genotype polymorphism of the gene CLC-10 was significantly higher values were established IgE levels in patients with AR gene allele T CLC-10 (U (n = 26; n = 9) = 138,50; p = 0,013), which was 234,86 ± 12,46 IU / ml.

Identified violations cytokine regulation with a significant increase in indicators of IL-4, which enhances the survival of eosinophils. Between groups of patients based on gene polymorphisms CLC-10 set significantly higher values of IL-4 in patients with AR gene allele T CLC-10 (U (n = 26; n = 9) = 123,00, p = 0,004), the level of which was 61,61 ± 5,30 pg / ml.

Level suppressor cytokine IL-10 in patients with AR averaged 0,35 ± 0,016 pg / ml. This may be associated with different forms of AR as in patients with a chronic

form of the process of the concentration of IL-10 can significantly decrease performance compared to the acute stage of the disease (may be due to an increase in the concentration of serum cytokine profile of Th-1) or to remain elevated in accordance with indicators norm [6]. Between groups of patients based on gene polymorphisms «Galectin»u-10 was detected difference in performance level of IL10; which was significantly higher values were established in patients with AR homozygous carriers of allele C (U (n = 26 ; n = 9) = 136,50, p = 0,038) and amounted to 0,394 ± 0,024 pg / ml.

Significant differences between the groups of patients with AR homozygous carriers of the T allele of the gene CLC-10 and homozygous carriers of allele C in terms of CD4 (U (n = 26; n = 19) = 37,00; p = 0,006 were revealed. Also the group of patients with AR homozygous carriers of the T allele of the gene CLC-10 differed significantly at higher levels of the value of CD4 CD25 Foxp3% (U (n = 26; n = 8) = 52,50; p = 0,037) from a group of patients with homozygous carriers of AR allele of the gene CLC-10 (Table. 3).

Table 3
Differences in immunological parameters of patients with AR depending on genotype polymorphism of the gene «Galectin»u 10 homozygous carriers

Index	Patients with genotype TT AR gene «Galectin» 10, (n = 8)	Patients with genotype SS AR gene «Galectin» 10, (n = 26)
CD4 ⁺ , %	46,96±2,30	37,91± 1,37
U, p	U _(n=8;n= 26) = 37,00; p=0,006	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ , %	6,61±1,54	4,08± 0,35
U, p	U _(n=8;n= 26) = 52,50; p=0,037	

U, p-the differences between the groups on the criterion Manna-Whitney.

These results confirm that, despite a significant intracellular expression of «Galectin»u-10 in CD25 Treg cells, it is not involved in the suppression CD25 Treg cells, but the specific blockade «Galectin»u-10 restores proliferative capacity of CD25 Treg cells and enhances their suppressive function. So «Galectin»-10 is necessary for the regulatory activity of Treg cells.

Thus, detected changes and the relationship of clinical and immunological parameters in patients with AR and polymorphic alleles of genes TLR2, TLR 4, CLC-10 suggest the importance of these polymorphisms in determining the course of RA, presence of comorbidity, polyvalent allergy in patients AR and implementation of immune mechanisms in the pathogenesis of the disease.

Findings

1. In patients examined AR in 76% of cases there is largely hereditary nature of the mother (36%), which predominantly begins in childhood or adolescence (88%) and 44% is accompanied by other allergic diseases. clinical forms AR-27% year-round and seasonal 73%, severity found: light-32%, 62%-in intermedius, hard-6% of the disease were defined. With Allergic examination in 89% of patients with AR positive skin tests for domestic, epidermal, pollen, food and fungal allergens were revealed. In 82% of patients polyvalent sensitization to two or more groups of allergens was found.

2. In the study of the immune status of patients with AR in 15% of patients one observed eosinophilia, increase in the average level of total immunoglobulin E,

increase the relative number of CD4 CD25 Foxp3 cells MPER of reducing the amount of IL-10 and IL-4 increase.

3. In the group of patients with AR TLR2 (rs5743708): gene polymorphism prevalence was found: GG genotype was 93.3%, genotype GA-6.6%, genotype AA met. Significant differences between the groups of patients with AR with the presence of polymorphic alleles of TLR2 gene and homozygous carriers of allele G in terms of CD4 (U (n = 42; n = 3) = 12,00; p = 0,020) were revealed.

4. In the group of patients with AR TLR 4 (Asp299Gly): gene polymorphism prevalence AA genotype was 92.3%, genotype AG-7.7%, genotype GG was found. Significant differences between the frequencies of genotypes in the control group and patients with AR (p = 0.03) were revealed. In patients with AR allele G carriers for polymorphism 896A / G TLR4 gene atopic lesions concomitant asthma (p = 0.0003), concomitant AD (0.0031) and asthma in combination with AD (p = 0.0005) were revealed..

5. Prevalence gene polymorphism rs420297 «Galectin»-10 among persons living in Poltava Oblast is the SS-76%; ST-22%; TT-2%. Revealed significant differences between the frequencies of genotypes in the control group and patients with AR (p = 0.04) gene polymorphism rs420297 CLC-10 was significantly more common in the group of patients with RA. Revealed significant differences in frequency of T allele CLC-10 in the group of patients with AR-30%, compared with the control group-13% ($\chi^2 = 6,42$; p = 0.011). The development and course of allergic rhinitis is associated with a gene polymorphism rs420297 CLC-10 (significantly more often in patients with AR mutant allele CLC-10 showed year-round shape AR (p = 0.0001)).

6. The significant association between the presence of polymorphic alleles of the gene CLC-10 levels and CD4 (p = 0,014), CD4 CD25 (p = 0,012), the group of homozygous carriers of polymorphic alleles T and C alleles of the gene CLC-10 were observed; significant association between the presence of polymorphic alleles of the gene CLC-10 levels and CD4 CD25 Foxp3 (p=0,037), CD4 (p = 0,014) were determined. It has been established that persons who are polymorphic allele of the gene CLC-10 have significantly higher levels of IgE (p = 0.013) and IL-4 (p = 0.004) and lower levels of IL10 (p = 0.038).

References.

1. Van Cauwenberge P.B., Ciprandi G., Vermeiren J.S.J. Epidemiology of Allergic Rhinitis. - The UCB Institute of allergy, 2001. - 27p
2. Metodi klinichnich ta eksperimental'nych doslidzhen' v medizini / [Berkalo L.V., Bobovich O.V., Bobrova N.O. [ta

- in.]; pid red. prof. Kaydasheva I.P. - Poltava : Polimet, 2003. - 320 s.
3. Izmaylova O.V. Zv'yazok polimorfizmiv geniv TLR2 ta TLR4 zi schil'nisty do okremich urogenital'nych infekciy. / O.V. Izmaylova, O.A. Shlikova, N.O. Bobrova [ta in.]. // Zitologiya i genetika-2011.- № 4. -S. 29-35.
4. Rebrova O.Yu. Statisticheskiy analiz medizinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA / O.Yu.Rebrova - M.: MediaSfera, 2002.- 312s.
5. Brozek J.L., Baena-Cagnani C.E, Bonini S. et al. Methodology for development the Allergic Rhinitis and its Impact of Asthma Guideline 2008 update // Allergy.- 2008.- Vol.63(1).- P.38-46
6. Drannik G.N. Klinicheskaya immunologiya i allerologiya / Georgiy Nikolaevch Drannik. - K.: OOO «Poligraf plus», 2010. - 552 s.
7. Ochotnikova E.N. Allergicheskiy «marsh»: svyaz' pokoleniy i eskalaziya allergii u detey (lekziya) // Sovremen. pediatriya. - 2008. - №4(21). - S.190-197
8. Titova N.D. Znachenie vrozhdynnoy sistemy immuniteta v vznikovenii allergicheskikh zabolovaniy. // Immunologiya, alergologiya, infektologiya.-2009-(3).- S.32-39
9. Lityvakova L.I., Baraniuk J.N. Nasal provocation testing: a review. Ann. Allergy Asthma Immunol. - 2001.- Vol. 86.- P. 355-364.
10. Norma v medizinskoj praktike: Spravochnoe posobie / Sostavit. A.V. Litvinov. - M.: MEDpress-inform, 2007. - 144 s.
11. Kaidashev I.P. The allergen-specific IgE reactivity pattern of Ukrainian allergic patients // Problemi ekologii ta medicini. -2009.- №2-3.- S.8-14
12. Bellinghausen I., Klostermann B., Knop J., Saloga J. HumanCD4⁺CD25⁺ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress Th1 and Th2 cytokine production. J. Allergy Clin. Immunol.- 2003- Vol. 111.-P. 862-868
13. Freydin M.B., Bragina E.Yu., Ogorodova L.M., Pu-zyrev V.P. Polimorfizm genov glutationtransferaz ql i ml (GSTT1 i GSTM1) u bol'nyh atopncheskoj bron-chial'noy astmoy v Zapadno-Sibirskom regione // Mo-lekulyarnaya biologiya. - 2002. - T.36, № 4. - S.630-634.
14. Han D., She W., Zhang L. Association of the CD 14 gene polymorphism C-159 T with allergic rhinitis// Am I Phinol Allergy. - 2010. - 24 (1). - P.1-3
15. Kuzenko, N. L. Polimorfizm Toll-podobnogo receptora 2Arg753Gln svyazan s povyshennym urovnem sinteza specificheskikh immunoglobulinov E u bol'nyh allergicheskimi zabolovaniyami / N.L. Kuzenko, O. V. Izmaylova, L. E. Vesnina // Allergologiya i immunologiya. - 2011. -T.12, №3. - S. 233 - 236.
16. I Dávila, J Mullol, M Ferrer, J Bartra, A del Cuvillo, J Montoro, I Jáuregui, J Sastre, A Valero; Genetic Aspects of Allergic Rhinitis //J Investig Allergol Clin Immunol.- 2009,- Vol. 19, Suppl. 1.P. 25-31
17. Presymptomatic differences in Toll-like receptor function in infants who have allergy / S.L. Prescott, P. Noakes, B.W.Y. Chow [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. - 2008. - V. 122, № 2. - P. 391-399
18. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin -10 as a novel marker essential for their anergi and suppressive function//Kubach I.,Lutter P., Bopp T.[et al.] //Blood.- 2007.-Vol110(5).-P.1550-1558

Матеріал надійшов до редакції 10.09.2014