Здоров'я дитини

Клінічна педіатрія / Clinical Pediatrics

УДК 616.36-003.826-036-053.2-07:575.1 DOI: 10.22141/2224-0551.15.4.2020.208470

Степанов Ю.М., Завгородня Н.Ю., Грабовська О.І., Кленіна І.А., Татарчук О.М.
ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро, Україна

Роль однонуклеотидного поліморфізму *TLR4* у розвитку неалкогольної жирової хвороби печінки в дітей

For citation: Zdorov'e Rebenka. 2020;15(4):205-212. doi: 10.22141/2224-0551.15.4.2020.208470

Резюме. ***Актуальність.*** *Прогресування неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП) від простого стеатозу до стеатогепатиту відбувається в генетично схильних індивідуумів внаслідок порушення імунного гомеостазу й розвитку системної і локальної запальної відповіді. Несинонімічні однонуклеотидні поліморфізми гена TLR4, змінюючи просторову структуру протеїну і, ймовірно, чутливість рецептора до його лігандів, обумовлюють певні функціональні аберації, що можуть впливати на характер й активність запалення.* ***Мета дослідження:*** *вивчити асоціацію SNP Asp299Gly rs4986790 гена TLR4 зі структурними змінами печінки, показниками вродженого імунітету та вуглеводного обміну в дітей із НАЖХП.* ***Матеріали та методи.*** *Під спостереженням перебували 76 дітей із надмірною вагою та ожирінням віком від 9 до 17 років. Наявність стеатозу печінки визначалась за допомогою транзієнтної еластометрії. За наявністю стеатозу печінки діти були розподілені на 2 групи, за наявністю SNP Asp299Gly (rs4986790) гена TLR4 кожна з груп розподілена на 2 підгрупи: діти з нормальним (Asp299Asp) та поліморфним (Asp299Gly) варіантами гена TLR4. Вміст інсуліну, IL-6, IL-10, TNF-α в сироватці крові визначали імуноферментним методом, розраховували індекс HOMA-IR.* ***Результати.*** *Частота виявлення SNP Asp299Gly rs4986790 гена TLR4 у гетерозиготному стані серед обстежених дітей становила 15,8 %, у дітей із НАЖХП — 20,0 %, у дітей без стеатозу — 11,1 % ($p > 0,05$). Значущих відмінностей показників жорсткості та ступеня жирової інфільтрації печінки пацієнтів з AA та AG генотипами SNP rs4986790 гена TLR4 не знайдено ($p > 0,05$). У дітей із НАЖХП із варіантом Asp299Gly гена TLR4 рівень IL-10 був вірогідно вищим порівняно з хворими з варіантом Asp299Asp гена TLR4. У той же час у дітей із варіантом Asp299Asp без стеатозу печінки спостерігався вірогідно вищий рівень IL-6 ($p < 0,05$) порівняно з особами з поліморфним варіантом Asp299Gly гена TLR4. Виявлений прямий кореляційний зв'язок помірної сили між варіантом Asp299Gly гена TLR4 та рівнем IL-10 ($r = 0,459$, $p < 0,05$). У дітей із варіантом Asp299Asp гена TLR4, хворих на НАЖХП, відзначалися вищі значення HOMA-IR порівняно з хворими з варіантом Asp299Gly гена TLR4 ($p > 0,05$). Виявлений прямий кореляційний зв'язок між рівнем IL-6 та інсуліном ($r = 0,398$; $p < 0,01$), індексом HOMA-IR ($r = 0,364$; $p < 0,05$) у дітей, хворих на НАЖХП.* ***Висновки.*** *Діти з SNP Asp299Gly TLR4, хворі на НАЖХП, характеризуються вірогідно вищим рівнем продукції IL-10 та нижчими рівнями інсуліну та HOMA-IR, що може свідчити про протективні властивості SNP Asp299Gly rs4986790 гена TLR4 щодо розвитку й прогресування НАЖХП.*

Ключові слова: *однонуклеотидний поліморфізм; toll-подібний рецептор 4; неалкогольна жирова хвороба печінки; діти*

Вступ

Глобальна епідемія ожиріння призвела до виходу неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП) на провідні позиції серед хронічних захворювань печінки у світовій педіатричній популяції [1]. НАЖХП на сьогодні вважається мультифакторним захворюванням, ймовірність виникнення та прогресування якого обумовлюється варіабельністю генів різних кластерів (асоційованих із функціонуванням жирової тканини, печінковою акумуляцією жиру, запаленням, фіброгенезом, оксидативним стресом), індивідуальною різноманітністю міжгенних асоціацій, пов'язаних із

© 2020. The Authors. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License, CC BY, which allows others to freely distribute the published article, with the obligatory reference to the authors of original works and original publication in this journal.

Для кореспонденції: Завгородня Наталя Юріївна, кандидат медичних наук, завідувач відділу дитячої гастроентерології, ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», пр. Слобожанський, 96, м. Дніпро, 49074, Україна; e-mail: nzavgorodni75@gmail.com; конт. тел..: +38 (067) 982-71-70
For correspondence: Zavhorodnia Natalia, PhD, Head of the Department of pediatrics gastroenterology, State Institution "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Slobozhanskii Avenue, 96, Dnipro, 49074, Ukraine; e-mail: nzavgorodni75@gmail.com; phone: +38 (067) 982-71-70
Full list of author information is available at the end of the article.

впливом певних факторів зовнішнього середовища (гіперкалорійне харчування, гіподинамія) [2, 3]. Згідно з теорією «багатьох паралельних ударів» прогресування НАЖХП від простого стеатозу до стеатогепатиту відбувається в генетично схильних індивідуумів внаслідок порушення імунного гомеостазу й розвитку системної і локальної запальної відповіді [4]. Тригерами та промоторами запалення можуть виступати різноманітні екзогенні та ендогенні фактори, зокрема патогенасоційовані молекулярні структури бактеріальних агентів (pathogen associated molecular patterns — PAMPs) [5]. Ідентифікація PAMPs здійснюється за допомогою патернрозпізнавальних рецепторів, у тому числі toll-подібних рецепторів (TLRs), що експресуються гепатоцитами, клітинами Купфера, синусоїдальними ендотеліальними клітинами, зірчастими клітинами печінки, холангіоцитами, ентероцитами, а також клітинами імунної системи. Активація TLR4 ліпополісахаридом (LPS) клітинної стінки грамнегативних бактерій індукує певний каскад молекулярних подій, результатом яких стає індукція транскрипції прозапальних генів та запальної відповіді.

Несинонімічні однонуклеотидні поліморфізми (single nucleotide polymorphism — SNP) гена *TLR4* призводять до заміни амінокислотного залишку в поліпептидній ланці рецептора, змінюючи просторову структуру протеїну і, ймовірно, чутливість рецептора до різних лігандів, та обумовлюють певні функціональні аберації, пов'язані з активністю продукції цитокінів імунними клітинами, які можуть впливати на характер й активність запальної відповіді. Nancy C. Arbour та співавтори (2000) вперше надали докази пригнічення активності запальної відповіді на стимуляцію LPS епітеліоцитів дихальних шляхів та альвеолярних макрофагів людей-носіїв SNP Asp299Gly (rs4986790) гена *TLR4* [6]. SNP (rs4986790, + 896A > G) локалізується в 3-му екзоні кодуючого регіону гена *TLR4* людини і призводить до заміни амінокислоти в положенні 299 (Asp299Gly). Наявність Asp299Gly у кавказьких індивідуумів змінює структуру позаклітинного домену TLR4 і поєднується зі змінами афінітету рецептора до лігандів та дисбалансом прозапальних та протизапальних цитокінів [7]. Існують суперечливі повідомлення щодо впливу SNP Asp299Gly гена *TLR4* на чутливість до бактеріальних ендотоксинів *in vitr*o та *in vivo*. Продемонстрована асоціація SNP Asp299Gly rs4986790 гена *TLR4* зі зростанням інцидентності бактеріальних та вірусних інфекцій та ризику септичного шоку, викликаного грамнегативними мікроорганізмами, ризику розвитку передракових уражень слизової шлунка, колоректального раку, але виявлені протективні властивості цього поліморфізму щодо розвитку хронічного періодонтиту [8–12]. Також продемонстроване значення даного поліморфізму при розвитку запальних захворювань шлунка в дітей [13], хронічного гепатиту С [14, 15]. З іншого боку, SNP Asp299Gly гена *TLR4* пов'язують із редукцією ризику неінфекційних захворювань, таких як атеросклероз, ревматоїдний артрит [16, 17]. У той же час метааналіз 5 європейських досліджень не виявив асоціативного зв'язку SNP Asp299Gly гена *TLR4* з ревматоїдним артритом та ризиком атеросклерозу та кардіоваскулярних захворювань у хворих із ревматоїдним артритом [7, 18]. Молекулярні механізми, що лежать в основі впливу SNP гена *TLR4* на рецепторну функцію, залишаються недостатньо вивченими. Adeline M. Hajjar та співавтори (2017) продемонстрували, що саме рівень експресії *TLR4* людини, а не його послідовність є ключовим фактором чутливості до LPS [19].

Вплив поліморфізмів гена *TLR4* на розвиток та перебіг НАЖХП у дітей залишається не дослідженим. З урахуванням важливості ролі *TLR4* в організації ефективного імунного захисту, механізмах прогресування захворювання вивчення ролі SNP гена *TLR4* при НАЖХП у дітей вважається надзвичайно актуальним, тому що відкриває нові можливості прогнозування перебігу й удосконалення менеджменту захворювання в цих хворих.

Мета дослідження: вивчити асоціацію SNP Asp299Gly (rs4986790) гена *TLR4* зі структурними змінами печінки, показниками вродженого імунітету та вуглеводного обміну в дітей із НАЖХП.

Матеріали та методи

Під спостереженням перебували 76 дітей із надмірною вагою та ожирінням віком від 9 до 17 років, середній вік становив 12,3 ± 2,5 року. Наявність стеатозу печінки визначалась за допомогою транзієнтної еластометрії апаратом FibroScan®502touch (Echosens, Франція) із вимірюванням контрольованого параметра атенуації ультразвуку (controlled attenuation parameter — CAP). За наявності НАЖХП діти були розподілені на 2 групи: 1-шу групу (основну) становили 40 пацієнтів із НАЖХП, 2-гу (порівняння) — 36 пацієнтів без стеатозу печінки. За даними молекулярно-генетичного обстеження кожна з груп розподілена на 2 підгрупи: діти з варіантом Asp299Asp та діти із SNP Asp299Gly (rs4986790) гена *TLR4* у гетерозиготному стані. Групи не мали значущих відмінностей за віковим та статевим розподілом. Подані для публікації матеріали не заперечують положенням біоетики.

Молекулярно-генетичне дослідження з генотипування гена *TLR4* (визначення SNP Asp299Gly rs4986790) проведене на базі НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Геномну ДНК виділяли з периферичної венозної крові, забір якої проводився з кубітальної вени в стерильні вакутайнери зі стабілізатором (ЕДТА) за допомогою набора реагентів для виділення геномної ДНК «ДНК-Экстран-1» («СИНТОЛ», Росія). Поліморфну ділянку Asp299Gly гена *TLR4* ампліфікували шляхом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) із використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів (табл. 1) [20].

Ампліфікацію проводили з використанням чотириканального термостата ТП4-ПЦР-01-«Терцик» для проведення ПЛР-аналізу (ТОВ «ДНК-Технология», Росія). Суміш для ПЛР об'ємом 25 мкл містила 2,5 мкл 10х буферу для ампліфікації; 2 мМ хлориду магнію; 0,2 мМ dNTP; суміш специфічних олігонуклеотидних праймерів по

10 пкмоль/мкл кожного; 2,5 од. Taq-ДНК-полімерази (НВО «СибЭнзим», Росія); 20–50 нг геномної ДНК. У пробірки нашаровували 25 мкл мінерального мастила. Температура відпалу для визначення поліморфної ділянки Asp299Gly гена *TLR4* становила 58 °С. Поліморфізм Asp299Gly гена *TLR4* ідентифікували за допомогою рестрикційного аналізу з використанням ендонуклеази рестрикції Bsp19 I (НВО «СибЭнзим», Росія) при температурі 37 °С впродовж 12 годин. Продукти розщеплення поліморфних ділянок гена *TLR4* виявляли за допомогою електрофорезу в 3% агарозному гелі в 1х ТВЕ-буфері (протягом 2 год при напрузі 2V на 1 см гелю). У ролі маркера молекулярної ваги ДНК використовували pBR322/BsuRI. Гелі забарвлювали етидіумом бромідом із подальшою візуалізацією результатів у УФ-світлі за допомогою спектрофотометра.

Вміст інсуліну в сироватці крові визначали імуноферментним методом тест-набором фірми DRG International, Inc. (Німеччина). Кількісне визначення концентрації IL-6, IL-10, TNF-α в сироватці крові проводили за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) із використанням тест-систем ЗАТ «Вектор-бест» (м. Новосибірськ). ІФА виконали за допомогою аналізатора Stat Fax 303 Plus (США). Індекс HOMA-IR розраховували за формулою: HOMA-IR = глюкоза натще (ммоль/л) × інсулін натще (мкОд/мл)/22,5.

Для оптимізації математичної обробки результати вводили в базу даних, побудовану за допомогою електронних таблиць Microsoft Excel. Статистичне опрацювання результатів виконали за допомогою пакета прикладних програм Statistica 6.1 (серійний номер AGAR909 E415822FA). Відповідність розподілу даних закону нормального розподілу перевіряли за допомогою методу Шапіро — Уїлка. Для опису даних застосовували медіану (Me), нижній (Q1) та верхній (Q2) квартилі. Порівняння здійснювали за допомогою непараметричного критерію Манна — Уїтні. Статистичну значущість оцінювали на рівні не нижчому ніж 95,0 % ($p < 0,05$). Ступінь взаємозв'язків між змінними оцінювали за допомогою значущих коефіцієнтів кореляції Спірмена (r).

Результати

За результатами молекулярно-генетичного дослідження, загальна частота виявлення носійства SNP Asp299Gly (rs4986790) гена *TLR4* у гетерозиготному стані в обстежених дітей становила 15,8 % (табл. 2). Частота зустрічальності SNP Asp299Gly (rs4986790) гена *TLR4* у дітей із НАЖХП становила 20,0 %, у дітей без стеатозу печінки — 11,1 % ($p > 0,05$). Гомозиготне носійство SNP Asp299Gly (rs4986790) гена *TLR4* не виявлене в жодного обстеженого пацієнта.

Таблиця 1. Нуклеотидна послідовність ділянки гена TLR4

Назва поліморфізму гена	Пряма послідовність	Зворотна послідовність
TLR4 Asp299Gly	5′AGCATACTTAGACT ACTACCTCCATG3′	5′GAGAGATTTGAG TTTCAATGTGGG3′

Таблиця 2. Розподіл генотипів за SNP rs4986790 гена TLR4 серед обстежених пацієнтів (n = 76)

Генотип	1-ша група (n = 40)		2-га група (n = 36)		Загалом (n = 76)		p
	n	%	n	%	n	%	
AA	32	80,0	32	88,9	64	84,2	0,5
AG	8	20,0	4	11,1	12	15,8	0,3

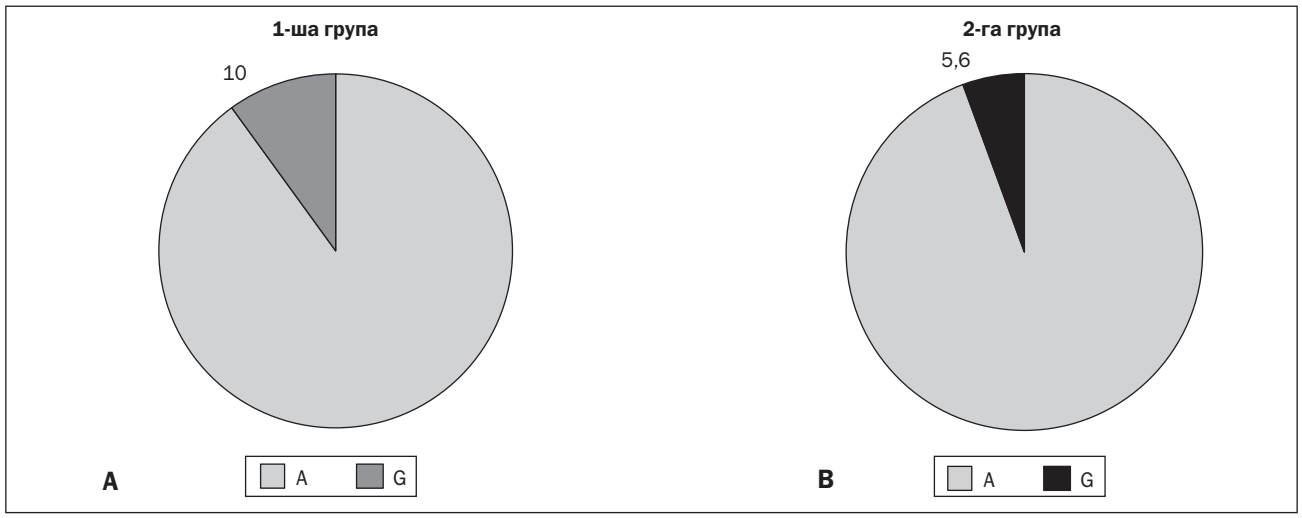

Рисунок 1. Частота виявлення варіантів Asp299Asp та Asp299Gly гена TLR4 у дітей із НАЖХП (А) та в групі порівняння (В)

За частотою виявлення нормального Asp299Asp та поліморфного Asp299Gly-варіанта гена *TLR4* діти 1-ї групи вірогідно не відрізнялись від 2-ї групи: серед дітей із НАЖХП варіант Asp299Asp зустрічався з частотою 90,0 %, варіант Asp299Gly — 10,0 %, у групі порівняння частота виявлення варіанта Asp299Asp становила 94,4 %, поліморфного варіанта Asp299Gly — 5,6 % (рис. 1).

Не знайдено значущих відмінностей показників жорсткості печінки між AA та AG генотипами SNP rs4986790 гена *TLR4* хворих із НАЖХП, але жорсткість печінки в дітей із НАЖХП була вищою, ніж у дітей без стеатозу, незалежно від генотипу хворого ($p > 0,05$) (рис. 2).

Виявлені значущі відмінності між 1-ю та 2-ю групами при порівнянні середніх значень CAP, що характеризують ступінь жирової інфільтрації печінки, але відмінності між підгрупами з різними генотипами *TLR4* не були значущими (рис. 3).

Порівняльна характеристика середніх значень рівнів прозапальних та протизапальних цитокінів сироватки крові обстежених пацієнтів залежно від генотипу SNP rs4986790 гена *TLR4* наведена в табл. 3.

Відмінною особливістю хворих із НАЖХП із варіантом Asp299Gly був вірогідно більш високий рівень вмісту IL-10 порівняно з хворими з варіантом Asp299Asp гена *TLR4*. У той же час у дітей із варіантом Asp299Asp без стеатозу печінки спостерігався вірогідно вищий рівень IL-6 ($p < 0,05$) порівняно з особами з поліморфним варіантом Asp299Gly гена *TLR4*. Був виявлений прямий кореляційний зв'язок помірної сили між варіантом Asp299Gly гена *TLR4* та рівнем IL-10 ($r = 0,459$, $p < 0,05$).

Слід відзначити, що діти, хворі на НАЖХП, незалежно від генотипу SNP rs4986790 гена *TLR4* відрізнялись від дітей без стеатозу вірогідно вищими рівнями інсуліну та HOMA-IR. У дітей із варіантом Asp299Asp гена *TLR4*, хворих на НАЖХП, відзначалися вищі значення HOMA-IR порівняно з хворими з варіантом Asp299Gly гена *TLR4* ($p > 0,05$) (табл. 4). Виявлений прямий кореляційний зв'язок між рівнем вмісту IL-6 та інсуліном ($r = 0,398$; $p < 0,01$), індексом HOMA-IR ($r = 0,364$; $p < 0,05$) у дітей, хворих на НАЖХП.

Обговорення

Отримані нами дані свідчать про те, що носійство поліморфного варіанта Asp299Gly гена *TLR4* зустрічається з частотою 15,8 % серед дітей із надмірною вагою та ожирінням, і не суперечать результатам дослідження Bart Ferwerda та співавторів (2007), які повідомили, що частота виявлення вказаного поліморфізму в дорослих становить близько 18 % [21]. Результати нашого дослідження не виявили чіткого зв'язку SNP Asp299Gly rs4986790 гена *TLR4* із НАЖХП у дітей, що збігається з даними Shweta Kapil та співавт., опублікованими у 2016 році [22], але дещо суперечить даним Safak Kiziltas та співавторів, які продемонстрували превентивну роль цього поліморфізму в розвитку НАЖХП у дорослих [23].

Таблиця 3. Залежність цитокінового профілю обстежених дітей від генотипу SNP rs4986790 гена TLR4

Показник	1-ша група, n = 40		2-га група, n = 36	
	AA, n = 32	AG, n = 8	AA, n = 32	AG, n = 4
	Me (Q25, Q75)	Me (Q25, Q75)	Me (Q25, Q75)	Me (Q25, Q75)
IL-6, пг/мл	0,6 (1,18; 4,4)	0,3 (0,23; 1,73)	1,1 (0,43; 2,2)*	0,1 (0,1; 0,1)
TNF-α, пг/мл	0,5 (0,28; 2,23)	0,15 (0,1; 0,28)	0,6 (0,2; 1,05)	0,15 (0,13; 0,18)
IL-10, пг/мл	1,35 (0,68; 2,55)#	4,05 (2,08; 5,28)^	4,85 (2,48; 10,5)*	2,95 (1,63; 4,28)

Примітки: * — p < 0,05 – рівень значущості відмінностей порівняно з AG-підгрупою 2 групи за критерієм Манна — Уїтні; # — p < 0,05 — рівень значущості відмінностей порівняно з AA-підгрупою 2-ї групи за критерієм Манна — Уїтні; ^ p < 0,05 — рівень значущості відмінностей порівняно з AA-підгрупою 1-ї групи за критерієм Манна — Уїтні.

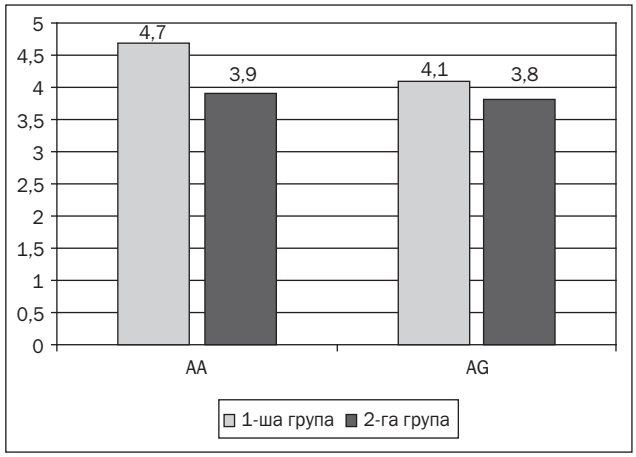

Рисунок 2. Характеристика жорсткості печінки залежно від генотипу SNP rs4986790 гена TLR4

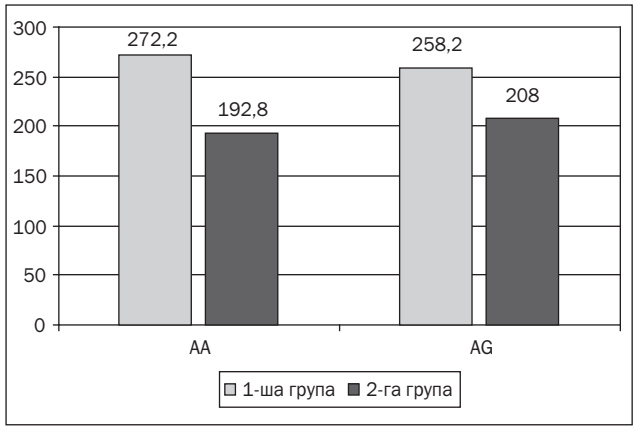

Рисунок 3. Характеристика ступеня жирової інфільтрації печінки за показником CAP залежно від генотипу SNP rs4986790 гена TLR4

Рецептор TLR4 є ключовим сенсором ліпополісахаридів клітинної стінки грамнегативних бактерій, циркулюючих насичених вільних жирних кислот [24, 25]. Зв'язування TLR4 з відповідними лігандами індукує потужний прозапальний каскад активації факторів транскрипції (NF-κB, AP-1, IRF-3), продукції прозапальних цитокінів, що призводить до рекрутингу ефекторних імуноцитів та прогресування пошкодження печінки (рис. 4) [26].

Крім того, активація TLR4-асоційованих прозапальних шляхів у метаболічно активних тканинах призводить до порушення рецепції інсуліну та формування периферичної та центральної інсулінорезистентності, пригнічення секреції інсуліну β-клітинами підшлункової залози, сприяє активації ліполізу в жировій тканині, акумуляції жиру в печінці й розвиткові атеросклерозу, формуючи порочне коло дисметаболічних розладів [27].

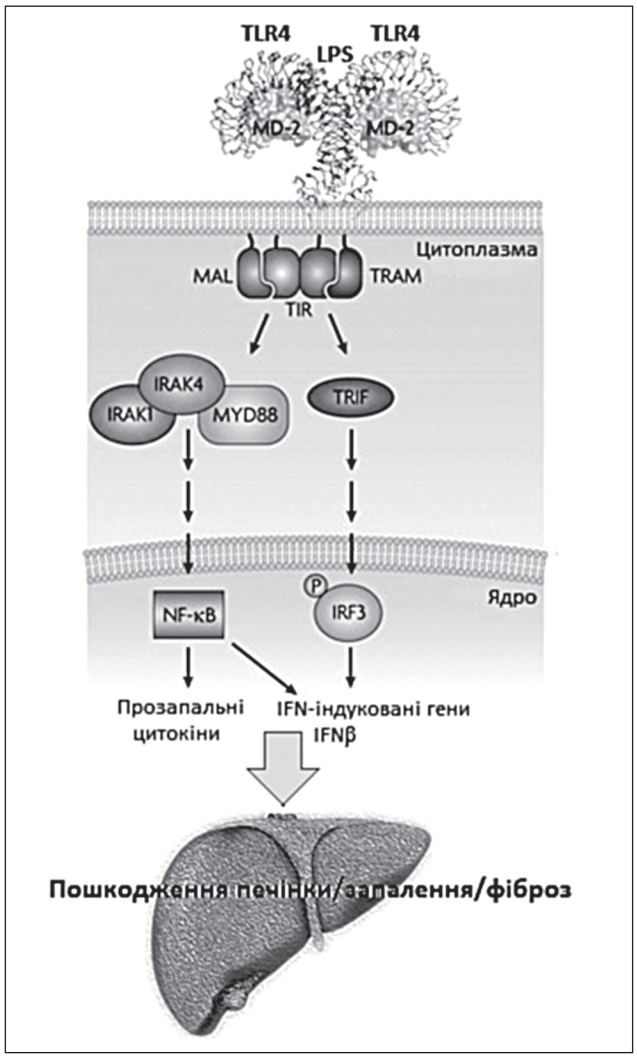

Рисунок 4. Активація TLR4-сигнального шляху при НАЖХП [26]

Популяційне дослідження з генотипуванням 621 донора чоловічої статі дозволило встановити зв'язок Asp299Asp генотипу *TLR4* з підвищеним ризиком акумуляції ліпідів, розвитком інсулінорезистентності та метаболічного синдрому [28]. У той же час метааналіз 15 059 суб'єктів не виявив зв'язку SNP Asp299Gly *TLR4* із підвищенням ризику розвитку діабету 2-го типу [29].

Вважається, що TLR4 забезпечує молекулярний зв'язок між ожирінням, запаленням і резистентністю до інсуліну [30]. У нашому дослідженні пацієнти з НАЖХП із варіантом Asp299Asp гена *TLR4* відрізнялись від хворих із поліморфним варіантом вищими рівнями прозапальних цитокінів — IL-6, TNF-α ($p_U > 0,05$) у поєднанні з вірогідно нижчими рівнями IL-10. У пацієнтів зі SNP Asp299Gly rs4986790 гена *TLR4*, хворих на НАЖХП, продукція IL-10 зберігалась на вірогідно більш високому рівні, що поєднувалось із більш низькими рівнями прозапальних цитокінів, порівняно з хворими з Asp299Asp-варіантом гена *TLR4*. Був виявлений прямий кореляційний зв'язок помірної сили між AG-генотипом гена *TLR4* та рівнем IL-10 ($r = 0,459$, $p < 0,05$). Діти з НАЖХП та SNP Asp299Gly rs4986790 гена *TLR4* характеризувались тенденцією до зниження HOMA-IR та рівня інсуліну порівняно з Asp299Asp-варіантом. Отримані дані не збігаються з даними німецьких дослідників, опублікованими у 2010 році, які продемонстрували асоціацію SNP Asp299Gly rs4986790 гена *TLR4* з підвищенням загального вмісту жиру, вісцерального жиру і незначущим зниженням чутливості до інсуліну в осіб кавказького походження без діабету [30]. На рис. 5 наведена власна гіпотеза впливу варіанта Asp299Gly гена *TLR4* на характер запальної відповіді.

Таким чином, перебіг НАЖХП у пацієнтів з Asp299Asp-варіантом гена *TLR4* супроводжується підвищенням продукції прозапальних цитокінів (TNF-α, IL-6), дефіцитарністю секреції IL-10, зростанням рівнів інсуліну та HOMA-IR, що корелюють із рівнем IL-6 без суттєвих змін жорсткості паренхіми печінки. На відміну від пацієнтів із нормальним генотипом діти з SNP Asp299Gly гена *TLR4*, хворі на НАЖХП, характеризуються вірогідно вищим рівнем продукції IL-10 та нижчими рівнями інсуліну та HOMA-IR. Загалом

Таблиця 4. Залежність інсулінового статусу обстежених дітей від генотипу SNP rs4986790 гена TLR4, Me (Q25, Q75)

Показник	1-ша група, n = 40		2-га група, n = 36	
	AA, n = 32	AG, n = 8	AA, n = 32	AG, n = 4
Інсулін, мкОД/мл	32,2 (24,2; 39,3)*	24,8 (17,2; 36,3)*	21,3 (14,8; 28,2)	19,4 (13,0; 28,2)
Глюкоза, ммоль/л	5,12 (5,0; 5,4)	5,08 (4,8; 5,4)	5,0 (4,5; 5,3)	5,1 (4,7; 5,4)
HOMA-IR	6,5 (4,2; 8,6)*	6,2 (3,8; 8,3)*	4,45 (3,1; 6,6)	4,1 (3,1; 6,6)

Примітка: * — $p < 0,05$ — значущість відмінностей порівняно з показниками 2-ї групи за критерієм Манна — Уїтні.

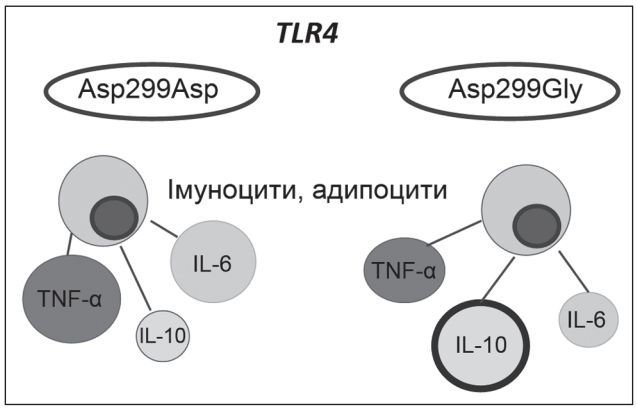

Рисунок 5. Гіпотеза запальної відповіді при НАЖХП залежно від генотипу SNP rs4986790 TLR4

з урахуванням рівня поширеності SNP Asp299Gly rs4986790 гена *TLR4* в дитячій популяції (15,8 %) й особливостями перебігу захворювання у хворих з SNP Asp299Gly гена *TLR4* носійство поліморфного варіанта SNP Asp299Gly rs4986790 гена *TLR4* супроводжується формуванням більш сприятливого метаболічного та цитокінового профілю і, ймовірно, має протективні властивості щодо розвитку й прогресування НАЖХП.

Висновки

1. Установлено, що частота виявлення SNP Asp299Gly rs4986790 гена *TLR4* у дітей із надмірною вагою та ожирінням становить 15,8 %, але мінливість гена *TLR4* у 299-й позиції не має чіткого зв'язку з НАЖХП у дітей.

2. Перебіг НАЖХП у пацієнтів зі SNP Asp299Gly гена *TLR4* супроводжується вірогідним підвищенням продукції IL-10 у поєднанні з відносним зниженням рівнів прозапальних цитокінів TNF-α, IL-6.

3. У дітей із НАЖХП спостерігається формування інсулінорезистентності незалежно від генотипу *TLR4,* але носії SNP Asp299Gly гена *TLR4* відрізняються нижчими рівнями HOMA-IR й інсуліну.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості при підготовці даної статті.

References

1. Nobili V, Alisi A, Valenti L, Miele L, Feldstein AE, Alkhouri N. NAFLD in children: new genes, new diagnostic modalities and new drugs. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019;16(9):517-530. doi:10.1038/s41575-019-0169-z.

2. Fitzpatrick E. Understanding susceptibility and targeting treatment in non-alcoholic fatty liver disease in children; moving the fulcrum. Proc Nutr Soc. 2019;78(3):362-371. doi:10.1017/S0029665118002914.

3. Stepanov YuM, Abaturov OYe, Zavgorodnia NYu, Skyrda IYu. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children: Current View on Diagnostics and Treatment (Part I). Gastroenterologìa.2015;(56):99-107. doi:10.22141/2308-2097.2.56.2015.81504. (in Ukrainian).

4. Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Molecular mechanisms and new treatment strategies for non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Int J Mol Sci. 2014;15(5):7352-7379. doi:10.3390/ijms15057352.

5. Stepanov YuM, Zavgorodnia NYu, Lukianenko OYu, Zygalo EV, Yagmur VB. Association of small intestinal bacterial overgrowth and non-alcoholic fatty liver disease in children. Gastroenterologìa. 2019;53(4):266-272. doi:10.22141/2308-2097.53.3.2019.182406.

6. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat Genet. 2000;25(2):187-191. doi:10.1038/76048.

7. García-Bermúdez M, López-Mejías R, González-Juanatey C, et al. Lack of association between TLR4 rs4986790 polymorphism and risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. DNA Cell Biol. 2012;31(7):1214-1220. doi:10.1089/dna.2011.1582.

8. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. J Infect Dis. 2002;186(10):1522-1525. doi:10.1086/344893.

9. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. Arch Intern Med. 2002;162(9):1028-1032. doi:10.1001/archinte.162.9.1028.

10. Vidyant S, Chatterjee A, Dhole TN. A single-nucleotide polymorphism in TLR4 is linked with the risk of HIV-1 infection. Br J Biomed Sci. 2019;76(2):59-63. doi:10.1080/09674845.2018.1559486.

11. Sellers RM, Payne JB, Yu F, LeVan TD, Walker C, Mikuls TR. TLR4 Asp299Gly polymorphism may be protective against chronic periodontitis. J Periodontal Res. 2016;51(2):203-211. doi:10.1111/jre.12299.

12. Moaaz M, Youssry S, Moaz A, Abdelrahman M. Study of Toll-Like Receptor 4 Gene Polymorphisms in Colorectal Cancer: Correlation with Clinicopathological Features. Immunol Invest. 2020;49(5):571-584. doi:10.1080/08820139.2020.1716787.

13. Abaturov OYe, Gerasymenko ON, Shlykova OA, Kaidashev IP. Genetic Polymorphism of Toll-Like Receptor 4 ASP299GLY Gene Polymorphism in Children with Helicobacter pylori Infection. Zdorov'e rebenka. 2013;(49):14-18. doi:22141/2224-0551.6.49.2013.84834. (in Ukrainian).

14. Dubinska GM, Sizov LM, Koval TI, Shlykova OA. Prevalence of gene TLR4 Asp299Gly polymorphism among patients with chronic hepatitis C in Poltava region. Actual Problems of the Modern Medicine. 2015;15(1):81-84. (in Ukrainian).

15. Sizova LM. Peculiarities of clinical and laboratory characteristics of chronic hepatitis c in patients with polymorphism Asp299Gly of TLR4 gene and Gln11Leu of TLR7 gene. Actual Problems of the Modern Medicine. 2016;16(56):183-188. (in Ukrainian).

16. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. N Engl J Med. 2002;347(3):185-192. doi:10.1056/NEJMoa012673.

17. Lee YH, Bae SC, Song GG. Meta-analysis demonstrates association between TLR polymorphisms and rheumatoid arthritis. Genet Mol Res. 2013;12(1):328-334. doi:10.4238/2013.February.7.2.

18. Lee YH, Bae SC, Kim JH, Song GG. Toll-like receptor polymorphisms and rheumatoid arthritis: a systematic review. Rheumatol Int. 2014;34(1):111-116. doi:10.1007/s00296-013-2666-7.

19. Hajjar AM, Ernst RK, Yi J, Yam CS, Miller SI. Expression level of human TLR4 rather than sequence is the key determinant of LPS responsiveness. PLoS One. 2017;12(10):e0186308. doi:10.1371/journal.pone.0186308.

20. Wood MJ, Powell LW, Dixon JL, Subramaniam VN, Ramm GA. Transforming growth factor-β and toll-like receptor-4 polymorphisms are not associated with fibrosis in haemochromatosis. World J Gastroenterol. 2013;19(48):9366-9376. doi:10.3748/wjg.v19.i48.9366.

21. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, et al. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(42):16645-16650. doi:10.1073/pnas.0704828104.

22. Kapil S, Duseja A, Sharma BK, et al. Genetic polymorphism in CD14 gene, a co-receptor of TLR4 associated with non-alcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2016;22(42):9346-9355. doi:10.3748/wjg.v22.i42.9346.

23. Kiziltas S, Ata P, Colak Y, et al. TLR4 gene polymorphism in patients with nonalcoholic fatty liver disease in comparison to healthy controls. Metab Syndr Relat Disord. 2014;12(3):165-170. doi:10.1089/met.2013.0120.

24. Miura K, Ishioka M, Iijima K. The Roles of the Gut Microbiota and Toll-like Receptors in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. J Obes Metab Syndr. 2017;26(2):86-96. doi:10.7570/jomes.2017.26.2.86.

25. Abaturov OYe, Gerasymenko ON. Modulation of activity TLR4 epithelial cells of the gastric mucosa at helicobacter pylori of infection (review of literature). Sovremennaia pediatriya. 2009;(28):141-146. (in Ukrainian).

26. Bessone F, Razori MV, Roma MG. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. Cell Mol Life Sci. 2019;76(1):99-128. doi:10.1007/s00018-018-2947-0.

27. Jin C, Henao-Mejia J, Flavell RA. Innate immune receptors: key regulators of metabolic disease progression. Cell Metab. 2013;17(6):873-882. doi:10.1016/j.cmet.2013.05.011.

28. Steinhardt AP, Aranguren F, Tellechea ML, et al. A functional nonsynonymous toll-like receptor 4 gene polymorphism is associated with metabolic syndrome, surrogates of insulin resistance, and syndromes of lipid accumulation. Metabolism. 2010;59(5):711-717. doi:10.1016/j.metabol.2009.09.015.

29. Chang WW, Zhang L, Jin YL, Yao YS. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of 15,059 subjects: Need for clarification of data in a recent meta-analysis. Diabetes Res Clin Pract. 2015;110(3):e31-e32. doi:10.1016/j.diabres.2015.08.001.

30. Weyrich P, Staiger H, Stančáková A, et al. The D299G/T399I Toll-like receptor 4 variant associates with body and liver fat: results from the TULIP and METSIM Studies. PLoS One. 2010;5(11):e13980. doi:10.1371/journal.pone.0013980.

Отримано/Received 03.06.2020
Рецензовано/Revised 12.06.2020
Прийнято до друку/Accepted 18.06.2020

Information about authors

Yu. Stepanov, MD, PhD, Professor, Director of the State Institution "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro, Ukraine
N.Yu. Zavhorodnia, PhD, Head of the Department of pediatrics gastroenterology, State Institution "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro, Ukraine
O.I. Grabovska, State Institution "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro, Ukraine
I.A. Klenina, State Institution "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro, Ukraine
O.M. Tatarchuk, State Institution "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro, Ukraine

Степанов Ю.М., Завгородня Н.Ю., Грабовская Е.И., Кленина И.А., Татарчук О.М.
ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», г. Днепр, Украина

Роль однонуклеотидного полиморфизма *TLR4* в развитии неалкогольной жировой болезни печени у детей

Резюме. Актуальность. Прогрессирование неалкогольной жировой болезни пчени (НАЖБП) от простого стеатоза до стеатогепатита происходит у генетически предрасположенных индивидуумов вследствие нарушения иммунного гомеостаза и развития системного и локального воспалительного ответа. Несинонимические однонуклеотидные полиморфизмы гена *TLR4*, изменяя пространственную структуру и, вероятно, чувствительность рецептора к его лигандам, обусловливают определенные функциональные аберрации, которые могут влиять на характер и активность воспаления. **Цель исследования:** изучить ассоциации SNP Asp299Gly rs4986790 гена *TLR4* со структурными изменениями печени, показателями врожденного иммунитета и углеводного обмена у детей с НАЖБП. **Материалы и методы.** Под наблюдением находились 76 детей с избыточным весом и ожирением в возрасте от 9 до 17 лет. Наличие стеатоза печени определялось с помощью транзиентной эластометрии. По наличию стеатоза печени дети были разделены на 2 группы, по наличию SNP Asp299Gly (rs4986790) гена *TLR4* каждая из групп разделена на 2 подгруппы: дети с нормальным (Asp299Asp) и полиморфным (Asp299Gly) вариантами гена *TLR4*. Содержание инсулина, IL-6, IL-10, TNF-α в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом, рассчитывали индекс HOMA-IR. **Результаты.** Частота выявления SNP Asp299Gly rs4986790 гена *TLR4* в гетерозиготном состоянии среди обследованных детей составила 15,8 %, у детей с НАЖБП — 20,0 %, у детей без стеатоза — 11,1 % ($p > 0,05$). Значимых различий показателей жесткости и степени жировой инфильтрации печени пациентов с AA и AG генотипами SNP rs4986790 гена *TLR4* не найдено ($p > 0,05$). У детей с НАЖБП с вариантом Asp299Gly гена *TLR4* уровень IL-10 был достоверно выше по сравнению с больными с вариантом Asp299Asp гена *TLR4*. В то же время у детей с вариантом Asp299Asp без стеатоза печени наблюдался достоверно более высокий уровень IL-6 ($p < 0,05$) по сравнению с лицами с полиморфным вариантом Asp299Gly гена *TLR4*. Обнаружена прямая корреляционная связь умеренной силы между вариантом Asp299Gly гена TLR4 и уровнем IL-10 ($r = 0,459$, $p < 0,05$). У детей с вариантом Asp299Asp гена *TLR4*, больных НАЖБП, отмечались более высокие значения HOMA-IR по сравнению с больными с вариантом Asp299Gly гена *TLR4* ($p > 0,05$). Обнаружена прямая корреляционная связь между уровнем IL-6 и инсулином ($r = 0,398$; $p < 0,01$), индексом HOMA-IR ($r = 0,364$; $p < 0,05$) у детей, больных НАЖБП. **Выводы.** Дети с НАЖБП и SNP Asp299Gly гена *TLR4* характеризуются достоверно более высоким уровнем продукции IL-10 и низкими уровнями инсулина и HOMA-IR, что может свидетельствовать о протективных свойствах SNP Asp299Gly rs4986790 гена *TLR4* в развитии и прогрессировании НАЖБП.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм; toll-подобный рецептор 4; неалкогольная жировая болезнь печени; дети

Yu.M. Stepanov, N.Yu. Zavhorodnia, O.I. Grabovska, I.A. Klenina, O.M. Tatarchuk
State Institution "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro, Ukraine

The role of single nucleotide polymorphism *TLR4* in the development of the non-alcoholic fatty liver disease in children

Abstract. Background. The TLR4 non-synonymous single nucleotide polymorphism (SNPs) changes the spatial structure and, probably, the sensitivity of the receptor to its ligands, determines the certain functional aberrations that can affect the nature and activity of inflammation. The purpose of the study was to examine the associations of the SNP Asp299Gly rs4986790 of the TLR4 gene with liver structural changes, innate immunity, and carbohydrate metabolism parameters in children with NAFLD. **Materials and methods**. The study included 76 children with overweight and obesity aged 9 to 17 years. The presence of liver steatosis was determined using transient elastometry. According to the presence of liver steatosis, the children were divided into 2 groups; following the presence of SNP Asp299Gly (rs4986790) of the TLR4 gene, each group was divided into two subgroups: children with normal (Asp299Asp) and polymorphic (Asp299Gly) variants of the TLR4 gene. The blood serum content of insulin, IL-6, IL-10, TNF-α was determined by enzyme immunoassay, the HOMA-IR index was calculated. **Results**. The SNP Asp299Gly rs4986790 of the TLR4 gene detection rate in the heterozygous state among all children was 15.8 %, in children with NAFLD — 20.0 %, and in children without steatosis — 11.1 % ($p > 0.05$). Significant differences in the stiffness and degree of fatty liver in patients with AA and AG SNP rs4986790 genotypes were not found ($p > 0.05$). In children with NAFLD with the Asp299Gly variant of the TLR4 gene, the level of IL-10 was significantly higher compared to patients with the Asp299Asp variant of the TLR4 gene. At the same time, in children with the Asp299Asp variant without liver steatosis, a significantly higher level of IL-6 concentration was observed ($p < 0.05$) compared with individuals with the TLR4 gene Asp299Gly polymorphic variant. A moderate direct correlation was found between the Asp299Gly variant of the TLR4 gene and IL-10 level ($r = 0.459$, $p < 0.05$). In children with the Asp299Asp variant of the TLR4 gene with NAFLD, higher HOMA-IR values were observed compared to patients with the Asp299Asp variant of the TLR4 gene ($p > 0.05$). A direct correlation was found between the level of IL-6 and insulin ($r = 0.398$; $p < 0.01$), the HOMA-IR index ($r = 0.364$; $p < 0.05$) in children with NAFLD. **Conclusions.** Children with NAFLD and SNP Asp299Gly rs4986790 TLR4 are characterized by significantly higher levels of IL-10 production and lower levels of insulin and HOMA-IR, which may indicate the protective properties of the SNP Asp299Gly rs4986790 TLR4 in the NAFLD development and progression.

Keywords: single nucleotide polymorphism; toll-like receptor 4; non-alcoholic fatty liver disease; children