



Ю.А. Бісюк

Антиендотоксинний імунітет і Asp299Gly поліморфізм TLR-4 у дорослих хворих на atopічну та неatopічну бронхіальну астму

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ

Мета роботи — вивчення стану антиендотоксинного імунітету залежно від генотипів поліморфної ділянки Asp299Gly гена рецептора TLR-4 у хворих на atopічну і неatopічну бронхіальну астму в популяції АР Крим.

Матеріали та методи. Стан антиендотоксинного імунітету залежно від Asp299Gly поліморфізму TLR-4 рецептора вивчено у 275 хворих на atopічну бронхіальну астму і у 56 — на неatopічну.

Результати та обговорення. Результати дослідження свідчать, що для atopічної бронхіальної астми характерна активізація гуморальної, специфічної ланки (збільшення рівня анти-ЕТ-IgG) антиендотоксинного імунітету, а для неatopічної — місцевої, неспецифічної (збільшення рівня sCD14) в асоціації з дефіцитом рівня анти-ЕТ-sIgA. Аналіз стану антиендотоксинного імунітету залежно від генотипів не виявив різниці — всі показники вірогідно не відрізнялися ($p > 0,05$) між собою.

Висновки. Ендотоксин-опосередковане хронічне запалення при бронхіальній астмі залежить від atopічного або неatopічного фенотипу захворювання і не залежить від Asp299Gly поліморфізму TLR-4 рецептора.

Ключові слова: бронхіальна астма, ендотоксин, Asp299Gly поліморфізм рецептора TLR-4.

Бронхіальна астма (БА) є комплексним захворюванням, патогенез якого тісно пов'язаний як з генетичними чинниками, так і факторами навколишнього середовища [4]. На сьогодні алергія є однією з основних причин, які призводять до розвитку БА [7].

На підставі власних спостережень американський педіатр David Strachan у 1989 р. запропонував «гігієнічну» теорію розвитку алергічних хвороб [11]. У згаданій теорії висловлено припущення, що зменшення контакту організму з мікробами в дитинстві призводить до збільшення ризику розвитку алергічних хвороб у пізнішому віці. У подальшому вчені довели, що бактерії стимулюють Т-хелпери 1-го типу і інгібують Т-хелпери 2-го типу, деактивація яких, своєю чергою, призводить до зменшення рівня IgE [5]. За останні 25 років нагромадилася інформація, яка значно розширила розуміння патогенезу БА [7].

Ендотоксин (ЕТ), або ліпополісахарид (ЛПС), є одним з основних індукторів імунної відповіді. Ефекти ЕТ реалізуються через активізацію рецепторного комплексу TLR-4/CD14, який експресується на поверхні моноцитів, макрофагів та гранулоцитів [9].

Активізація згаданих рецепторів призводить до синтезу прозапальних цитокінів, в мікрооточенні

яких наївні Т-хелпери трансформуються в Т-хелпери 1-го типу [12].

Т-хелпери 1-го типу, в основному, володіють протекторними властивостями щодо розвитку БА, але надмірна експозиція ЛПС може зумовити протилежний ефект, що, можливо, пов'язано з поліморфізмом генів, які кодують рецептори до ЕТ [10].

Ген TLR-4 розташований у хромосомі 9q32—33. Поліморфна ділянка Asp299Gly (rs4986790) гена TLR-4 становить собою одонуклеотидну заміну аденіну (А) на гуанін (G) у положенні +896 екзону 3, що призводить до амінокислотної заміни аспарагінової кислоти на гліцин у 299 положенні поліпептидного ланцюга рецептора [13].

У мешканців Полтавської області частота алеля G у дітей, хворих на atopічну БА, становила 7,54 %, алеля А — 92,45 %, що вірогідно відрізнялося (ВШ 1,059; ДІ 0,9989—1,122; $p = 0,049$) від контролю (G — 2,11 %, А — 97,89 %), крім того наявність мутантного алеля G у понад 4 рази збільшувала ймовірність неконтрольованого перебігу atopічної БА (ВШ = 4,13; ДІ 95 % 1,05—1,44; $p = 0,02$) [3].

За даними дослідників з Польщі [14], ризик розвитку atopічної БА був вірогідно вищий у осіб з генотипом AG порівняно з AA (ВШ = 2,33; 95 % ДІ = 1,033—5,261; $p < 0,05$).

У популяції АР Крим стан антиендотоксинного імунітету з урахуванням поліморфізму Asp299Gly гена рецептора TLR-4 у хворих на atopічний та неatopічний фенотип БА не вивчали.

Стаття надійшла до редакції 6 лютого 2015 р.

Бісюк Юрій Анатолійович, к. мед. н., доцент кафедри клінічної імунології та алергології з секцією медичної генетики 01601, м. Київ, бульв. Т. Шевченка, 13. Тел. (044) 425-87-98 E-mail: bisyuk@gmail.com

Мета роботи — вивчення стану антиендотоксинного імунітету залежно від генотипів поліморфної ділянки Asp299Gly гена рецептора TLR-4 у хворих на atopічну і неatopічну БА в популяції АР Крим.

Матеріали та методи

У дослідженні взяв участь 331 хворий на БА. Діагноз і лікування проводили відповідно до критеріїв чинного наказу МОЗ України № 128 від 19.03.2007 р. Дослідження проводили на базі ДЗ «Відділкова клінічна лікарня станції Сімферополь» ДП «Придніпровська залізниця».

Усіх хворих на БА розподілено на дві групи залежно від фенотипу — atopічний та неatopічний. Критеріями для atopічного фенотипу були позитивний алергоанамнез та шкірні алерготести з пилковими або побутовими алергенами з розміром папули понад 3 мм. Відсутність даних критеріїв підтвердило неatopічний варіант БА.

Групу контролю склали 92 практично здорових мешканців Криму. Всіх волонтерів обстежували на предмет алергічної патології за допомогою вивчення анамнезу та проведення шкірних алерготестів. Для шкірних «прик»-тестів використовували алергени виробництва «Імунолог» (Вінниця).

Для аналізу поліморфізму гена TLR-4 (Asp299Gly) використано метод алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з електрофоретичною детекцією. ДНК виділяли з цільної крові хворих на БА і здорових добровольців за допомогою набору «ДНК-експрес кров» («Літех», РФ) згідно з інструкцією виробника. Постановку алель-специфічної ПЛР здійснювали за допомогою наборів «Мутація Толл-подібного рецептора 4 Asp299Gly, rs4986790» («Літех», РФ) згідно з інструкцією виробника. Детекцію продуктів ампліфікації здійснювали за методом горизонтального електрофорезу за допомогою набору виробництва «Літех» (РФ).

Рівні антиендотоксинних антитіл класів А, М, G (відповідно анти-ЕТ-IgA, анти-ЕТ-IgM і анти-ЕТ-IgG) визначали за методом твердофазного імуноферментного аналізу. Рівні анти-ЕТ-IgA, анти-ЕТ-IgM і анти-ЕТ-IgG виражали в умовних одиницях оптичної щільності кінцевого продукту ферментативної реакції [2].

Секреторний антиендотоксинний імуноглобулін А (анти-ЕТ-sIgA) в індукованому мокротинні визначали за методом твердофазного імуноферментного аналізу за протоколами, розробленими в лабораторії клінічної імунології ЦНДЛ ДУ «Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгіївського» [1].

Рівень sCD14 у сироватці та індукованому мокротинні визначали за методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням тест-системи «Hbt Human sCD14 ELISA Kit, Product Number: НК320» виробництва «Нусcult biotechnology» (Голландія). Оптичну щільність вивчали на аналізаторі «StatFax 2100» на довжині хвилі 450 нм. Уміст sCD14 в сироватці виражали в мкг/мл, в індукованому харкотинні — в нг/мл.

Усі результати піддані статистичній обробці для параметричних і непараметричних критеріїв із використанням програми «Minitab 16». Для перевірки розподілу на нормальність використовували тест Колмогорова — Смирнова, порівнювали центральні тенденції двох незалежних вибірок з використанням U-критерію Манна—Уїтні і середніх двох незалежних вибірок за критерієм Стьюдента. Кількісні змінні представлено у вигляді середніх значень і середньоквадратичних відхилень для параметричних методів і медіани з 1 і 3 квантилями для непараметричних. Для множинного порівняння показників антиендотоксинного імунітету використовували критерій Краскела—Уолліса.

Для всіх пацієнтів і волонтерів отримано добровільну письмову згоду на участь у науковому дослідженні, на який є дозвіл комісії з біоетики ДУ «Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгіївського».

Результати та обговорення

За алергоанамнезом і результатами шкірних тестів виявлено 275 пацієнтів із atopічним фенотипом БА і 56 — з неatopічним. Середній вік хворих з atopічною астмою становив ($51,66 \pm 10,69$) року, з неatopічною — ($54,27 \pm 9,85$) року і волонтерів — ($50,7 \pm 10,2$) року, тобто вірогідно не відрізнявся ($p > 0,05$).

Тривалість захворювання для atopічного фенотипу дорівнювала ($19,88 \pm 11,80$) року й вірогідно відрізнялася ($p < 0,001$) від неatopічної — ($12,96 \pm 9,21$) року. Початок вияву симптомів був ранішим для atopічної БА ($31,77 \pm 9,26$) року порівняно з неatopічною ($41,30 \pm 9,12$) року; $p < 0,001$).

Результати аналізу початку захворювання БА узгоджуються з класичними уявленнями про те, що неatopічний фенотип спостерігається частіше в пізньому віці порівняно з atopічним.

За допомогою статистичного аналізу показників антиендотоксинного імунітету встановлено, що розподіл змінних у варіаційних рядах відрізняється від нормального, тому для обробки даних використовували непараметричні критерії. Результати наведено в табл. 1.

Під час множинного порівняння значень сироваткового анти-ЕТ-IgA встановлено, що у пацієн-

Таблиця 1

Показники антиендотоксिनного імунітету у хворих на atopічну/неatopічну БА та здорових волонтерів

Показник	Контроль (n = 92)	Atopічна БА (n = 275)	Неatopічна БА (n = 56)	p, T, K—Y
Анти-ЕТ-IgA, од. опт. щ.	0,266 (0,184—0,354)	0,257 (0,198—0,321)	0,246 (0,199—0,310)	0,758
Анти-ЕТ-IgM, од. опт. щ.	0,322 (0,203—0,400)	0,411 ^a (0,332—0,478)	0,354 ^b (0,235—0,527)	< 0,001
Анти-ЕТ-IgG, од. опт. щ.	0,357 (0,261—0,442)	1,056 ^a (0,763—1,305)	0,904 ^{b, c} (0,625—1,160)	< 0,001
Анти-ЕТ-sIgA, од. опт. щ.	0,178 (0,119—0,217)	0,157 (0,121—0,198)	0,132 ^{b, c} (0,093—0,177)	0,005
sCD14 (сироватка), мкг/мл	4,99 (3,53—6,90)	5,31 (3,92—7,15)	7,54 ^{b, c} (5,46—10,99)	< 0,001
sCD14 (індуковане харкотиння), нг/мл	6,7 (4,3—9,3)	8,3 ^a (5,4—11,0)	19,6 ^{b, c} (13,0—24,3)	< 0,001

Примітка. ^a — вірогідність різниці контролю та atopічної БА ($p < 0,05$); ^b — вірогідність різниці контролю та неatopічної БА ($p < 0,05$); ^c — вірогідність різниці atopічної та неatopічної БА; T, K—Y — тест Краскела—Уолліса.

тів, хворих на atopічну і неatopічну БА, концентрації згаданого імуноглобуліну вірогідно не відрізняються між собою і порівняно з контролем ($p = 0,758$). Рівні анти-ЕТ-IgM у хворих з atopічним і неatopічним фенотипом БА були вірогідно вищі від контрольних ($p < 0,001$), хоча не відрізнялися між собою ($p > 0,05$). Для анти-ЕТ-IgG виявлено аналогічні зміни, при цьому концентрація згаданого імуноглобуліну у пацієнтів з atopічною БА була вірогідно вища ($p < 0,05$) порівняно з неatopічною. У пацієнтів з неatopічною БА спостерігалось вірогідне зниження ($p < 0,05$) рівня анти-ЕТ-sIgA, а для sCD14 в сироватці та індукованому харкотинні вірогідне збільшення ($p < 0,05$) порівняно з контролем і atopічним фенотипом.

Отже, можна дійти висновку, що фенотипічна різниця atopічної та неatopічної БА може виявлятися в різному стані антиендотоксिनного імунітету. Так, для atopічної БА характерна активізація гуморальної, специфічної ланки (збільшення рівня анти-ЕТ-IgG), а для неatopічної — місцевої,

неспецифічної (збільшення рівня sCD14) в асоціації з дефіцитом рівня анти-ЕТ-sIgA.

Виявлену різницю можна пояснити різними генотипами поліморфної ділянки гена рецептора TLR-4 (табл. 2).

За результатами ПЛР у 210 пацієнтів виявили генотип AA, у 61 — AG і у 4 — GG. Оскільки в групі з GG генотипом було лише 4 пацієнта, то генотипи AG і GG об'єднали в одну групу.

Під час порівняння показників антиендотоксिनного імунітету з використанням множинного аналізу між генотипами AA та AG + GG у хворих на atopічну астму вірогідної різниці ($p > 0,05$) не встановлено. Щодо антиендотоксिनного імуноглобуліну M спостерігалась тенденція ($p = 0,07$) до зниження цього показника у пацієнтів з групи AG + GG порівняно з генотипом AA.

Для неatopічної БА проведено аналогічний аналіз. Результати наведено в табл. 3.

Із 56 хворих з неatopічною БА у 51 був AA генотип та у 5 — AG. Аналіз стану антиендотоксिनного імунітету (див. табл. 3) залежно від генотипів

Таблиця 2

Показники антиендотоксिनного імунітету залежно від генотипів TLR-4 (Asp299Gly) рецептора у хворих на atopічну БА

Показник	Контроль (n = 92)	AA (n = 210)	AG + GG (n = 65)	p, T, K—Y
Анти-ЕТ-IgA, од. опт. щ.	0,266 (0,184—0,354)	0,256 (0,201—0,318)	0,269 (0,183—0,334)	0,812
Анти-ЕТ-IgM, од. опт. щ.	0,322 (0,203—0,400)	0,415 ^a (0,339—0,484)	0,386 ^a (0,327—0,456)	< 0,001
Анти-ЕТ-IgG, од. опт. щ.	0,357 (0,261—0,442)	1,094 ^a (0,800—1,308)	0,958 ^a (0,680—1,299)	< 0,001
Анти-ЕТ-sIgA, од. опт. щ.	0,178 (0,119—0,217)	0,155 (0,117—0,197)	0,166 (0,126—0,199)	0,091
sCD14 (сироватка), мкг/мл	4,99 (3,53—6,90)	5,29 (3,90—6,95)	5,62 (4,11—8,28)	0,202
sCD14 (індуковане харкотиння), нг/мл	6,7 (4,3—9,3)	7,9 ^a (5,4—11,0)	9,1 ^a (6,2—11,3)	< 0,002

Примітка. ^a — вірогідність різниці контролю і груп AA, AG + GG ($p < 0,05$); T, K—Y — тест Краскела—Уолліса.

Таблиця 3

Показники антиендотоксिनного імунітету залежно від генотипів TLR-4 (Asp299Gly) рецептора у хворих на неатопічну БА

Показник	Контроль (n = 92)	AA (n = 51)	AG + GG (n = 5)	p, Т. К—У
Анти-ЕТ-IgA, од. опт. щ.	0,266 (0,184—0,354)	0,247 (0,189—0,309)	0,237 (0,213—0,379)	0,714
Анти-ЕТ-IgM, од. опт. щ.	0,322 (0,203—0,400)	0,368 (0,230—0,561)	0,316 (0,206—0,399)	0,069
Анти-ЕТ-IgG, од. опт. щ.	0,357 (0,261—0,442)	0,906 ^a (0,641—1,303)	0,901 ^a (0,394—1,049)	< 0,001
Анти-ЕТ-sIgA, од. опт. щ.	0,178 (0,119—0,217)	0,128 ^a (0,092—0,196)	0,162 (0,088—0,172)	0,013
sCD14 (сироватка), мкг/мл	4,99 (3,53—6,90)	7,11 ^a (4,78—10,89)	8,37 ^a (6,92—12,98)	< 0,001
sCD14 (індуковане харкотиння), нг/мл	6,7 (4,3—9,3)	19,6 ^a (12,8—24,9)	19,6 ^a (13,4—21,5)	< 0,001

Примітка: ^a — вірогідність різниці контролю і груп AA, AG + GG (p < 0,05); Т. К—У — тест Краскела—Уолліса.

також не виявив різниці — всі показники вірогідно не відрізнялися (p > 0,05) між собою.

Отже, різниця щодо стану антиендотоксिनного імунітету з урахуванням atopічного і неатопічного фенотипу глибше стратифікує БА патофізіологічно, на відміну поділу залежно від генотипу Asp299Gly.

Підвищений ризик розвитку atopічної БА у людей з гетерозиготним генотипом AG (Asp299Gly) пов'язують із відповіддю імунної системи на ендотоксин [8]. Так, у пацієнтів з астмою рівень ендотоксин-індукованої секреції ІЛ-12 значно нижчий за AG генотипу, ніж AA, що створює умови для активізації Т-хелперів 2-го типу та перемикання імунної відповіді на синтез ІgE.

Наші дані збігаються з результатами турецьких вчених [6], які встановили, що atopічний та неатопічний фенотипи не залежать від генотипу Asp299Gly TLR-4.

Для ширшого розуміння зв'язку поліморфізму Asp299Gly гена TLR-4 зі станом антиендо-

токсिनного імунітету при БА потрібно проаналізувати ці результати з урахуванням стратифікації пацієнтів на інші клінічні фенотипи або патофізіологічні субтипи в контексті досліджуваної проблеми.

Висновки

1. Для atopічної бронхіальної астми характерна активізація гуморальної, специфічної ланки (збільшення рівня анти-ЕТ-IgG) антиендотоксिनного імунітету, а для неатопічної — місцевої, неспецифічної (збільшення рівня sCD14) в асоціації з дефіцитом рівня анти-ЕТ-sIgA.

2. Стан антиендотоксिनного імунітету у хворих на atopічну/неатопічну астму не залежить від поліморфізму Asp299Gly гена рецептора TLR-4.

Перспективи подальших досліджень. Доцільним є вивчення зв'язку поліморфізму Asp299Gly гена рецептора TLR-4 з антиендотоксिनним імунітетом залежно від поділу хворих на еозинофільну, нейтрофільну та рефрактерну астму тощо.

Література

- Гордиенко А.И. Использование твердофазного иммуноферментного анализа для определения общего и антиэндотоксिनного секреторного IgA человека // Таврический мед.-биол. вестн. — 2009. — Т. 12, № 3. — С. 82—89.
- Гордієнко А.І., Білоглазов В.О. Патент 70193 А Україна МКІ 7 А61К31/01 Спосіб визначення антигену до ліпополісахаридів грамнегативних бактерій; Заявл. 29.12.2003; Опубл. 15.09.2004, Бюл. № 9.
- Крючко Т.А., Вовк Ю.А., Ткаченко О.Я. Роль генетических факторов в развитии тяжелой atopической бронхальной астмы у детей // Здоровье ребенка. — 2012. — Т. 5, № 40. — С. 58—62.
- Bhakta N.R., Woodruff P.G. Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again // Immunological reviews. — 2011. — Vol. 242, N 1. — P. 220—232.
- Holgate S.T. Innate and adaptive immune responses in asthma // Nature medicine. — 2012. — Vol. 18, N 5. — P. 673—683.
- Kuskucu M.A., Karaca N., Midilli K. et al. The effect of CD14 and TLR4 gene polymorphisms on asthma phenotypes in adult Turkish asthma patients: a genetic study // BMC pulmonary medicine. — 2014. — Vol. 14, N 1. — 20 p.
- Lambrech B.N., Hammad H. The immunology of asthma // Nature immunology. — 2015. — Vol. 16, N 1. — P. 45—56.
- Lundberg A., Wikberg L.A., Ilonen J. et al. Lipopolysaccharide-induced immune responses in relation to the TLR4 (Asp299Gly) gene polymorphism // Clin. Vaccine Immunol. — 2008. — Vol. 15, N 12. — P. 1878—1883.
- Sheehan W.J., Petty C.R., Coull B. et al. School endotoxin exposure is associated with increased asthma morbidity // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2014. — Vol. 189. — P. A2288.
- Simpson A., Martinez F.D. The role of lipopolysac-

- haride in the development of atopy in humans // Clin. Exp. Allergy. — 2010. — Vol. 40, N 2. — P. 209—223.
11. Strachan D.P. Hay fever, hygiene, and household size // BMJ: Brit. Med. J. — 1989. — Vol. 299, N 6710. — P. 1259—1960.
 12. Tesse R., Pandey R.C., Kabesch M. Genetic variations in toll-like receptor pathway genes influence asthma and atopy // Allergy. — 2011. — Vol. 66, N 3. — P. 307—316.
 13. Yang I.A., Barton S.J., Rorke S. et al. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics // Genes Immunol. — 2004. — Vol. 5, N 1. — P. 41—45.
 14. Zaborowski T., Wojas-Krawczyk K., Krawczyk P. et al. The effect of CD14 and TLR4 gene polymorphisms on the occurrence of atopic and non-atopic asthma // Adv. Clin. Exp. Med. — 2011. — Vol. 20, N 4. — P. 413—421.

Ю.А. Бисюк

Антиэндотоксиновый иммунитет и Asp299Gly полиморфизм TLR-4 у взрослых больных с atopической и неатопической бронхиальной астмой

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев

Цель работы — изучение состояния антиэндотоксинового иммунитета в зависимости от генотипов полиморфного участка Asp299Gly гена рецептора TLR-4 у больных с atopической и неатопической бронхиальной астмой (БА) в популяции АР Крым.

Материалы и методы. Состояние антиэндотоксинового иммунитета в зависимости от Asp299Gly полиморфизма TLR-4 рецептора изучено у 275 больных с atopической и 56 — с неатопической БА.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования показали, что для atopической БА характерна активизация гуморального, специфического звена (увеличение уровня анти-ЭТ-IgG) антиэндотоксинового иммунитета, а для неатопической — местного, неспецифического (повышение уровня sCD14) в ассоциации с дефицитом уровня анти-ЭТ-sIgA. Анализ антиэндотоксинового иммунитета в зависимости от генотипов не выявил различий — все показатели достоверно не отличались ($p < 0,05$) между собой.

Выводы. Эндотоксин-опосредованное хроническое воспаление при бронхиальной астме зависит от atopического или неатопического фенотипа заболевания и не зависит от Asp299Gly полиморфизма TLR-4 рецептора.

Ключевые слова: бронхиальная астма, эндотоксин, Asp299Gly полиморфизм рецептора TLR-4.

Yu.A. Bisyuk

Anti-endotoxin immunity and Asp299Gly polymorphism of TLR-4 gene in adult patients with atopical and non-atopical asthma

O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Objective. To study the state of anti-endotoxin immunity depending on the genotype polymorphism of Asp299Gly gene receptor TLR-4 in adult patients with atopical and non-atopical asthma in the Crimean population.

Materials and methods. The state of anti-endotoxin immunity has been researched as function of polymorphism (Asp299Gly) TLR-4 in 275 adult patients with atopical bronchial asthma (BA) and 56 patients with non-atopical BA.

Results and discussion. The results have shown that atopical asthma is characterized by activation of the humoral and specific part (an increase of the level of anti-endotoxin antibodies of class G) of anti-endotoxin immunity, while non-atopical asthma is featured with activation of the local non-specific one (an increase in sCD14) in association with deficient levels of secretory anti-endotoxin antibodies of class A. The analysis of anti-endotoxin immunity depending on the genotypes revealed no differences — all parameters were not significantly different ($p < 0.05$).

Conclusions. Endotoxin-mediated chronic inflammation at bronchial asthma depends on the atopical or non-atopical phenotype of a patient and has no dependence from the Asp299Gly polymorphism of TLR-4.

Key words: bronchial asthma, endotoxin, Asp299Gly polymorphism of TLR-4.