



Ю.А. Бісюк

Asp299Gly поліморфізм гена TLR-4 та антиендотоксинний імунітет у хворих на бронхіальну астму з фіксованою/оборотною обструкцією в популяції АР Крим

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

Мета роботи — вивчити Asp299Gly поліморфізм гена TLR-4 та антиендотоксинний імунітет у хворих на бронхіальну астму з фіксованою/оборотною обструкцією в популяції АР Крим.

Матеріали та методи. У дослідженні взяв участь 331 хворий на бронхіальну астму. Групу контролю для генетичного дослідження склали 285 волонтерів, а для оцінки антиендотоксинного імунітету — 92 практично здорових мешканця АР Крим.

Результати та обговорення. У контрольній групі частота розподілу генотипів (AA — 242, AG — 40, GG — 3) вірогідно не відрізнялася від такої у хворих на бронхіальну астму з фіксованою (AA — 122, AG — 28, GG — 1, $\chi^2 = 1,65$; $p = 0,44$) і оборотною обструкцією (AA — 139, AG — 38, GG — 3, $\chi^2 = 4,41$; $p = 0,11$). Частота гетерозиготного (AG) і гомозиготного (GG) генотипу превалювала у пацієнтів з оборотною обструкцією (AG + GG — 23 %) порівняно з контролем (AG + GG — 15 %, $\chi^2 = 4,41$; $p = 0,04$). Стан антиендотоксинного імунітету не залежить від Asp299Gly поліморфізму гена TLR-4.

Висновки. Ризик розвитку бронхіальної астми з оборотною обструкцією в популяції АР Крим пов'язаний із переважанням генотипів AG і GG поліморфної ділянки Asp299Gly гена TLR-4.

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

Бронхіальна астма (БА) належить до гетерогенних хвороб, у патогенезі якої провідне місце займає хронічне запалення [8]. Її клінічні симптоми зазвичай пов'язані з обструкцією бронхів, яка може бути оборотною спонтанно або після адекватної терапії [10]. У частини хворих на БА обструкція бронхів може бути необоротною, попри оптимальну фармакотерапію. Дані про частоту такого фенотипу астми досить сильно відрізняються і в середньому становлять від 20 до 50 % хворих [4].

Фіксована обструкція, на відміну від оборотної, може бути асоційована з виразнішим патологічним ремоделюванням бронхіальної стінки під дією різних запальних медіаторів, у тому числі тих, що виділяють еозинофіли, нейтрофіли та інші імунокомпетентні клітини [6]. Відомо, що ендотоксин грамнегативних бактерій є сильним стимулятором цих клітин. Ефекти ендотоксину реалізуються через стимуляцію рецепторного комплексу CD14/TLR-4/MD2, що призводить до гіпер-

продукції прозапальних цитокінів, які посилюють ремоделювання бронхів [7].

Ефекти дії ендотоксину у хворих на БА мають дозозалежний і віковий аспекти. Так, у ранньому віці ендотоксин, очевидно, має позитивний ефект, який реалізується через активацію Т-хелперів 1-го типу і пригнічення синтезу IgE. Хронічне запалення при БА зазвичай потенціюється ендотоксином [3]. Такі дуальні ефекти можуть бути пов'язані з поліморфізмом генів, що кодують рецептори до ендотоксину [5].

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

У популяції АР Крим поліморфізм Asp299Gly гена рецептора TLR-4 та стан антиендотоксинного імунітету у хворих на БА з фіксованою/оборотною обструкцією не досліджували.

Мета роботи — вивчити стан антиендотоксинного імунітету і Asp299Gly поліморфізм гена TLR-4 у хворих на бронхіальну астму з фіксованою/оборотною обструкцією в популяції АР Крим.

Стаття надійшла до редакції 1 березня 2015 р.

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

Матеріали та методи

У дослідженні взяв участь 331 хворий на БА. Встановлювали діагноз і лікували пацієнтів 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».

Ступінь обструкції визначали за ступенем постбронходилатаційного співвідношення ОФВ₁/ФЖЕЛ. Для фіксованої обструкції воно становило < 0,7 (70 %), а для оборотної — > 0,7 (70 %) [4].

Група контролю для генетичного дослідження складалася з 285 волонтерів, а для оцінки антиендотоксичного імунітету обстежували 92 практично здорових мешканців АР Крим. У всіх волонтерів визначали схильність до алергічної патології за допомогою вивчення анамнезу та шкірних алерго-тестів. Для проведення шкірних «прик»-тестів використовували алергени виробництва «Імунолог» (Вінниця).

Для аналізу поліморфізму гена TLR-4 (Asp299Gly) використано метод алейспецифічної 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 алейспецифічної ПЛР здійснювали за допомогою наборів «Мутація Толл-подібного рецептора 4 Asp299Gly, rs4986790» («Літех», РФ) за інструкцією виробника. Детекцію продуктів ампліфікації виконували за методом горизонтального електрофорезу з використанням набору виробництва «Літех» (РФ).

Рівні антиендотоксичних антитіл класів А, М, G (відповідно анти-ЕТ-IgA, анти-ЕТ-IgM і анти-ЕТ-IgG) визначали за методом твердофазного імуоферментного аналізу. Рівні анти-ЕТ-IgA, анти-ЕТ-IgM і анти-ЕТ-IgG виражали в умовних одиницях оптичної щільності кінцевого продукту ферментативної реакції [2]. Секреторний антиендотоксичний імуноглобулін А (анти-ЕТ-sIgA) в індукованому харкотинні визначали за методом твердофазного імуоферментного аналізу за протоколами, розробленими в лабораторії клінічної імунології ЦНДЛ ДУ «Кримський державний медичний університет імені С.І. Георгієвського» [1].

Рівень sCD14 у сироватці та індукованому харкотинні визначали за методом твердофазного імуоферментного аналізу з використанням тест-системи «Hbt Human sCD14 ELISA Kit, Product Number: НК320» виробництва Hucult biotechnology (Голландія). Оптичну щільність

встановлювали на аналізаторі StatFax 2100 на довжині хвилі 450 нм. Вміст sCD14 у сироватці виражали в мкг/мл, в індукованому харкотинні — в нг/мл.

Усі результати піддано статистичній обробці для параметричних і непараметричних критеріїв із використанням програми «Minitab 16». Для аналізу перевірки розподілу на нормальність використовували тест Колмогорова—Смирнова, порівняння центральних тенденцій двох незалежних вибірок із застосуванням U-критерію Манна—Уїтні і порівняння середніх двох незалежних вибірок за критерієм Стюдента. Кількісні змінні наведено у вигляді середніх значень і середньоквадратичних відхилень для параметричних методів та медіани з 1 і 3 квантилями для непараметричних. Під час множинного порівняння показників антиендотоксичного імунітету використовували критерій Краскала—Уолліса.

Для встановлення розподілу генотипів відповідно до закону Харді—Вейнберга використовували точний тест Фішера і χ^2 . Для визначення різниці частоти генотипів і алелей контролю та хворих на БА використано логістичну регресію за допомогою on-line калькулятора (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Ризик за алелем G мав на увазі домінуючу модель G, коли частота генотипу AG об'єднується з генотипом GG і порівнюється з генотипом AA. Частоту алеля A вираховували за формулою: частота алеля A = $nAA \cdot 2 + nAG$, де nAA — кількість досліджуваних із генотипом AA, nAG — з генотипом AG. Для алеля G використовували аналогічну формулу: частота алеля G = $nGG \cdot 2 + nAG$, де nGG — кількість досліджуваних з генотипом GG, nAG — з генотипом AG.

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

Результати та обговорення

За результатами спірометрії виявлено 151 хворого на БА з фіксованою та 180 — з необоротною обструкцією. Дані про розподіл частоти генотипів TLR-4 (Asp299Gly) у хворих на БА з фіксованою обструкцією і здорових волонтерів наведено в табл. 1.

Частота розподілу генотипів у хворих на БА (табл. 1) з фіксованою обструкцією (AA — 122 (81 %), AG — 28 (18 %), GG — 1 (1 %)) достовірно не відрізнялась ($\chi^2 = 1,651$; $p = 0,438$) від контролю (AA — 242 (85 %), AG — 40 (14 %), GG — 3 (1 %)). Проведення логістичної регресії з використанням

Таблиця 1

Розподіл генотипів TLR-4 (Asp299Gly) у хворих на БА з фіксованою обструкцією і здорових волонтерів

Показник	Контроль (n = 285)	БА з фіксованою обструкцією (n = 151)	ВШ, ДІ, χ^2 , p
Розподіл генотипів			
AA	242 (85 %)	122 (81 %)	$\chi^2 = 1,65$; p = 0,438
AG	40 (14 %)	28 (18 %)	
GG	3 (1 %)	1 (1 %)	
Ризик за алелем G ([AA]<->[AG + GG])			
AA	242 (85 %)	122 (81 %)	ВШ = 1,338; ДІ = [0,796—2,248] $\chi^2 = 1,21$; p = 0,270
AG + GG	43 (15 %)	29 (19 %)	
Різниця частот алелів			
A	524 (92 %)	272 (90 %)	[A]<->[G] ВШ = 1,256; ДІ = [0,775—2,036] $\chi^2 = 0,86$; p = 0,353
G	46 (8 %)	30 (10 %)	[G]<->[A] ВШ = 0,796; ДІ = [0,491—1,290] $\chi^2 = 0,86$; p = 0,353

Примітка (тут і далі). ВШ — відношення шансів; ДІ — 95 % довірчий інтервал; p — достовірність відмінностей.

моделі ризику за алелем G, а також різниці алелів не показало достовірних відмінностей у пацієнтів даного фенотипу БА у порівнянні з контролем.

Наступним етапом роботи став аналогічний статистичний аналіз у хворих на БА з оборотною обструкцією. Дані по розподілу частоти генотипів TLR-4 (Asp299Gly) у пацієнтів на БА з оборотною обструкцією і здорових волонтерів представлені в табл. 2.

Розподіл генотипів (табл. 2) у хворих на БА з оборотною обструкцією (AA — 139 (77 %), AG — 38 (21 %), GG — 3 (2 %)) також достовірно не відрізнявся від контрольної групи (AA — 242 (85 %), AG — 40 (14 %), GG — 3 (1 %)). Хоча при викорис-

танні моделі ризику за алелем G були отримані достовірні відмінності ($\chi^2 = 4,41$; p = 0,036), які вказують на превалювання генотипу AG + GG у пацієнтів з оборотною обструкцією БА (23 %) в порівнянні до контролю (15%). Відношення шансів при порівнянні різниці частоти алелів A і G були достовірними (1,586 [1,025—2,454], $\chi^2 = 4,35$; p = 0,037) і вказували на превалювання алеля G у пацієнтів з оборотною обструкцією БА.

Таким чином, аналізуючи отримані результати щодо розподілу генотипів досліджуваного поліморфізму, можливо припустити, що встановлені закономірності можуть бути пов'язані зі станом антиендотоксичного імунітету.

Таблиця 2

Частота розподілу генотипів TLR-4 (Asp299Gly) рецептора у пацієнтів з оборотною обструкцією і здорових волонтерів

Показник	Контроль (n = 285)	БА з оборотною обструкцією (n = 180)	ВШ, ДІ, χ^2 , p
Розподіл генотипів			
AA	242 (85 %)	139 (77 %)	$\chi^2 = 4,412$; p = 0,110
AG	40 (14 %)	38 (21 %)	
GG	3 (1 %)	3 (2 %)	
Ризик за алелем G ([AA]<->[AG + GG])			
AA	242 (85 %)	139 (77 %)	ВШ = 1,660; ДІ = [1,031—2,672] $\chi^2 = 4,41$; p = 0,036
AG + GG	43 (15 %)	41 (23 %)	
Різниця частот алелів			
A	524 (92 %)	316 (88 %)	[A]<->[G] ВШ = 1,586; ДІ = [1,025—2,454] $\chi^2 = 4,35$; p = 0,037
G	46 (8 %)	44 (12 %)	[G]<->[A] ВШ = 0,630; ДІ = [0,408—0,975] $\chi^2 = 4,35$; p = 0,037

Таблиця 3

Показники антиендотоксинного імунітету залежно від генотипів TLR-4 (Asp299Gly) рецептора у хворих на БА з фіксованою обструкцією

Показник	Контроль (n = 92)	AA (n = 122)	AG + GG (n = 29)	P, Т. К—У
Анти-ЕТ-IgA (од. опт. щ.)	0,266 (0,184—0,354)	0,249 (0,193—0,354)	0,258 (0,189—0,345)	0,585
Анти-ЕТ-IgM (од. опт. щ.)	0,322 (0,203—0,400)	0,424 ^a (0,334—0,517)	0,393 ^a (0,338—0,481)	< 0,001
Анти-ЕТ-IgG (од. опт. щ.)	0,357 (0,261—0,442)	1,118 ^a (0,855—1,409)	0,907 ^a (0,687—1,291)	< 0,001
Анти-ЕТ-sIgA (од. опт. щ.)	0,178 (0,119—0,217)	0,149 (0,109—0,202)	0,164 (0,126—0,189)	0,139
sCD14, сироватка (мкг/мл)	4,99 (3,53—6,90)	5,44 (3,48—7,23)	5,26 (3,40—7,96)	0,506
sCD14, індуковане мокротиння (нг/мл)	6,7 (4,3—9,3)	8,8 ^a (5,8—12,0)	8,2 (5,7—10,3)	< 0,002

Примітка. ^a — достовірність відмінностей контролю і груп AA, AG + GG, $p < 0,05$; ^b — достовірність відмінностей груп AA і AG + GG, $p < 0,05$; Т. К—У — тест Краскела—Уолліса.

Рівні антиендотоксинних антитіл класу А (табл. 3) в сироватці та індукованому мокротинні для генотипів AA і AG + GG достовірно не відрізнялись ($p > 0,05$) від значень контрольної групи. Вміст анти-ЕТ-IgM та анти-ЕТ-IgG у хворих на БА з фіксованою обструкцією для обох генотипів був достовірно вище ($p < 0,05$) контролю, хоча різниці між генотипами встановити не вдалось. Рівень sCD14 у сироватці достовірно не відрізнявся ($p = 0,506$) від контролю, а для генотипу AA спостерігалось збільшення даного медіатора в індукованому мокротинні ($p < 0,002$).

Результати, які представлені в табл. 4, свідчать про те, що рівень анти-ЕТ-IgA достовірно не від-

різняється ($p = 0,849$) від контролю. Вміст специфічних антитіл до ендотоксину класу М і G та неспецифічного медіатора sCD14 як у сироватці, так й індукованому мокротинні був достовірно вище ($p < 0,01$) контролю для обох генотипів. Рівень секреторних антиендотоксинних антитіл класу А був достовірно нижче ($p = 0,023$) контролю тільки для AA генотипу.

Отже, результати нашої роботи вказують на зв'язок мутантних генотипів AG і GG з ризиком виникнення БА з оборотною обструкцією. Стан антиендотоксинного імунітету характеризується активацією його адаптивних та вроджених компонентів і не залежить від Asp299Gly поліморфізму TLR-4.

Таблиця 4

Показники антиендотоксинного імунітету залежно від генотипів TLR-4 (Asp299Gly) рецептора у хворих на БА з оборотною обструкцією

Показник	Контроль (n = 92)	AA (n = 139)	AG + GG (n = 41)	P, Т. К—У
Анти-ЕТ-IgA (од. опт. щ.)	0,266 (0,184—0,354)	0,255 (0,209—0,322)	0,269 (0,175—0,334)	0,849
Анти-ЕТ-IgM (од. опт. щ.)	0,322 (0,203—0,400)	0,397 ^a (0,312—0,489)	0,354 ^a (0,317—0,437)	< 0,001
Анти-ЕТ-IgG (од. опт. щ.)	0,357 (0,261—0,442)	0,971 ^a (0,693—1,248)	0,958 ^a (0,593—1,315)	< 0,001
Анти-ЕТ-sIgA (од. опт. щ.)	0,178 (0,119—0,217)	0,150 ^a (0,114—0,193)	0,168 (0,126—0,196)	0,023
sCD14, сироватка (мкг/мл)	4,99 (3,53—6,90)	5,62 ^a (4,27—8,02)	6,36 ^a (4,54—8,63)	0,013
sCD14, індуковане мокротиння (нг/мл)	6,7 (4,3—9,3)	9,6 ^a (5,8—14,1)	9,8 ^a (7,3—16,8)	< 0,001

Примітка. ^a — достовірність відмінностей контролю і груп AA, AG + GG, $p < 0,05$; ^b — достовірність відмінностей груп AA і AG + GG, $p < 0,05$; Т. К—У — тест Краскела—Уолліса.

Дана інформація може використовуватись для прогнозування ризику виникнення даного фенотипу астми, хоча для більш широкого розуміння зв'язку поліморфізму Asp299Gly гена TLR-4 необхідно проаналізувати дані результати з урахуванням інших клінічних фенотипів або патофізіологічних ендотипів.

Висновки

1. Ризик розвитку бронхіальної астми з оборотною обструкцією в популяції АР Крим пов'язаний

з превалюванням генотипів AG і GG поліморфної ділянки Asp299Gly гена TLR-4.

2. Стан антиендотоксिनного імунітету у хворих на бронхіальну астму з фіксованою/оборотною обструкцією не залежить від поліморфізму Asp299Gly гена рецептора TLR-4.

Перспективи подальших досліджень. Доцільним є вивчення зв'язку поліморфізму Asp299Gly гена рецептора TLR-4 в залежності від поділу хворих на інші фенотипи бронхіальної астми.

Література

1. Гордиенко А.И. Использование твердофазного иммуноферментного анализа для определения общего и антиэндотоксिनного секреторного IgA человека // Таврический медико-биологический вестн. — 2009. — Т. 12, № 3. — С. 82—89.
2. Гордієнко А.І., Білоглазов В.О. Патент 70193 А Україна МКІ 7 А61К31/01. Спосіб визначення анти-тіл до ліпополісахаридів грамнегативних бактерій; Заявл. 29.12.2003; Опубл. 15.09.2004, Бюл. № 9.
3. Brix S., Eriksen C., Larsen J. M. et al. Metagenomic heterogeneity explains dual immune effects of endotoxins // The Journal of Allergy and Clinical Immunology. — 2015. — Vol. 135, N 1. — P. 277—280.
4. Contoli M., Baraldo S., Marku B. et al. Fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease: 5-year follow-up // Journal of Allergy and Clinical Immunology. — 2010. — Vol. 125, N 4. — P. 830—837.
5. Hussein Y.M., Awad H.A., Shalaby S.M. et al. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms and susceptibility to asthma and allergic rhinitis: a case-control analysis // Cell. Immunol. — 2012. — Vol. 274, N 1—2. — P. 34—38.
6. Lambrecht B.N., Hammad H. The immunology of asthma // Nature immunology. — 2015. — Vol. 16, N 1. — P. 45—56.
7. Simpson A., Martinez F.D. The role of lipopolysaccharide in the development of atopy in humans // Clinical & Experimental Allergy. — 2010. — Vol. 40, N 2. — P. 209—223.
8. Wenzel S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches // Nature medicine. — 2012. — Vol. 18, N 5. — P. 716—725.
9. Yang I.A., Barton S.J., Rorke S. et al. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics // Genes Immun. — 2004. — Vol. 5, N 1. — P. 41—45.
10. Yii A.C., Tan G.L., Tan K.L. et al. Fixed airways obstruction among patients with severe asthma: findings from the Singapore general hospital-severe asthma phenotype study // BMC pulmonary medicine. — 2014. — Vol. 14, N 1. — 191 p.

Ю.А. Бисюк

Asp299Gly поліморфізм гена TLR-4 і антиендотоксинний імунітет у больових с бронхіальною астмою с фіксованою/обратимою обструкцією в популяції АР Крим

Національний медичний університет імені А.А. Богомольця, г. Київ

Цель работы — изучить Asp299Gly поліморфізм гена TLR-4 і антиендотоксинний імунітет у больових с бронхіальною астмою с фіксованою/обратимою обструкцією в популяції АР Крим.

Материалы и методы. В исследование был включен 331 больовий с бронхіальною астмою. Групу контролю для генетического исследования составили 285 волонтеров, а для оценки антиендотоксинного імунітета 92 практично здоровых лица АР Крим.

Результаты и обсуждение. В контрольной группе частота распределения генотипов (AA — 242, AG — 40, GG — 3) достоверно не отличалась от бронхіальної астмы с фіксованою (AA — 122, AG — 28, GG — 1, $\chi^2 = 1,65$; $p = 0,44$) и обратимою обструкцією (AA — 139, AG — 38, GG — 3, $\chi^2 = 4,41$; $p = 0,11$). Частота гетерозиготного (AG) и гомозиготного (GG) генотипа преваляровала у пациентов с обратимою обструкцією (AG + GG — 23 %) по сравнению с контролем (AG + GG — 15 %, $\chi^2 = 4,41$; $p = 0,04$).

Выводы. Риск развития бронхіальної астмы с обратимою обструкцією в популяції АР Крим связан с превалярованием генотипов AG и GG поліморфного участка Asp299Gly гена TLR-4.

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

Yu.A. Bisyuk

Asp299Gly polymorphism of TLR-4 gene and anti-endotoxin immunity in adult patients with fixed/reversible obstructive asthma in the population of AR of Crimea

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

Objective. To study the Asp299Gly polymorphism of TLR-4 and anti-endotoxin immunity in patients with fixed/reversible obstructive asthma in Crimean population.

Materials and methods. Investigation involved 331 patients with bronchial asthma. The control group included 285 volunteer for genetic research and 92 healthy individuals to assess the anti-endotoxin immunity.

Results and discussion. The frequency distribution of genotypes in the control group (AA — 242, AG — 40, GG — 3) did not differ significantly from the fixed asthma (AA — 122, AG — 28, GG — 1, $\chi^2 = 1.65$; $p = 0.44$) and reversible obstructive one (AA — 139, AG — 38, GG — 3, $\chi^2 = 4.41$; $p = 0.11$). The frequency of heterozygous (AG) and homozygous (GG) genotype in patients with reversible obstruction asthma (AG + GG — 23 %) were higher compare to control (AG + GG — 15 %, $\chi^2 = 4.41$; $p = 0.04$).

Conclusions. The risk of reversible obstructive asthma in population of Crimea is associated with the prevalence of AG and GG genotypes of Asp299Gly gene TLR-4.

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