



УДК 616.5-002.2

ВОЛОСОВЕЦЬ О.П., КРИВОПУСТОВ С.П., ПАВЛИК О.В., ЄМЕЦЬ О.В., СТРОЙ Д.О., ДОСЕНКО В.Є.
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ

АСОЦІАЦІЯ ВАРІАЦІЙ ГЕНІВ *POMP*, *FLG*, *MTOR* ТА *ATG5* ІЗ РИЗИКОМ РОЗВИТКУ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ В ДІТЕЙ

Резюме. Метою даного дослідження було визначити зв'язок однонуклеотидних поліморфізмів у гені білка дозрівання протеасоми (*POMP*), філагрину (*FLG*), білка-мішені рапаміцину (*MTOR*) та автофагії (*ATG5*) із розвитком бронхіальної астми в дітей.

Методи: клінічні, генетичні — визначення генотипу хворих і здорових дітей за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі; статистичні.

Результати. Установлено, що розподіл генотипів у досліджених групах вірогідно відрізняється при аналізі поліморфізму *POMP*: GG-варіант виявлений у 9 здорових дітей та відсутній у групі хворих, 32 пацієнти і 37 здорових дітей мали AG-варіант, 62 і 52 відповідно — мали алейний варіант AA, до того ж мінорний варіант взагалі не зустрічався у хворих на бронхіальну астму ($p < 0,05$ за χ^2 -критерієм). Варіанти з мінорним генотипом гена *FLG* виявилися у 2,5 раза частіше у хворих, ніж у контрольній групі: у 5 пацієнтів і у 2 здорових дітей був наявний алейний варіант AA, 27 і 36 — відповідно мали гетерозиготний варіант GA, 67 і 61 — відповідно мали варіант GG. Варіанти з мінорним генотипом у гені *MTOR* виявилися у 2,4 раза частіше в контрольній групі, ніж серед хворих: у 50 пацієнтів і 43 здорових дітей наявний мажорний алейний варіант TT, 36 пацієнтів і 32 здорові дитини мали варіант TC, 5 і 12 — відповідно мали варіант CC. Отримано статистично вірогідну різницю в розподілі генотипів поліморфізму гена *ATG5*: у 51 хворої дитини та 43 здорових дітей був гетерозиготний варіант CT, у 29 та 21 відповідно — мінорний варіант TT, у 18 та 33 відповідно — мажорний варіант CC ($p < 0,05$ за χ^2 -критерієм). Мінорний генотип поліморфізму гена *ATG5* асоціюється з підвищеним ризиком ранньої маніфестації бронхіальної астми (до 3 років життя) ($p < 0,05$ за χ^2 -критерієм). За результатами MDR-аналізу виявлено, що поліморфізм гена *ATG5* виявився найбільш сильним предиктором розвитку бронхіальної астми, оскільки зменшує рівень ентропії на 7,88 %. При цьому поліморфізм гена *POMP* зменшує рівень ентропії на 5,21 %, поліморфізм гена *MTOR* — на 1,18 %, поліморфізм гена *FLG* — на 1,04 %.

Висновки. Досліджені поліморфізми можуть бути використані як прогностичні маркери розвитку бронхіальної астми в дітей.

Ключові слова: однонуклеотидний поліморфізм, філагрин, протеасомний протеоліз, автофагія, *MTOR*, бронхіальна астма, педіатрія.

Вступ

Сьогодні найбільш поширеним методом вивчення генетичних основ бронхіальної астми є пошук асоціацій захворювання з поліморфізмом кандидатних генів. Наявність поліморфізму може призводити до зміни рівня експресії даних генів і/або зміни структури їх білкових продуктів. Для поліморфізмів у кодуючих регіонах можна передбачити наслідки для структури та функції протеїнів, хоча такі прогнози повинні бути емпірично перевірені. Однак більшість поліморфізмів у геномі людини знаходяться в некодуючій ДНК. Варіанти, розташовані в промоутері, можуть змінити експресію генів шляхом зміни зв'язуючих сайтів транскрипційних факторів або шляхом більш тонких механізмів.

Установлено, що в патогенезі atopічних захворювань характерним є спрямування антигенпрезентуючими клітинами (АПК) імунологічної відповіді в бік Т-хелперів 2-го типу, що продукують цитокіни, які регулюють алергенспецифічний синтез IgE (IL-4), поповнюють пул еозинофілів (IL-5), тучних

Адреса для листування з авторами:
Досенко Віктор Євгенович
E-mail: dosenko@biph.kiev.ua

© Волосовець О.П., Кривоустов С.П., Павлик О.В., Ємець О.В., Строй Д.О., Досенко В.Є., 2016
© «Здоров'я дитини», 2016
© Заславський О.Ю., 2016

клітин (IL-9) та зумовлюють гіперреактивність дихальних шляхів при бронхіальній астмі (IL-13) [1, 2]. Отже, можна передбачити, що саме особливості презентації антигенів АПК лежать в основі розвитку atopії.

У даному контексті особливу увагу дослідників привертають автофагія (забезпечується лізосомним апаратом) та протеасомний протеоліз, що забезпечують деградацію протеїнів, здійснюють контроль якості протеїнів, які синтезуються в клітині, та загалом забезпечують функціонування та життєздатність клітин. Продукти деградації протеїнів, що утворюються при роботі лізосомного та протеасомного протеолізу, є не просто «відпрацьованим» матеріалом, а ключовими факторами стимуляції імунітету, бо презентуються АПК усім іншим імунним клітинам [3].

Імунопротеасоми, формування яких відбувається під впливом IFN- γ , виконують функції презентації антигенів у МНС I типу CD8⁺-Т-клітинам. Також останнім часом у вивченні патогенезу алергічної відповіді увага приділяється продуктам протеасомного протеолізу, що призводять до активації факторів транскрипції та внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Наприклад, протеасоми здійснюють деградацію інгібіторних білків I κ B, що призводить до активації Nuclear factor- κ B — фактора транскрипції, який відіграє ключову роль в експресії прозапальних генів, що призводить до синтезу хемокінів, цитокінів, молекул адгезії, ензимів, у тому числі IL-4, IL-5, IL-13. У неактивному стані Nuclear factor- κ B є приєднаним до I κ B інгібуючого протеїну, що маскує послідовності нуклеотидів і утримує комплекс у цитоплазмі.

Формування каталітично активної протеасоми відбувається шляхом об'єднання двох симетричних прехолопротеасом, що стає можливим при наявності протеїну дозрівання протеасом POMP, який одразу стає першим субстратом для деградації новоствореної органели.

З урахуванням участі протеасом у деградації інгібіторів факторів транскрипції ключових для atopії прозапальних генів застосування блокаторів протеасом розглядається як можливий напрямок терапії. Однак, з іншого боку, дані препарати впливають на посттрансляційну обробку структурних білків шкіри, особливо філагрину, що спричиняє зниження захисного бар'єра [11].

При дослідженні ролі POMP у нормальній епідермальній диференціації при імуногістохімічному аналізі біоптатів шкіри пацієнтів із KLICK-синдромом було виявлено уражену експресію POMP, субодиниць протеасоми та маркера епідермальної диференціації філагрину [12].

Залишається незрозумілим, як дефект у FLG може вплинути на розвиток таких захворювань, як алергічний риніт, астма та харчова алергія. Адже філаггрин знайдений лише в епідермісі, слизовій рота, епітелії присінку порожнини носа, і його немає в слизовій оболонці тих органів, де проявляються ці захворювання [13, 14].

Разом з антигенпрезентацією та позаклітинними цитокиновими сигналами в імунній стимуляції лімфоцитів важливе значення мають внутрішньоклітинні механізми автофагічного каскаду. Так, дослідниками [8] була вивчена здатність сигнального шляху *MTOR* (mammalian target of rapamycin) модулювати імунну відповідь та клітинну проліферацію. *MTOR* також відіграє значну роль у регуляції сигналів цитокінів, диференціюванні та розвитку ефektorних Th-клітин, дозріванні та дегрануляції тучних клітин, регуляції процесу презентації антигену шляхом автофагії, що згодом призведе до формування Th2-клітинного фенотипу. До того ж відомо, що *MTOR* також бере участь у процесі росту, дозрівання тучних клітин і секреції цитокінів.

Автофагія відіграє ключову роль у презентації цитозольних, ядерних антигенів, а також антигенів внутрішньоклітинних патогенів у МНС II комплексі АПК CD4⁺-Т-клітинам. Тобто активація Т-хелперів залежить від рівня активності автофагії. Цікаво, що Т-хелпери 2-го типу мають вищі показники активності автофагії, ніж Т-хелпери 1-го типу [4]. Окрім того, як свідчать дані, автофагія бере участь у розвитку та диференціації В-лімфоцитів, її активація асоціюється з посиленням експресії В-клітинного рецептора [5]. Виявлена також роль автофагії в процесах дегрануляції тучних клітин із вивільненням типових для atopії медіаторів [6].

Формування автофагосоми є складним процесом із залученням щонайменш 31 протеїну, пов'язаного з автофагією (Atg). Процес елонгації мембрани даної структури залежить від функціонування комплексу Atg12 — Atg5 — Atg16, при цьому вирішальне значення має наявність протеїну Atg5 [7].

Виходячи з наведених даних, ми припустили, що поліморфізми в генах POMP, FLG, MTOR та ATG5 можуть бути пов'язані з розвитком алергічного фенотипу в дитячому віці. Для перевірки цієї гіпотези ми досліджували відмінності в частоті чотирьох поліморфізмів у дітей без алергічної патології (контрольна група) та дітей із бронхіальною астмою та іншими супутніми алергічними захворюваннями (атопічний дерматит або алергічний риніт), а також взаємозв'язок між цими чотирма поліморфізмами за допомогою методу багатофакторного зменшення просторовості (MDR).

Матеріали та методи

Поліморфізм rs11121704 у гені *MTOR* досліджувався в 91 дитини, поліморфізм rs510432 у гені *ATG5* — у 98 дітей, поліморфізм rs11204981 у гені *FLG* — у 99 дітей та поліморфізм rs4769628 гена *POMP* — у 95 дітей віком від 5 до 18 років із бронхіальною астмою та іншими супутніми алергічними захворюваннями (атопічний дерматит або алергічний риніт), які перебували на стаціонарному лікуванні в алергологічному відділенні Київської міської дитячої клінічної лікарні № 2. Групу конт-

ролю становили 99 дітей віком від 5 до 18 років без алергічної патології на момент огляду чи в анамнезі для rs11204981 у гені *FLG*, 98 дітей — для rs4769628 у гені *POMP*, 97 — для rs510432 у гені *ATG5*, 87 — для rs1121704 у гені *MTOR*. Діти з групи контролю мали негативні результати шкірних прік-тестів та/або задовільні результати спірографії, а також негативні дані щодо наявності алергічних захворювань у батьків та найближчих родичів.

Установлення діагнозу atopічного дерматиту відбувалося на основі даних, внесених батьками в адаптовану затверджену анкету (ISAAC), що включали в себе скарги на висип, сухість шкіри, лущення, свербіж упродовж дитинства. Наявність бронхіальної астми встановлювалася на основі даних зі слів батьків щодо персистуючого свистячого дихання (≥ 2 епізодів нападів, не пов'язаних з інфекцією верхніх дихальних шляхів), даних спірографії (знижений $ОФВ_1$ і співвідношення $ОФВ_1/ФЖЄЛ$, позитивний тест з β_2 -агоністами), з урахуванням підвищення рівня сироваткового загального IgE, позитивного шкірного прік-тесту з алергенами. Шкірні прік-тести були проведені та інтерпретовані згідно з протоколом Global Allergy and Asthma European Network із використанням загальної панелі інгаляційних алергенів на основі опублікованих методичних рекомендацій (документ EAACI та протокол ISAAC II фаза). Батьки підписали інформовану згоду до включення до дослідження.

Вибір SNP

Поліморфізм rs1121704 у гені *MTOR*, rs510432 у гені *ATG5*, rs11204981 у гені *FLG* та rs4769628 гена *POMP* були обрані для генотипування, оскільки, за літературними даними, зустрічаються у європейській популяції та гіпотетично можуть впливати на розвиток алергічного фенотипу.

Виділення ДНК

Забір букальної епітелію проводився з використанням букальних штирок із наступним заморожуванням зразків та їх зберіганням при температурі -20 °C. ДНК для генотипування екстрагували із зразків із використанням наборів Diatom™Prep 200 («Лаборатория Изоген», РФ) відповідно до протоколу виробника. Концентрацію ДНК визначали за допомогою NanoDrop спектрофотометра ND1000 (NanoDrop Technologies Inc., США).

Полімеразна ланцюгова реакція

Реакції ампліфікації проводили з використанням Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, США), у кінцевій реакції C_910351_10 — для гена *ATG5*, assay C_1792560_10 — для гена *FLG*, C_1445481_10 — для гена *POMP*, assay C_31720978_30 — для гена *MTOR* і матричну ДНК. Ампліфікація фрагментів генів складалася зі стадії денатурації при 95 °C протягом 20 с, а потім 40 циклів ампліфікації при 95 °C протягом 3 с і 60 °C

протягом 30 с. Аналіз даних проводився з 7500 Fast Real-Time PCR Software.

Статистичний аналіз

Отримані дані обробляли статистично з використанням програми SPSS (версії 22.0) та програмного середовища R (версії 3.0). Для перевірки розподілу частот генотипів згідно із законом розподілу Харді — Вайнберга використовували SNP Analyzer (веб-програмне забезпечення).

Відмінність у частоті генотипу між групою пацієнтів із бронхіальною астмою і контрольною групою за допомогою χ^2 -тесту Пірсона, визначення відношення шансів (ВШ) та регресійного аналізу. Відмінність у розподілі генотипів вважалася статистично значущою при рівні $p < 0,05$. Для визначення та підтвердження взаємодії між поліморфізмами, визначення типу цієї взаємодії використовувався метод багатофакторного зменшення просторовості (MDR) [18], а також графічне зображення епістазу за допомогою побудови дендрограм взаємодії.

Результати

72 дитини (73,4 %) мали загострення бронхіальної астми, що проявлялось експіраторною задишкою, наявністю свистячих хрипів і кашлем. У 40 хворих (55,5 %) діагностовано легкий ступінь загострення, 31 (43,1 %) — мав загострення середньої тяжкості, 1 (1,4 %) — мав тяжке загострення. 28 дітей (28,3 %) із діагнозом «бронхіальна астма в стадії ремісії» проходили планове обстеження. Загалом у 60 пацієнтів (83,3 %) виявлено зниження показника $ОФВ_1$ (< 80 %), 34 (47,2 %) — мали позитивний тест із β_2 -агоністом. Усі діти мали випадки atopічних захворювань в сімейному анамнезі. 98 дітей (100 %) мали atopічний дерматит в анамнезі, із них 35 хворих (35,7 %) упродовж останнього часу відмічають прояви atopічного дерматиту у вигляді висипу, сухості шкіри, лущення, свербіжу, ліхенізації. У 34 осіб (34,7 %) прояви atopічного дерматиту відмічались від народження до 1 року, у 16 (16,3 %) — до 3 років, у 8 (8,2 %) — до 7 років, у 7 (7,2 %) — до 10 років, у 5 (5,1 %) прояви з'явилися після року.

Інша супутня алергологічна патологія визначалась у 46 дітей (46,9 %). У 23 осіб (23,5 %) мав місце алергічний риніт: із них 18 (18,4 %) мали алергічний риніт із персистуючим перебігом, 5 (5,1 %) — алергічний риніт з інтермітуючим перебігом. Серед алергічних захворювань в анамнезі відмічалася гостра алергічна кропив'янка — у 4 дітей (4,1 %), харчова алергія — у 9 (9,2 %).

Генотипування показало такий розподіл алельних варіантів у гені *POMP*. Розподіл генотипів rs4769628 у гені *POMP* відповідав закону Харді — Вайнберга. Мінорний варіант (GG) виявлений у 9 здорових дітей (9,2 %) та відсутній у групі хворих, 32 пацієнти (34,7 %) і 37 здорових дітей (37,7 %) мали гетерозиготний варіант (AG) ($p < 0,05$; ВШ — 0,73, довірчий інтервал (ДІ) — 0,41–1,36), 62 (65,3 %) і

52 (53,1 %) відповідно — мали мажорний алельний варіант (AA) (табл. 1). Варіанти з генотипом GG із rs4769628 виявилися в 9 разів частіше в контрольній групі, ніж серед хворих ($p < 0,05$).

Розподіл генотипів rs11204981 у гені *FLG* відповідає закону Харді — Вайнберга. Було виявлено, що в 5 пацієнтів (5,1 %) і у 2 здорових дітей (2,0 %) був наявний мінорний алельний варіант (AA) ($p > 0,05$ за χ^2 -тестом, ВШ — 2,28; 95% ДІ 0,42–12,2), 27 (27,3 %) і 36 (36,4 %) відповідно — мали гетерозиготний варіант (GA) ($p > 0,05$ за χ^2 -тестом, ВШ — 1,69; 95% ДІ 0,92–3,1), 67 (67,7 %) і 61 (61, %) відповідно — мажорний варіант (GG) ($p > 0,05$ за χ^2 -тестом) (табл. 1). Варіанти з генотипом AA з rs11204981 *FLG* виявилися у 2,5 раза частіше серед хворих, ніж у контрольній групі.

Розподіл генотипів rs11121704 у гені *MTOR* відповідає закону Харді — Вайнберга. Виявлено, що в 50 хворих (54,9 %) і 43 здорових дітей (49,4 %) наявний мажорний алельний варіант (TT) ($p > 0,05$ за χ^2 -тестом), 36 хворих (39,6 %) і 32 здорові дитини (36,8 %) мали гетерозиготний варіант (TC) ($p > 0,05$ за χ^2 -тестом, ВШ — 0,97; 95% ДІ 0,52–1,81), 5 (5,5 %) і 12 (13,8 %) відповідно — мінорний варіант (CC) ($p > 0,05$ за χ^2 -тестом, ВШ — 0,36; 95% ДІ 0,11–1,05) (табл. 1). Варіанти з генотипом CC rs11121704 у гені *MTOR* виявилися у 2,4 раза частіше в контрольній групі, ніж серед хворих.

Розподіл генотипів rs510432 у гені *ATG5* також відповідає закону Харді — Вайнберга. Виявлено, що в 51 хворої дитини (52,0 %) та 43 здорових дітей

(44,3 %) був гетерозиготний варіант (CT) ($p < 0,05$ за χ^2 -тестом, ВШ — 2,53; 95% ДІ 1,14–5,74), у 29 хворих (29,6 %) та в 21 дитини контрольної групи (21,6 %) — мінорний варіант (TT) ($p < 0,05$ за χ^2 -тестом, ВШ — 1,00), у 18 пацієнтів (18,4 %) та 33 здорових дітей (34 %) — мажорний варіант (CC) ($p < 0,05$ за χ^2 -тестом, ВШ — 2,17; 95% ДІ 1,09–4,46) (табл. 1). TT-генотип поліморфізму rs510432 у гені *ATG5* асоціюється з підвищеним ризиком ранньої маніфестації бронхіальної астми (до 3 років життя) ($p < 0,05$).

Поліморфізм rs4769628 у гені *POMP*, rs11204981 у гені *FLG*, rs11121704 у гені *MTOR* та rs510432 у гені *ATG5* були проаналізовані за допомогою методу логістичної регресії (табл. 2). Як видно з табл. 2, два поліморфізми були статистично значущими, а саме rs4769628 у гені *POMP* та rs510432 у гені *ATG5*. Отже, дані поліморфізми можуть розглядатись як значимі предиктори бронхіальної астми в дітей. Було визначено величину ВШ: поліморфізм rs4769628 у гені *POMP* має протективний ефект (ВШ < 1), поліморфізм rs510432 у гені *ATG5* асоціюється з підвищеним ризиком розвитку захворювання (ВШ > 1).

Для з'ясування характеру взаємодій між цими чотирма поліморфізмами була застосована графа взаємодії (дендрограма), що формується за результатами кластерного аналізу і наведена на рис. 1.

Як видно на рис. 1, між поліморфізмами *FLG* та *MTOR* не спостерігається ефект взаємодії та вони представляють незалежні головні ефекти. Між полі-

Таблиця 1. Відношення шансів для кодомінантної моделі успадкування поліморфізму rs4769628 у гені POMP, rs11204981 у гені FLG, rs11121704 у гені MTOR та rs510432 у гені ATG5 у дітей з алергічною патологією. Відношення шансів із 95% довірчим інтервалом

Генотип	Генотип				ВШ та 95% ДІ	P-значення
	Здорові		Хворі			
	n	%	n	%		
<i>rs4769628 у гені POMP</i>						
AA	52	53,1	62	65,3	1,00	< 0,05
AG	37	37,7	33	34,7	0,75 (0,41–1,36)	
GG	9	9,2	0	0,0	0	
<i>rs11204981 у гені FLG</i>						
GG	61	61,6	67	67,7	1,00	> 0,05
GA	36	36,4	27	27,3	1,69 (0,92–3,1)	
AA	2	2,0	5	5,1	2,28 (0,42–12,2)	
<i>rs11121704 у гені MTOR</i>						
TT	43	49,4	50	54,9	1,00	> 0,05
TC	32	36,8	36	39,6	0,97 (0,52–1,81)	
CC	12	13,8	5	5,5	0,36 (0,11–1,05)	
<i>rs510432 у гені ATG5</i>						
CC	33	34	18	18,4	1,00	< 0,05
CT	43	44,3	51	52,0	2,17 (1,09–4,46)	
TT	21	21,6	29	29,6	2,53 (1,14–5,74)	

Примітки: тут і в табл. 2: P-значення — статистична значущість, ВШ — відношення шансів, ДІ — довірчий інтервал.

морфізмами *ATG5* та *MTOR* також не спостерігається ефект взаємодії, і вони представляють незалежні головні ефекти. Між поліморфізмами *ATG5* та *FLG* спостерігається антагоністична взаємодія середньої сили, а між поліморфізмами *FLG* та *POMP* і *MTOR* та *POMP* — антагоністична взаємодія значної сили. Поліморфізм rs510432 гена *ATG5* виявився найбільш сильним предиктором розвитку бронхіальної астми, оскільки зменшує рівень ентропії на 7,88 %. До того ж поліморфізм rs510432 у гені *POMP* зменшує рівень ентропії на 5,21 %, поліморфізм rs11121704 у гені *MTOR* — на 1,18 %, поліморфізм rs11204981 у гені *FLG* — на 1,04 %.

Обговорення

Порушення лізосомного (автофагічного) та протеасомного протеолізу може мати визначальне значення в етіології та патогенезі алергічних захворювань. Наслідком таких порушень є зміни в процесах диференціації імунних клітин, їх функціонуванні та антигенній презентації, що, ймовірно, призводить до поляризації імунної відповіді в бік Т-хелперів 2-го типу, синтезу відповідних інтерлейкінів,

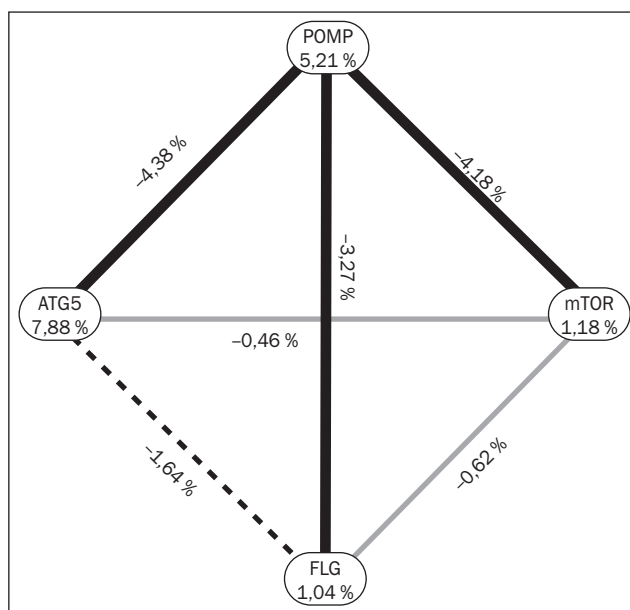


Рисунок 1. Дендрограма міжгенних взаємодій. Сірим кольором виділені незалежні головні ефекти, пунктирною лінією — антагоністична взаємодія середньої сили, чорний колір — антагоністична взаємодія значної сили

Таблиця 2. Результати аналізу поліморфізму rs4769628 у гені *POMP*, rs11204981 у гені *FLG*, rs11121704 у гені *MTOR* та rs510432 у гені *ATG5* за допомогою методу логістичної регресії

	B	P-значення	ВШ	Нижній 95% ДІ	Верхній 95% ДІ
Константа	0,04	0,88	1,04	0,58	1,89
rs4769628 у гені <i>POMP</i>	-0,69	p < 0,05	0,50	0,29	0,83
rs11204981 у гені <i>FLG</i>	-0,16	p > 0,05	0,85	0,50	1,44
rs11121704 у гені <i>MTOR</i>	-0,23	p > 0,05	0,79	0,50	1,23
rs510432 у гені <i>ATG5</i>	0,46	p < 0,05	1,59	1,11	2,32

Примітка: B — коефіцієнт регресії.

зокрема, через активацію Nuclear factor- κ B, системи MAPK, вивільненню медіаторів тощо.

Дані попередніх досліджень свідчать, що блокування протеїну *POMP* призводить до зниження каталітичної активності протеасом [21]. Позитивні результати застосування блокаторів протеасом при бронхіальній астмі на тваринних моделях свідчать про наявність протизапального ефекту внаслідок інгібування транскрипційних факторів [22]. Було визначено взаємозв'язок поліморфізму rs4769628 у гені *POMP* із розвитком atopії в дітей. Мінорний варіант rs4769628 гена *POMP* асоціюється зі зниженим ризиком розвитку atopічних хвороб серед дітей (p < 0,05) і вірогідно має протективний ефект внаслідок зниження протеолітичної активності протеасом. Можна зробити висновок, що структурні особливості протеїну *POMP* внаслідок поліморфізму гена можуть вплинути на розвиток atopічних захворювань серед дітей.

Подальші дослідження є необхідними для з'ясування ролі *POMP* у патогенезі atopії.

Дослідження кандидатних генів показало зв'язок поліморфізмів або мутацій генів, залучених у регуляцію структури та функції епідермального бар'єру з алергічними захворюваннями, а саме *FLG*. Шкірна сенсibiliзація алергенами є одним із найважливіших початкових етапів у патогенезі atopічного дерматиту. Також важлива її роль для atopічних захворювань, коли дефекти в генах шкірного бар'єра асоціюються із захворюваннями інших органів, включаючи харчову алергію, бронхіальну астму, алергічний риніт. У даному дослідженні ми показали, що варіанти з мінорним генотипом rs11204981 гена *FLG* виявилися у 2,5 раза частіше серед хворих, ніж у контрольній групі.

Безліч досліджень ідентифікують *MTOR* і його наведені нижче ефектори як потенційні фармакологічні мішені для профілактики розвитку ефекторних Т-клітин і просування та забезпечення толерантності.

Fredriksson et al. описали, що гальмування *MTOR* сигналізації рапаміцином мало парадоксальні ефекти на прояви бронхіальної астми, індукованої кліщами домашнього пилу [19]. Інгібування *MTOR* сигналізації рапаміцином до початку астми ефективно пригнічувало запалення в дихальних шляхах, келихоподібних епітеліальних клітинах і запобігало гіперреактивності дихальних шляхів. Ми отримали результати, у яких варіанти з мінорним генотипом

rs11121704 у гені *MTOR* виявилися у 2,4 раза частіше в контрольній групі, ніж серед хворих, що може свідчити про протекторну роль даного поліморфізму в розвитку алергічних захворювань.

Результати проведених досліджень свідчать про взаємозв'язок поліморфізму rs510432 гена *ATG5* із розвитком бронхіальної астми в дітей в американській популяції. Так, згідно з дослідженнями Martin et al. мінорна алель G rs510432 підвищує активність промотора гена на 23 % порівняно з алельним варіантом A та асоційована з підвищеним ризиком розвитку астми ($p < 0,05$; ВШ — 1,47; 95% ДІ 1,14–1,88) [20]. У дітей із загостренням бронхіальної астми експресія мРНК *ATG5* в епітеліальних клітинах верхніх дихальних шляхів значно зростає, що, ймовірно, свідчить про вищі показники активності автофагії порівняно з контрольною групою.

Наші дослідження розподілу алельних варіантів гена *ATG5* rs510432 у дітей з atopічними захворюваннями в українській популяції підтвердили асоціацію мінорного варіанта ТТ із розвитком atopії ($p < 0,05$). Окрім того, досліджуючи особливості клінічного перебігу, ми виявили, що ТТ-генотип поліморфізму rs510432 у гені *ATG5* асоціюється з підвищеним ризиком ранньої маніфестації бронхіальної астми (до 3 років життя) ($p < 0,05$).

У даному дослідженні нами було продемонстровано взаємозв'язок поліморфізмів генів, що кодують білки протеасомного та лізосомного протеолізу, факторів їх регуляції та кінцевих продуктів протеолізу з atopічними захворюваннями в дітей. Ми з'ясували, що rs510432 у гені *ATG5* асоціюється з ризиком ранньої маніфестації бронхіальної астми в дітей з atopією. Дослідження продемонструвало протективну роль мінорного генотипу поліморфізму гена *MTOR*, отже, цей поліморфізм має предиктивне значення в розвитку бронхіальної астми, вражаючи експресію цього гена.

Висновок

Подані результати свідчать про можливість використання даних поліморфізмів для прогнозування ризику розвитку бронхіальної астми в дітей.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Список літератури

1. Lin Ko-Wei, Li Jinghong, Finn P. Emerging pathways in asthma: Innate and adaptive interactions // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2011. — 1810. — 1052-1058.
2. Hansel T.T., Johnston S.L., Openshaw P.J. Microbes and mucosal immune responses in asthma // *Lancet*. — 2013. — 381. — 861-73.
3. Hussey S., Travassos L.H., Jones N.L. Autophagy as an emerging dimension to adaptive and innate immunity // *Semin. Immunol.* — 2009. — 21. — 233-241.
4. Li C. Autophagy is induced in CD4+ T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death // *J. Immunol.* — 2006. — 177. — 5163-5168.
5. Macian F. Autophagy and the regulation of the immune response // *Pharmacological Research*. — 2012. — 66. — 475-483.
6. Nakano H., Ushio H. An unexpected role for autophagy in degranulation of mast cells // *Autophagy*. — 2011 Jun. — 7(6). — 657-9.

7. Mizushima N., Ohsumi Y., Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells // *Cell. Struct. Funct.* — 2002 Dec. — 27(6). — 421-9.

8. Delgoffe G.M., Pollizzi K.M., Waickman A.D., Heikamp E., Meyers D.J., Horton M.R., Bo Xiao, Worley P.F., Powell J.D. The mammalian Target of Rapamycin (MTOR) regulates T helper cell differentiation through the selective activation of MTORC1 and MTORC2 signaling // *Nature immunology*. — 2011. — 12(4). — 295-303.

9. Venuprasad K., Elly C., Gao M., Salek-Ardakani S., Harada Y., Luo J.L., Yang C., Croft M., Inoue K., Karin M., Liu Y.C. Convergence of Itch-induced ubiquitination with MEKK1-JNK signaling in Th2 tolerance and airway inflammation // *J. Clin. Invest.* — 2006 Apr. — 116(4). — 1117-26.

10. Moutzouris J.P., Che W., Ramsay E.E., Manetsch M., Alkhoury H., Bjorkman A.M., Schuster F., Ge Q., Ammit A.J. Proteasomal inhibition upregulates the endogenous MAPK deactivator MKP-1 in human airway smooth muscle: mechanism of action and effect on cytokine secretion // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2010 Mar. — 1803(3). — 416-23.

11. Mudnakudu Nagaraju K.K., Babina M., Worm M. Opposing effects on immune function and skin barrier regulation by the proteasome inhibitor bortezomib in an allergen-induced eczema model // *Exp. Dermatol.* — 2013 Nov. — 22(11). — 742-7.

12. Dahlqvist J., Törmä H., Badhai J., Dahl N. siRNA Silencing of Proteasome Maturation Protein (POMP) Activates the Unfolded Protein Response and Constitutes a Model for KLICK Genodermatosis // *PLoS ONE*. — 2012. — 7(1). — e29471.

13. De Benedetto A., Qualia C.M., Baroody F.M. Filaggrin expression in oral, nasal, and esophagealmucos // *J. Invest. Dermatol.* — 2008. — 128. — 1594-7.

14. Weidinger S., O'Sullivan M., Illig T. Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2008. — 121. — 1203-9.

15. Tao Zheng, Jinho Yu, Min Hee Oh, Zhou Zhu The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma // *Allergy Asthma Immunol. Res.* — 2011 April. — 3(2). — 67-73.

16. Herrick C.A., Xu L., McKenzie A.N. IL-13 is necessary, not simply sufficient, for epicutaneously induced Th2 responses to soluble protein antigen // *J. Immunol.* — 2003. — 170. — 2488-95.

17. Akei H.S., Brandt E.B., Mishra A. Epicutaneous aeroallergen exposure induces systemic TH2 immunity that predisposes to allergic nasal responses // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2006. — 118. — 62-9.

18. Ritchie M.D., Hahn L.W., Roodi N., Bailey L.R., Dupont W.D., Parl F.F., Moore J.H. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer // *Am. J. Hum. Genet.* — 2001 Jul. — 69(1). — 138-47.

19. Fredriksson K., Fielhaber J.A., Lam J.K., Yao X., Meyer K.S. Paradoxical Effects of Rapamycin on Experimental House Dust Mite-Induced Asthma // *PLoS ONE*. — 2012. — e33984.

20. Martin L.J., Gupta J., Jyothula S.S., Butsch Kovacic M., Biagini Myers J.M., Patterson T.L., Ericksen M.B., He H., Gibson A.M., Baye T.M., Amirsetty S., Tsoras A.M., Sha Y., Eissa N.T., Hershey G.K. Functional variant in the autophagy-related 5 gene promoter is associated with childhood asthma // *PLoS One*. — 2012. — 7(4). — e33454.

21. Heink S., Ludwig D., Kloetzel P-M, Krüger E. IFN- γ -induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response // *Proc. Natl Acad. Sci USA*. — 2005, June 28. — 102(26). — 9241-9246.

22. Wegmann M., Lunding L., Orinska Z., Wong D.M., Manz R.A., Fehrenbach H. Long-term bortezomib treatment reduces allergen-specific IgE but fails to ameliorate chronic asthma in mice // *Int. Arch. Allergy Immunol.* — 2012. — 158(1). — 43-53.

Отримано 05.01.16 ■

Волосовец А.П., Кривоустов С.П., Павлик Е.В., Емец О.В.,
Строй Д.А., Досенко В.Е.
Национальный медицинский университет
имени А.А. Богомольца, г. Киев

АССОЦИАЦИЯ ВАРИАЦИЙ ГЕНОВ *POMP*, *FLG*, *MTOR* И *ATG5* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

Резюме. Целью данного исследования было определить связь однонуклеотидных полиморфизмов в гене белка созревания протеасомы (*POMP*), филаггрина (*FLG*), белка-мишени рапамицина (*MTOR*) и аутофагии (*ATG5*) с развитием бронхиальной астмы у детей.

Методы: клинические, генетические — определение генотипа больных и здоровых детей с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени; статистические.

Результаты. Установлено, что распределение генотипов в исследованных группах достоверно отличается при анализе полиморфизма *POMP*: GG-вариант обнаружен у 9 здоровых детей и отсутствует в группе больных, 32 пациента и 37 здоровых детей имели AG-вариант, 62 и 52 — соответственно имели аллельный вариант AA, при этом минорный вариант не встречался у больных бронхиальной астмой ($p < 0,05$ по χ^2 -критерию). Варианты с минорным генотипом гена *FLG* отмечались в 2,5 раза чаще у больных, чем в контрольной группе: у 5 пациентов и у 2 здоровых детей наблюдался аллельный вариант AA, 27 и 36 соответственно — имели гетерозиготный вариант GA, 67 и 61 соответственно — вариант GG. Варианты с минорным генотипом в гене *MTOR* отмечались в 2,4 раза чаще в контрольной группе, чем среди больных: 50 пациентов и 43 здоровых ребенка имели мажорный аллельный вариант TT, 36 и 32 соответственно — имели вариант TC, 5 и 12 соответственно — вариант CC. Получена статистически достоверная разница в распределении генотипов полиморфизма гена *ATG5*: у 51 больного ребенка и 43 здоровых детей был гетерозиготный вариант (CT), у 29 и 21 соответственно — минорный вариант TT, 18 и 33 соответственно — мажорный вариант CC ($p < 0,05$ по χ^2 -критерию). Минорный генотип полиморфизма гена *ATG5* ассоциируется с повышенным риском ранней манифестации бронхиальной астмы (до 3 лет жизни) ($p < 0,05$ по χ^2 -критерию). По результатам MDR-анализа выявлено, что полиморфизм гена *ATG5* оказался наиболее сильным предиктором развития бронхиальной астмы, поскольку уменьшает уровень энтропии на 7,88 %. При этом полиморфизм в гене *POMP* уменьшает уровень энтропии на 5,21 %, полиморфизм в гене *MTOR* — на 1,18 %, полиморфизм в гене *FLG* — на 1,04 %.

Выводы. Исследованные полиморфизмы могут быть использованы в качестве прогностических маркеров развития бронхиальной астмы у детей.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, филаггрин, аутофагия, *MTOR*, протеасомный протеолиз, бронхиальная астма, педиатрия.

Volosovets O.P., Kryvopustov S.P., Pavlyk O.V., Yemets O.V.,
Stroi D.O., Dosenko V.Ye.
National Medical University named after O.O. Bohomolets,
Kyiv, Ukraine

ASSOCIATION OF GENE VARIATIONS *POMP*, *FLG*, *MTOR* AND *ATG5* GENE WITH THE RISK OF ASTHMA IN CHILDREN

Summary. The aim of this study was to determine the correlation between single-nucleotide polymorphisms in the proteasome maturation protein gene (*POMP*), filaggrin gene (*FLG*), mammalian target of rapamycin gene (*MTOR*) and autophagy gene (*ATG5*) and the development of asthma in children.

Methods: clinical, genetic — determining the genotype of patients and healthy children using real-time polymerase chain reaction; statistical ones.

Results. It was found that the distribution of genotypes in the studied groups was significantly different when analysing polymorphism in *POMP* gene: GG variant was detected in 9 healthy children and was absent in ill people, 32 patients and 37 healthy children had AG variant, 62 and 52 — allelic AA variant, while minor variant wasn't detected in patients with asthma at all ($p < 0.05$ by the χ^2 criterion). Variants with the minor genotype of the *FLG* were found to be 2.5 times more frequent among patients than in control group: 5 patients and 2 healthy children had allelic variant AA, 27 and 36 — heterozygous variant GA, 67 and 61 — GG. Variants with minor genotype in *MTOR* gene were 2.4 times more often in the control group than in patients: 50 patients and 43 healthy children had major allelic variant TT, 36 patients and 32 healthy children had TC variant, 5 and 12 — CC variant. There was found a statistically significant difference in the distribution of genotypes of polymorphism in *ATG5* gene: 51 patients and 43 healthy children were heterozygous (CT), 29 and 21 — had minor variant TT, 18 and 33 — major variant CC ($p < 0.05$ by the χ^2). Minor polymorphism of *ATG5* gene was associated with increased risk of early manifestation of the asthma (up to 3 years of life) ($p < 0.05$ by χ^2). MDR-analysis has showed that polymorphism in *ATG5* gene was the strongest predictor of asthma as it reduced entropy level by 7.88 %. Polymorphism in the *POMP* gene reduces entropy level by 5.21 %, polymorphism in the *MTOR* gene — by 1.18 %, polymorphism in the *FLG* gene — by 1.04 %.

Conclusions. These polymorphisms may serve as prognostic markers for the development of asthma in children.

Key words: single-nucleotide polymorphism, filaggrin, proteasome proteolysis, autophagy, *MTOR*, asthma, pediatrics.