

© Левченко Л.Ю., Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Кайдашев І.П.
УДК [577.21:616.5-002]-053.3/.5

АСОЦІАЦІЯ ПОЛІМОРФІЗМУ 896A/G ГЕНУ TLR4 З ПЕРЕБІГОМ АТОПІЧНОГО ДЕРМАТИТУ У ДІТЕЙ ЗІ СХИЛЬНІСТЮ ДО ГОСТРИХ РЕСПІРАТОРНИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

Левченко Л.Ю., Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Кайдашев І.П.

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

Толл – подобные рецепторы (TLR) первыми воспринимают сигнал угрозы от инфекционных агентов. Общим свойством всех TLR является их способность взаимодействовать со структурами вирусов. При наличии функционального полиморфизма TLR нарушается активация клеток иммунной системы. Целью нашего исследования стало изучение ассоциации полиморфизма 896A/G гена TLR4 (rs4986790) с особенностями течения atopического дерматита (АД). Нами обследовано 27 пациентов в возрасте от 2 до 7 лет больных АД со склонностью к частым острым респираторным вирусным инфекциям. Определение полиморфизма гена проведено методом полимеразной цепной реакции. Установлено, что в группе детей с АД чаще выявлен мутантный аллель 896G гена TLR4 (9,3%), чем в группе контроля ($\chi^2 = 4,33$; $p = 0,038$). Выявлены ассоциации мутантного аллеля 896G гена TLR4 с тяжелым течением заболевания ($p = 0,0485$); сопутствующими аденоидными вегетациями в сочетании с аллергическим ринитом ($p = 0,0053$); поливалентной аллергией ($p = 0,0485$) у детей с АД. Полученные результаты свидетельствуют про важную роль полиморфизма 896A/G гена TLR4 в определении тяжести течения АД и развития осложненной заболевания.

Ключевые слова: Толл-подобные рецепторы, полиморфизм, atopический дерматит, вирусная инфекция.

Патогенез atopічного дерматиту (АД) вважають багатокомпонентним. Головну роль у розвитку захворювання відіграють імунні порушення. В основі АД лежить хронічне алергічне запалення шкіри, а пусковим механізмом імунної відповіді вважають взаємодію алергенів з IgE - антитілами на поверхні тучних клітин і базофілів. Важлива роль у розвитку АД відводиться дефекту вродженої імунної відповіді: порушенню функції епідермального бар'єру, продукції протимікробних пептидів, міграції нейтрофілів [1].

Особлива увага дослідників останнім часом приділяється вивченню порушень у системі Толл-подібних рецепторів (TLR) та їх значення у розвитку алергопатології. TLR та пов'язаний з ними активаційний сигнальний шлях – одні з найдревніших еволюційно консервативних і сигнальних систем, що слугують для розпізнавання патогенів і активації захисних реакцій. TLR першими сприймають сигнал загрози від патогенів та мобілізують імунну систему на боротьбу з інфекційними агентами [11].

Все більше уваги приділяється значенню TLR як центральної ланки вродженого імунітету в противірусній імунній відповіді організму [18]. Загальною властивістю всіх TLR є їх здатність взаємодіяти зі структурами вірусів – білками, глікопротеїдами, ліпопротеїдами, РНК та ДНК. Респіраторні віруси – грипу, парагрипу, аденовіруси, риновіруси та респіраторно – синцитіальний вірус (RSV) - найчастіше спричинюють гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ) у дітей [13]. Вірусні інфекції є одним з неспецифічних факторів, що посилює дію причинних факторів при АД [10], та найбільш значущим фактором ризику розвитку atopічного синдрому, особливо у дітей зі спадковою схильністю до алергії [13].

При наявності функціонального поліморфізму TLR, обумовленого замінами одиничних нуклеотидів (ОНП), знижується здатність до розпізнавання відпо-

відних ліганд або знижується ефективність проведення сигнальних імпульсів, що призводить до порушення активації клітин імунної системи при конфронтації з патогеном [12].

TLR4 грає ключову роль у розвитку імунної відповіді на ліпополісахарид грамнегативних бактерій, але також приймає участь і в розпізнаванні глікопротеїнів вірусної оболонки, зокрема, F(fusion) протеїну RSV [8]. Епітеліальні клітини респіраторних шляхів – первинна мішень RSV у людини, а перша лінія захисту від вірусу – посилена епітеліальна TLR4 – залежна продукція цитокінів, хемокінів та імуномодулювальних медіаторів. Поліморфізм TLR4 896A/G (rs4986790) - перший з описаних ОНП. Гомозиготність за мутантною алеллю 896G TLR4 знижує здатність передавати імуногенний сигнал. Також є дані про достовірну асоціацію поліморфізму 896A/G гену TLR4 з підвищеною чутливістю до RSV – інфекції [6, 16]. Натепер активно досліджується роль поліморфізмів гену TLR4 як можливого фактору патогенезу atopічних захворювань [9, 14, 17].

Метою нашого дослідження стало вивчення асоціації поліморфізму 896A/G гену TLR4 з особливостями перебігу АД у дітей зі схильністю до частих ГРВІ.

Матеріали та методи дослідження

Проведено обстеження 27 пацієнтів віком від 2 до 7 років (серед яких дівчата склали 48,2%, а хлопці – 51,8%) хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ, які перебували на диспансерному обліку в дитячих поліклінічних відділеннях дитячих міських клінічних лікарень м. Полтави. Діагноз АД установлювали на основі діагностичного алгоритму, що прийнятий в Україні та затверджений МОЗ України на основі критеріїв діагностики Hanifin, Rajka (1980) [7]. Для оцінки ступеню тяжкості використовували шкалу SCORAD та особливості клінічних проявів [5]. Оцінку частоти ГРВІ проводили з урахуванням кратності на рік залежно від віку дитини (діти віком від 1 до 3 років з кратністю ГРВІ - 6

і більше разів на рік, діти від 3 до 5 років - 5 і більше разів на рік, діти старші за 5 років - 4 і більше разів на рік), тривалості перебігу та наявності ускладнень з боку бронхо-легеневої системи [3]. Обстеження проводили на стадії клінічної ремісії захворювання. Усі пацієнти з АД проходили скринінг, що включав загальноклінічні лабораторні, інструментальні обстеження та проведення скарифікаційних проб. Здійснено спостереження за перебігом захворювання в динаміці.

Групу контролю склали 81 практично здорова особа з бази ДНК НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», які були скриніровані на відсутність обтяженого алергологічного анамнезу. Дослідження проводили з наданої письмової згоди батьків дітей і пацієнтів на проведення обстеження та ухвали комісії з етичних питань та біоетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».

Отримання периферичної крові пацієнтів здійснювали шляхом забору крові з кубітальної вени натще-серце в об'ємі 4 мл у вакуумну пробірку з ЕДТА (8,4 мг КЗЕДТА). Виділення геномної ДНК проводили методом фенол-хлороформної екстракції. Визначення поліморфізму 896A/G гену TLR4 проведено методом полімеразної ланцюгової реакції. Ампліфікацію специфічної ділянки ДНК здійснювали на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технологія», м. Москва) з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів із наступним рестрикційним аналізом [4]. Детекція продуктів ампліфікації проведена за допомогою електрофорезу в 3% агарозному гелі («Helikon», Москва) в 1 x TBE (50 мМ трис-Н₃ВО₃ та 2 мМ ЕДТА, рН 8.0).

Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc). Розподіл генотипів за досліджуваними поліморфними локусами перевіряли на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга за допомогою критерію χ^2 . Для порівняння частот алелей використовували критерій χ^2 Пірсона з поправкою Йетса на безперервність за кількості ступенів свободи рівній 1. Порівняння частот генотипів між досліджуваними групами проводили шляхом аналізу таблиць спряженості за допомогою точного тесту Фішера. Для порівняння частот варіантів у незв'язаних групах вираховували відношення шансів (ВШ) із визначенням 95% довірчого інтервалу (ДІ). Аналіз відмінності частотних характеристик якісних ознак у двох незалежних групах проводили за допомогою точного двостороннього критерію Фішера (для малих груп). Для усіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Аналіз анамнестичних та клінічних особливостей перебігу АД у обстежених дітей виявив наявність спадкової схильності у родичів I-II ступеня спорідненості у 26 (96,3%) хворих на АД. За тяжкістю захворювання виявлено: легкий перебіг - у 2 (7,4%), перебіг середньої тяжкості - у 22 (81,5%), тяжкий перебіг - у 3 (11,1%) дітей хворих на АД. У 13 (48,1%) хворих на АД було встановлено супутні АР та/або БА, у 10 (37%) - аденотні вегетації (АВ) I-III ступенів, у 6 (22,2%) - подання супутніх АР та/або БА з АВ. При алергообс-

теженні у 24 (88,9%) дітей з АД виявлена алергія до одного чи декількох видів алергенів: харчових, епідермальних, побутових, пилоквих, грибкових; причому, у 14 (51,9%) - виявлена полівалентна алергія на три, та більше види алергенів.

Результати аналізу розподілу частот генотипів та алелей гену TLR4 за поліморфізмом 896A/G у групах контролю та обстежених дітей хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ наведено в таблиці 1 та 2.

Таблиця 1
Розподіл частот генотипів поліморфізму 896A/G гену TLR4 серед груп контролю і дітей хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ, % (n)

Ген, поліморфізм	Частота генотипу	Група контролю (n=81)	Група хворих на АД (n=27)	p*
TLR4 896A/G	AA AG GG	96,30 (78) 3,70 (3) -	85,19 (23) 11,11 (3) 3,70 (1)	0,06

p* - рівень значимості, отриманий точним тестом Фішера.

Як видно з таблиці 1, при дослідженні поліморфізму 896A/G гену TLR4 в групі контролю виявлено, що частота «дикого типу» генотипу AA становила 96,3%, гетерозиготного генотипу AG - 3,7%, мутантний генотип GG - не виявлений. У дітей, хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ, відповідно: AA - 85,19%, AG - 11,11% та GG - 3,7%, що відповідає теоретично очікуванню при рівновазі Харді-Вайнберга, як у групі контролю ($\chi^2=1,79$), так і в групі хворих ($\chi^2=1,54$) (табл. 2). Тобто, між частотами генотипів у групах контролю та хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ виявлена різниця на рівні статистичної тенденції ($p=0,06$).

Таблиця 2
Розподіл частот алелей поліморфізму 896A/G гену TLR4 серед груп контролю і дітей хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ, % (n)

Частота алелю	Група контролю (n=81)	Група хворих на АД (n=27)	χ^2 Пірсона, df=1	ВШ (95% ДІ)	p*
A G	98,1 (159) 1,9 (3)	90,7 (49) 9,3 (5)	4,33	5,06 (1,28-20,08)	0,038

p* - рівень значимості, отриманий тестом χ^2 .

Алелі А та G в групі контролю зустрічалися з частотою 98,1% і 1,9% відповідно. Достовірно значно вищою виявилася частота мутантної алелі G в групі хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ, яка складала 9,3%, у порівнянні з групою контролю ($\chi^2=4,33$; ВШ=5,06; ДІ=1,28-20,08; $p=0,038$) (табл. 2).

При внутрішньогруповому аналізі розподілу частот генотипів та алелей досліджуваного поліморфізму спостерігався нерівномірний розподіл алелей, на що вказує проведений аналіз показника врахування рідкісних алелей ($\mu < 2$) і частки рідкісних алелей ($h > 0$), а також виявлено співпадання очікуваної гетерозиготності та гетерозиготності, яка спостерігається, що свідчить про рівновагу генетичної структури даної популяції (табл. 3).

Таблиця 3
Внутрішньогруповий аналіз розподілу частот генотипів та алелей поліморфізму 896A/G гену TLR4

	Група контролю (n=81)	Група хворих на АД (n=27)
χ^2 -Пірсона з поправкою Іейтса, df=1	1,79	1,54
Гетерозиготність, що спостерігається (Hobs)	0,04	0,11
Очікувана гетерозиготність (Hex)	0,04	0,17
Нормоване відхилення Hobs від Hex (коефіцієнт інбридингу популяції) (F)	-0,02	0,34
Адекватне врахування рідкісних алелей (показник μ)	1,27	1,58
Частка рідкісних алелей (h)	0,37	0,21

Для визначення можливих асоціативних зв'язків поліморфізму 896A/G гену TLR4 з перебігом та особливостями клінічних проявів АД було проведено порівняння обстежених дітей хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ з гетеро- і гомозиготним генотипом (A/G, G/G) за мутантною алеллю (4 хворих - перша група) та хворими дітьми з гомозиготним генотипом за «дикою» алеллю (23 хворих - друга група). За резуль-

татами аналізу встановлені статистично значущі відмінності між групами (табл. 4). Установлено, що у дітей хворих на АД з мутантною алеллю 896G гену TLR4 частіше, ніж у гомозиготних носіїв «дикої» алелі, виявлені: тяжкий перебіг захворювання ($p=0,0485$); супутні АВ у поєднанні з АР та/або БА ($p=0,0248$); супутні АВ у поєднанні з АР ($p=0,0053$); полівалентна алергія на 4 види алергенів ($p=0,0485$).

Таблиця 4
Порівняння серед групи хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ (n=27) залежно від генотипів поліморфізму 896A/G гену TLR4

Клінічні особливості АД		896 A/G гену TLR4 (генотип AG/GG) (n=4)	896 A/G гену TLR4 (генотип AA) (n=23)	p^*
Перебіг АД середньої тяжкості	так	2	20	0,1444
	ні	2	3	
Тяжкий перебіг АД	так	2	1	0,0485
	ні	2	22	
Супутні АВ	так	3	7	0,1282
	ні	1	16	
Супутні АВ+АР та/або БА	так	3	3	0,0248
	ні	1	20	
Супутні АВ+АР	так	3	1	0,0053
	ні	1	22	
Алергія до 3-х видів алергенів	так	2	7	0,5815
	ні	2	16	
Алергія до 4-х видів алергенів	так	2	1	0,0485
	ні	2	22	

p^* - рівень значимості, отриманий точним тестом Фішера (двосторонній критерій).

Результати нашого дослідження свідчать, що підвищена сприйнятливність до вірусних інфекцій обумовлює формування поєднаної респіраторної (АР, БА) та шкірної алергії (т.з., дермореспіраторного синдрому) у дітей хворих на АД. Характерною особливістю цього синдрому є розширення спектру етіологічно значимих алергенів з формуванням полівалентної сенсibiliзації організму [2]. Також відомо, що алергічний фон у дітей спричинює гіпертрофію аденоїдів, розповсюдженість яких найбільша у дітей з АР [19]. В основі взаємодії між частою респіраторною інфекцією та алергією лежать особливості імунного реагування та локальне алергічне запалення, яке сприяє проникненню вірусів у респіраторний епітелій, що, в свою чергу, посилює процеси сенсibiliзації та алергічне персистуюче запалення [15]. Можливо ОНП у генах TLR спричинюють порушення регуляторних механізмів імунної системи внаслідок зміни співвідношення Т – лімфоцитів - хелперів типів 1 і 2. При зустрічі з патогенами через TLR відбувається передача активаційного сигналу до синтезу певних цитокінів, які стимулюють диференціацію Т - хелперів типу 1. Зниження функції TLR призводить до послаблення цього шляху активації клітин, зсуву балансу в бік диференціації Т - хелперів типу 1 та розвитку алергії. Тобто, наявність ОНП в генах TLR може впливати на розвиток імунопатології,

оскільки призводить до суттєвої дисрегуляції захисних реакцій [11].

Висновки

У групі дітей хворих на АД зі схильністю до частих ГРВІ достовірно частіше виявлена мутантна алель 896G гену TLR4 (9,3%) в порівнянні з групою контролю ($\chi^2=4,33$; ВШ=5,06; ДІ=1,28-20,08; $p=0,038$).

У дітей хворих на АД з мутантною алеллю 896G гену TLR4 частіше, ніж у гомозиготних носіїв «дикої» алелі, виявлені: тяжкий перебіг захворювання ($p=0,0485$); супутні аденоїдні вегетації у поєднанні з АР та/або БА ($p=0,0248$); супутні аденоїдні вегетації у поєднанні з АР ($p=0,0053$); полівалентна алергія на 4 види алергенів ($p=0,0485$).

Отже, поліморфізм 896A/G гену TLR4 має важливе значення у визначенні тяжкості перебігу АД та розвитку ускладнень захворювання.

Література

1. Аллергология и иммунология: национальное руководство / под ред. Р.М.Хайтова. Н.И.Ильиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 656 с. – (Серия «Национальные руководства»).
2. Балаболкин И.И. Сочетанные проявления респираторной и кожной аллергии у детей / Балаболкин И.И., Булгакова В.А. // Медицинский совет. – 2008. - N 5-6. - С.28-37.

3. Ершова И.Б., Высоцкий А.А., Ткаченко В.И. и др. Часто болеющие дети: возможности комплексной реабилитации / И.Б. Ершова, А.А. Высоцкий., В.И. Ткаченко [и др.] // Дитячий лікар. -2009. - №1. - С. 58 - 62.
4. Зв'язок поліморфізмів генів TLR2 та TLR4 зі схильністю до окремих урогенітальних інфекцій / О.В. Ізмайлова., О.А. Шликова, Н.О. Боброва, І.П. Кайдашев // Цитология и генетика. - 2011. - № 4. - С. 29-35.
5. Кубанова А.А. Клинические рекомендации. Дерматовенерология / А.А. Кубанова - М: Гэотар-Медиа, 2006. - 320 с.
6. Полиморфизм рецепторов врожденного иммунитета / А.И. Иванов, А.В. Апчел, Т.А. Камилова [и др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. - 2009. - № 1 (25). - С. 172 - 184.
7. Протокол діагностики та лікування дітей з atopічним дерматитом / Наказ МОЗ України № 767 від 27.12.2005].
8. Роль и биологическое значение Толл-подобных рецепторов в антиинфекционной резистентности организма / А.Л. Байракова, Е. А. Воропаева, С. С. Афанасьев [и др.] // Вестник российской академии медицинских наук.- 2008. - № 1. - С. 45 - 54.
9. Семенов Б.Ф. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов / Б.Ф. Семенов, В.В. Зверев // Аллергология и иммунология. - 2006. - Т. 7, № 4. - С. 482 - 491.
10. Сепиашвили Р.И. Этиология и факторы риска развития atopического дерматита / Р.И. Сепиашвили, Д.Ш. Мачарадзе, Т.А. Славянская [и др.] // Аллергология и иммунология. - 2008. - № 2, С. 205 - 217.
11. Симбирцев А.С. Толл-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета // Иммунология. - 2005. - № 6. - С. 368-377.
12. Спивак Н.Я. Роль TOLL – подбных рецепторов в регуляции иммунного ответа в норме и при патологии / Н.Я. Спивак, И.М. Богданова, Н.И. Мартиросова [и др.] // Фізіол. журн. - 2008. - Т. 54, № 6 , С. 87 -99.
13. Титов Л.П. Противовирусный иммунитет: молекулярно-клеточные механизмы, закономерности развития и иммунопатология / Л.П. Титов, И.А. Карпов // Белорус. мед. журн. 2008. - №3. -- С. 28—35.
14. Толстопятова М.А. Роль рецепторов врожденного иммунитета в развитии инфекционной патологии у новорожденных детей / М.А. Толстопятова, Г.А. Буслаева, И.Г. Козлов // Педиатрия.- 2009.- том 87, №1.- С. 115 – 120.
15. Черняк Б.А. Взаимосвязь респираторной аллергии и ОРЗ у часто болеющих детей / Б.А. Черняк, Т.Б. Павлова, И.И. Воржева // Российский аллергологический журнал – 2008. - № 2. - С. 47–53.
16. Association between Common Toll-Like Receptor 4 Mutations and Severe Respiratory Syncytial Virus Disease / G. Tal, A. Mandelberg, I. Dalal [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. - 2004. - 189 (11). - 2057 – 2063.
17. Bhattacharjee R. N. Toll-Like Receptor Signaling: Emerging Opportunities in Human Diseases and Medicine / R. N. Bhattacharjee, S. Akira // Current Immunology Review. - 2005. - V. 1, № 1. - с. 81 – 90.
18. Carty M. Recent insights into the role of Toll-like receptors in viral infection / M. Carty, A. G. Bowie // Clinical and Experimental Immunology. - 2010. - V. 161, № 3. - P. 397–406.
19. Modrzynski M. An analysis of the incidence of adenoid hypertrophy in allergic children / M. Modrzynski, E. Zawisza // International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. - 2007. - V. 71, № 5. - P. 713–719.

Summary

ASSOCIATION OF TLR4 896A/G POLYMORPHISM WITH ATOPIC DERMATITIS IN CHILDREN LIABLE TO ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS

L.Yu. Levchenko, O.V. Izmaylova, O.A. Shlykova, I.P. Kaydashev

Key words: Toll-like receptors, polymorphism, atopic dermatitis, viral infection.

Toll-like receptors (TLR) are the first to perceive the threat signal from infectious agents. The common property of all TLRs is their ability to interact with the viruses' structures. In the presence of a functional TLR polymorphism, the activation of immune system cells is impaired. The aim of our study was to investigate the association of polymorphism 896A/G gene TLR4 (rs4986790) with features of atopic dermatitis (AD). 27 patients aged from 2 to 7 with AD and liable to frequent acute respiratory viral infections have been examined. Identification of gene polymorphisms has been performed via polymerase chain reaction. It has been found out that the group of children diagnosed with AD revealed 896G mutant allele of TLR4 gene more often (9,3%) than the control group ($\chi^2 = 4,33$; $p = 0,038$). The association of the TLR4 896G gene mutant allele with severe course of disease ($p = 0,0485$), concomitant adenoid vegetations in conjunction with allergic rhinitis ($p = 0,0053$), polyvalent allergy ($p = 0,0485$) in children with AD have been discovered. The obtained results indicate the important role of polymorphism 896A/G TLR4 gene in the assessment of AD course severity and its complications.

The Research Institute for Genetic and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics of Higher State Educational Establishment of Ukraine «Ukrainian Medical Stomatological Academy», Poltava

Матеріал надійшов до редакції 26.04.2012 р.