

© Али Мохамад Таха

УДК 616.233-002+616-08:612.751.3:616-008:615.37:616.43

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TOLL-LIKE РЕЦЕПТОРА 4 ТИПА ASP299GLY У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ОБСТРУКТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ С РАЗЛИЧНЫМ АНТИТЕЛЬНОМ ОТВЕТом НА ЭНДОТОКСИН

Али Мохамад Таха

ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И.Георгиевского», г. Симферополь

*Рівні антитіл до ендотоксину (анти-ET-IgG) та поліморфізм Asp299Gly Toll-like рецептора 4 типу (TLR4) у 31 хворого на хронічні обструктивні захворювання легень (ХОЗЛ) були досліджені за допомогою імуноферментного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції. Згідно з результатами дослідження рівня анти-ET-IgG усі хворі ХОЗЛ були розподілені на 2 клінічні групи. У першу групу увійшли 18 хворих, які мали низький рівень анти-ET-IgG ( $2 \delta < Me \pm m$ ) - антитільні анти-ET гіпореспондери. У другу групу — 13 хворих, що мали нормальний, або підвищений рівень антитіл до ET анти-ET-Ig G (антитільні норма та гіперреспондери). Була також обстежена група здорових донорів - 23 особи. Найбільш розповсюджений гомозиготний генотип AA був виявлений у 27 хворих на ХОЗЛ (87,1%), 16 хворих 1 групи (88,9%) та 11 хворих 2 групи (84,6%). За частотою цього генотипу достовірної різниці між клінічними групами хворих та групою здорових донорів не було виявлено. 4 гетерозиготних AG генотипа Asp299Gly було виявлено у хворих на ХОЗЛ, по 2 в кожній клінічній групі без вірогідної різниці між групами та нормою. Жодного випадку гомозиготного генотипа Gly299 поліморфізму TLR4 не було зареєстровано. Наявність Asp299Gly поліморфізму TLR4 не має суттєвого впливу на антитільну відповідь до ET.*

Ключові слова: поліморфізм гена, Toll-like рецептори, хронічні обструктивні захворювання легень

В настоящее время большое внимание исследователей во всем мире уделяется механизмам активации врожденного иммунитета при хронических обструктивных заболеваниях легких (ХОЗЛ), что может привести в ближайшем будущем к появлению новых стратегий лечения этого заболевания. Среди механизмов активации врожденного иммунитета, особое место занимают механизмы стимуляции паттерн-распознающих трансмембранных рецепторов, к которым и относят семейство Toll-like рецепторов (TLR). TLR принимают активное участие в защите от вирусных и бактериальных инфекций, которые, как известно, принимают активное участие в формировании, обострении и прогрессировании ХОЗЛ [1].

Учитывая важную роль грамотрицательных бактерий в индукции обострения ХОЗЛ наше внимание привлекли TLR 4 типа с позиций изучения одиночного нуклеотидного полиморфизма Asp299Gly, который, во многом определяет уменьшение трансдукционного ответа на эндотоксин (ЭТ) или липополисахарид (ЛПС) грамотрицательных бактерий [2].

Целью данной работы было изучение частоты одиночного нуклеотидного полиморфизма Asp299Gly TLR 4 типа у больных ХОЗЛ в зависимости от уровня антительного ответа на ЭТ грамотрицательной микрофлоры.

### Материал и методы исследований

Обследован 31 больной ХОЗЛ, проходивший стационарное лечение на базе терапевтического отделения ГУ «Участковая клиническая больница ст. Симферополь» государственного предприятия «Приднепровская железная дорога». Клинический диагноз ХОЗЛ устанавливался на основании проведенного клинического и функционального обследования с верификацией стадий заболевания в соответствии с Приказом МОЗ Украины от 19.03.2007 №128 [3].

Среди больных ХОЗЛ было 17 мужчин (51,6%) и 14 женщин (48,4%), средний возраст больных —  $61,0 \pm 2,0$  года. Спирометрия проводилась с помощью прибора «Спироком» (Комплекс спирометрический), «Микролаб» (Комплекс компьютерный диагностический) с использованием критериев ATS/ERS. (2003, 2005).

Уровни сывороточных антиэндотоксиновых антител класса G (анти-ЭТ-IgG) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА) с использованием протоколов, разработанных в отделе клинической иммунологии ЦНИЛ ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского» [4,5]. Концентрацию анти-ЭТ-IgG выражали в условных единицах оптической плотности конечного продукта ферментативной реакции после проведения тИФА (усл. ед. опт. плотн.), которую определяли с помощью иммуноферментного анализатора StatFax 2100 (Awareness Tech. Inc., USA) при длине волны 492 нм для разведения тестируемой сыворотки крови 1:50.

Молекулярно-генетические исследования проведены в НИИ Генетических и иммунологических основ развития патологии и фармакогенетики ВГУЗ Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия».

Геномную ДНК выделяли из сыворотки крови методом фенол-хлороформной экстракции [6]. Определение полиморфизма Asp299Gly Toll-like рецепторов проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров [7].

В зависимости от интенсивности антительного ответа на ЭТ, который оценивали по отношению индивидуальных уровней анти-ЭТ-IgG в крови к нормативной величине этого показателя, больные были распределены на 2 клинические группы. В первую группу было включено 18 больных ХОЗЛ с низким уровнем

нем анти-ЭТ-IgG ( $2\delta < Me \pm m$ ) -антительные гипореспондеры на ЭТ, во вторую – 13 больных ХОЗЛ с нормальным и повышенным уровнем анти-ЭТ-IgG (антительные нормо и гиперреспондеры на ЭТ).

Для оценки нормативных показателей использовали венозную кровь 23 условно здоровых доноров, которые соответствовали больным ХОЗЛ по возрастному диапазону и половому распределению (группа контроля).

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием лицензионной программы «MedStat» (серийный №MS0011 ДНПП ТОВ

«Альфа», г. Донецк) для параметрических и непараметрических критериев. Достоверность различий по частоте встречаемости указанных генотипов и аллелей оценивали с помощью непараметрического критерия  $\chi^2$  Пирсона и  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йетса [8].

### Результаты и их обсуждение

Данные о генетическом полиморфизме TLR4 Asp299Gly и концентрации в крови антиэндотоксиновых антител класса Ig G представлены в таблице.

Таблица  
Уровень антиэндотоксиновых антител класса Ig G и распределение частоты генотипов и аллелей полиморфизма гена TLR4 Asp299Gly в группе контроля и больных ХОЗЛ

Показник	Контрольная группа n=23	ХОЗЛ n=31	1 группа n=18	2 группа n=13
Уровень антител Ig G к ЭТ усл.ед.опт.пл.				
анти-ЭТ-Ig G	0,158±0,015	0,108±0,02	0,093±0,004	0,243±0,019
p		=0,096	<0,01	<0,05
Частота генотипа n (%)				
GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AG	1 (4,35%)	4 (12,9%)	2 (11,1%)	2 (15,4%)
AA	22 (95,6%)	27(87,1%)	16 (88,9%)	11 (84,6%)
$\chi^2$ П		p = 0,28	p = 0,41	p = 0,25
$\chi^2$ П+И		p = 0,55	p = 0,83	p = 0,60
Частота аллелей n (%)				
A	45 (97,8%)	58 (93,5%)	34 (94,4%)	24 (92,3%)
G	1 (2,2%)	4 (6,5%)	2 (5,6%)	2 (7,7%)
$\chi^2$ П		p = 0,30	p = 0,42	p = 0,26
$\chi^2$ П+И		p = 0,54	p = 0,83	p = 0,61

Примечание: p – достоверность различий с группой контроля

$\chi^2$  П -  $\chi^2$  Пирсона

$\chi^2$  П+И -  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йетса

(\*) об обозначена достоверность различий между 1 и 2 группами p<0,01

Как видно из данных представленных в таблице в целом в группе больных ХОЗЛ носители гомозиготного генотипа Asp299Asp TLR4 составили 87,1%, в 1 группе больных ХОЗЛ - 88,9% и 2 группе - 84,6 %, что статистически достоверно не отличается от соответствующего показателя группы здоровых лиц (p=0,55, p=0,83, p=0,60 соответственно). Количество больных с гетерозиготным вариантом Asp299Gly в целом в группе больных ХОЗЛ составило 4 человека (12,9%), в 1 группе больных ХОЗЛ 2 человека (11,9%) и во 2 группе больных ХОЗЛ также 2 пациента (15,4%), что не отличается от показателя группы здоровых лиц (p=0,28, p=0,41 и p=0,25 соответственно). Между частотой встречаемости полиморфных аллелей А и G в группах больных ХОЗЛ и контрольной группой достоверных различий также не выявлено.

Наши данные в целом совпадают с результатами полученными ранее о том, что полиморфизм Asp299Gly TLR4 не превышает 10-20% среди лиц европеоидной расы, Michel O et al. (2003) изучая генетический полиморфизм TLR4 на ингаляцию ЭТ у здоровых лиц установил, наличие гипореспондерного ответа на ЭТ, более низкий уровень ЛСБ и С- реактивного белка у носителей гетерозиготных вариантов единичного полиморфизма TLR4 в положении +896 A/G и +1196T/C [1].

Как известно, полиморфизм Asp299Gly TLR4 ассоциируется с уменьшением ЛПС трансдукционного сигнала [2,9]. Имеются единичные сообщения о том, что при ХОЗЛ частота встречаемости данного поли-

морфизма Asp299Gly (rs498670) в TLR4 значительно ниже, чем в группе контроля [10].

В научной литературе существуют противоречивые данные о влиянии данного полиморфизма на показатели функции внешнего дыхания у больных ХОЗЛ. Так в исследовании проведенном Pahnwa P. (2009) показано, что полиморфизм TLR4 Asp299Gly является потенциальным фактором риска уменьшения ОФВ<sub>1</sub> (объема форсированного выдоха за первую секунду) и соотношения ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ (форсированной жизненной емкости легких) и пиковой скорости выдоха (ПСВ<sub>25-75</sub>) у лиц с ожирением (индекс массы тела  $\geq 30$  кг/м<sup>2</sup>) [11].

LeVan T.D. et al. (2005), Budulac S. (2012) установили, что полиморфизм Asp299Gly TLR4 не имеет никакого влияния на показатели внешнего дыхания, на уменьшение ОФВ<sub>1</sub> и на тяжесть течения ХОЗЛ [12,13].

В научной литературе обсуждаются возможная роль гипореспондерного ответа TLR4 в патогенезе дисфункции клиренса трахеобронхиального дерева от грамотригативных бактерий (прежде всего *H. influenzae M. catarrhalis*), которые при стабильном течении ХОЗЛ выявляются у 30 % больных ХОЗЛ. White S. et al. (2004) изучали генетический полиморфизм TLR4 у 289 курильщиков с ХОЗЛ. 260 были гомозиготами по Asp299, 29 больных ХОЗЛ были гетерозиготами по Asp299Gly. Не было выявлено ни одного случая у больных ХОЗЛ гомозигот Gly299. При этом не было выявлено влияния генетического полиморфизма TLR4

Asp299Gly на показатели легочной функции и бронхиальный ответ на ингалируемый ЭТ и повышенную чувствительность к грибковой, бактериальной и вирусной инфекции [14]. Douville R. N. et al. (2010), Lafferty E. et al. (2010) доказали, что продукция провоспалительных цитокинов индуцируемая ЛПС или синцитиальными вирусами у здоровых детей не зависит от TLR4 Asp299Gly и Thr399Ile полиморфизма [15,16].

Как известно, важнейшую роль в патогенезе ХОЗЛ играет активация нейтрофилов и альвеолярных макрофагов под действием различных факторов и прежде всего табачного дыма. По данным шведских исследователей в табачном дыме, кроме других известных факторов, в критических высоких концентрациях содержится ЛПС (ЭТ) грамотрицательной флоры [17]. В настоящее время доказано, что ЭТ является мощнейшим провоспалительным фактором, который потенциально может определять необычный воспалительный ответ при формировании ХОЗЛ [18].

Известно, что передача сигнала от комплекса ЭТ+ЛСБ (липополисахаридсвязывающий белок) происходит с непосредственным участием TLR рецепторов 4 типа (TLR4), ибо CD 14 рецептор не имеет внутрицитоплазматического домена. ЭТ сигнал, переданный в клетку через TLR4 приводит в конечном итоге к активации внутриклеточного транскрипционного фактора NF-κB, который перемещается в ядро клетки и связывается с κB-последовательностями ДНК, что стимулирует синтез ОНФ, IL-1β, IL-6 [19]. Клеточный ответ на ЭТ во многом определяется структурой внеплазматического домена TLR4, которая по данным литературы определяется генетическим полиморфизмом TLR4.

Анализируя полученные нами данные можно отметить, что большинство больных ХОЗЛ по генетическому полиморфизму TLR4 Asp299Gly на ЭТ имеют предрасположенность к гиперреспондерному клеточному ответу на эндотоксин. Аналогичная закономерность характерна для групп больных с антительным гипореспондерным ответом на ЭТ (1 группа) и антительным нормо и гиперреспондерным ответом на ЭТ (2 группа).

Вместе с тем, ранее нами получены данные о том, что антительные гиперреспондеры и нормореспондеры имеют более низкие показатели системного воспаления такие, как уровень СРБ, ЛСБ и более легкое течение ХОЗЛ в сравнении с антительными гипореспондерами [20]. Объяснить этого парадокс, можно нейтрализацией ЭТ антителами на уровне мукозального барьера (более высокий уровень секреторного антиэндотоксинового Ig A) и на уровне системного кровотока (более высокий уровень антиэндотоксинового IgG во 2 группе) [21]. Поэтому нейтрализация ЭТ антителами приводит к значительно меньшему образованию комплекса ЭТ+ЛСБ и меньшей активации рецепторного комплекса CD14/TLR4 во 2 клинической группе. С другой стороны, у антительных гипореспондеров в 1 клинической группе чрезмерное воздействие ЭТ на клеточные структуры может происходить через другие виды рецепторов к ЭТ (β<sub>2</sub> интегриновые рецепторы (CD11/ CD18), скавенджер рецепторы, L-селектины и другие), приводя к выраженной активации NF-κB [22].

## Выводы

1. Гомозиготный генотип AA полиморфизма Asp299Gly TLR4 является наиболее часто встречающимся при ХОЗЛ, который был выявлен у 27 больных ХОЗЛ (87,1%), 16 больных в 1 клинической группе (88,9%) и 11 больных во 2 группе (84,6%). Гетерозиготный вариант генотипа AG полиморфизма Asp299Gly TLR4 был выявлен у 4 больных ХОЗЛ (12,9%) из них у 2 в 1 клинической группе (11,1%) и 2 во 2 группе (15,4%). Гомозиготного варианта GG генотипа не выявлено ни у одного больного ХОЗЛ.

2. Достоверных различий частота генетического полиморфизма Asp299Gly TLR4 у больных ХОЗЛ и в популяции здоровых лиц постоянно проживающих в АР Крым не обнаружено.

3. Не было выявлено особенностей генетического полиморфизма Asp299Gly TLR 4 между группами больных ХОЗЛ с различным уровнем антительного ответа на ЭТ.

## Література

1. Michel O. Systemic responsiveness to lipopolysaccharide and polymorphisms in the toll-like receptor 4 gene in human beings. / Michel O., LeVan T., Stern D., Dentener M., Thorn J. et al. // J Allergy Clin Immunol. - 2003 - Vol. 112. - N11. - P. 923-929.
2. Schmitt C. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles/ Schmitt C., Humeny A., Becker C.M., Brune K., Pahl A. // Clin Chem. - 2002. - Vol 48. - N. 11. - P. 1661-1667.
3. Наказ МОЗ України від 19.03.2007 №128 «Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Ппульмонологія».- К., 2007.- 146.
4. Гордієнко А.І., Білоглазов В.О., Бакова А.А. Високочутливий імуноферментний метод кількісного визначення змісту С-реактивного білка в крові. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №139.- К., УКРМЕДПАТЕНТІНФОРМ, 2010. - 4с.
5. Гордієнко А.І., Білоглазов В.О. Патент 70193 А. Спосіб визначення антитіл до ліпополісахаридів грамотрицательних бактерій. - Заявл. 29.12. 2003; Опубл.15.09. 2004. - Бюл. №9
6. Епринцев А.Т. Идентификация и исследование экспрессии генов (учебно-методическое пособие для вузов) // Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. - Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета. - 2008. - 64 с.
7. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О. та ін. під ред. проф. Кайдашева І.П. - Полтава : Полімет, 2003. — 320 с.
8. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA.- М.: МедиаСфера, 2002.- 312 с.
9. Arbour N.C TLR4 mutation is associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans/ Arbour N.C., Lorenz E., Schutte B.C., Zabner J., Kline J.N., et al. // Nature Genetics. 2000. - Vol 25. - N. 1. -P.187-191.
10. Klein W. Association of the ASP299GLY TLR4 polymorphism with COPD/Klein W, Duerig N, Bauer T, Gillissen A, Schultze-Werninghaus G, Epplen T. J. // Respir Med. - 2006. - Vol 100. - N. 5. - P. 892-896.
11. Pahwa P. Association of the TLR4 Asp299Gly polymorphism with lung function in relation to body mass index / Pahwa P., Karunanayake C. P, Rennie D. C., Chen Y., Schwartz D.A. // BMC Pulm Med. 2009 - Vol. 46. - N.9.- P. 1186-1196.
12. LeVan T.D. Polymorphisms in the CD14 Gene Associated with Pulmonary Function in Farmers/LeVan T.D., Von Essen S, Romberger D.J., Lambert G.P, Martinez F.D. // Am J Resp Crit Care Med. - 2005. Vol. 171 N.4. - P. 773-779.

13. Budulac S. Toll-Like Receptor (*TLR2* and *TLR4*) Polymorphisms and Chronic Obstructive Pulmonary Disease/ Budulac S., Boezen H. M., Hiemstra P.S., Lapperre T.S., Vonk J.M. et.al.// PLoS One. 2012; 7(8): e43124. Published online 2012 August 28. Режим доступа до журн.: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.00431243/>
14. Whyte I. M. K. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms and COPD/ Whyte I. M. K., Wilson A G, Dower S K, Hubbard R, Hall I// Thorax. – 2004.- Vol. 59 N.1. –P.81–85.
15. Douville R. N. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms: No Impact on Human Immune Responsiveness to LPS or Respiratory Syncytial Virus / Douville R. N., Lissitsyn Y., Hirschfeld A. F., Becker A. B., Kozyrskyj A. L., // PLoS ONE. – 2010- V. 5 N. 8. – P. e12087.
16. Lafferty E. The role of toll-like receptors in acute and chronic lung inflammation Lafferty E., Qureshi S.T., Schnare M. //Journal of Inflammation 2010ю - Vol. 57 N.7. Режим доступа до журн. : <http://www.journal-inflammation.com/content/7/1/57>.
17. Larsson L., Szponar B., Pehrson C.//Tobacco smoking increases dramatically air concentrations of endotoxin, // Indoor Airю 2004. - Vol. 14ю – N. 6. - P. 421–424.
18. Hackett T.L. Dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine release during acute inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: an *ex vivo* study / Hackett T.L., Holloway R., Holgate S.T., Warner I.A.// *Respiratory Research*. - 2008 –Vol. 47, N. 9 – P.465-453.
19. Кайдашев И. П. NF-κB-сигнализация как основа развития системного воспаления, инсулинорезистентности, липотоксичности, сахарного диабета 2-го типа и атеросклероза. / И. П. Кайдашев // Международный эндокринологический журнал. – 2011. – № 3 (35). – С. 35–44.
20. Білоглазов В.А., Али Мохамад Таха, Гордиенко А.И. Антиэндотоксиновый иммунитет и С-реактивный белок у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких с различным иммунным ответом на эндотоксин грамотрицательной флоры// Иммунологія та алергологія. Наука і практика. 2011. №4. – 53-57 с.
21. Білоглазов В.А., Али Мохамад Таха Мукозальный антиэндотоксиновый иммунитет и липополисахаридсвязывающий белок у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. Київ-Луганськ, випуск 1 (109). - 2012. С. 78-87.
22. Antal-Szalmás P Evaluation of CD 14 in host defence// European Journal of Clinical Investigation- 2000. – Vol.30. - N.2 – P 167-179.

### Summary

#### ASP299GLY POLYMORPHISM TOLL-LIKE RECEPTORS TYPE 4 IN COPD PATIENTS WITH DIFFERENT ANTIBODIES RESPONSES TO ENDOTOXIN

Ali Mochamad Tasha

Key words: gene polymorphism, Toll-like receptors, chronic obstructive pulmonary diseases

The levels of endotoxin antibodies (anti-ET) and polymorphism Asp299Gly toll like type 4 (TLR4) in 31 COPD patients were investigated by ELISA and allele specific PCR tests correspondingly. According to the levels of anti-ET-IgG COPD patients were divided into two groups. The 1<sup>st</sup> group included 18 patients which had lower levels of anti- ET-IgG ( $2 \delta < Me \pm m$ ) - antibody ET hyporesponders. In the 2<sup>nd</sup> group 13 patients had normal or increased anti- ET IgG levels (antibody ET normohyperresponders). 23 healthy donors were also examined. Homozygous genotypes AA were found in 27 COPD patients (87,1%), 16 patients from the 1<sup>st</sup> group (88,9%) and 11 patients from the 2<sup>nd</sup> group (84,6%). There were no differences between COPD groups and healthy persons. 4 heterozygotes from COPD patients and 2 heterozygotes in each group were observed without no significant difference between COPD and healthy group. No one was Gly 299 homozygous for TLR4 polymorphism. The presence of Asp299 Gly polymorphism of TLR4 did not have any significant impact of antibodies responsiveness to ET.

State University "Crimea State Medical University named after S. I. Georgievsky", Simferopol

*Матеріал надійшов до редакції 12.11.2012 р.*