

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

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

### РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ ТОЛЛ-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ 2,4 ТА БІЛКА КЛІТИН КЛАРА В РОЗВИТКУ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДОРОСЛИХ\*

Ляховська Н.В., Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Кайдашев І.П.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

*Генетические аспекты астмы и атопии широко изучаются. Генов-кандидатов и локусов хромосом, вероятно отвечают за возникновения бронхиальной астмы (БА) определено большое количество. Целью нашей работы стало изучение полиморфизмов 2258G/A гена TLR2 (rs5743708) и 896A/G гена TLR4 (rs4986791), гена белка клеток Клара (A38G), с удельным весом 16 кДа, (CC16) среди взрослого населения. Материалы и методы. Нами было обследовано 45 больных БА в период вне обострения. Диагноз БА и степень тяжести установлено согласно утвержденных критериев. Результаты исследования: В группе больных БА достоверно чаще встречается генотип GA (11,1%) гена TLR2 ( $p=0,04$ ) в сравнении с группой контроля. У пациентов, которые являются носителями мутантной аллели A гена TLR2 в анамнезе чаще отмечались пневмонии ( $p = 0,046$ ), а также были признаки кандидоза ( $p = 0,034$ ) в сравнении с пациентами без полиморфизма. При изучении полиморфизма гена TLR 4 установлено, что генотип AG статистически вероятнее ( $p = 0,04$ ) встречается в группе с БА (15,6%), чем в контрольной группе. У больных с полиморфизмом 896A/G гена TLR4 заболевание начиналось с детства ( $p=0,03$ ), в спектре сенсibilизации были пищевые факторы ( $p=0,02$ ) и имели место проявления другой аллергической патологии ( $p=0,045$ ). Полиморфный вариант 38G гена CC16 достоверно чаще встречается у больных с БА чем в группе популяционного контроля ( $p = 0,019$ ). Особенности клинических проявлений у больных БА, которые являются носителями аллеля 38G гена CC16 являются: грибковая сенсibilизация, атопический дерматит и туберкулез в анамнезе, необходимость в частом приеме глюкокортикостероидов.*

Ключевые слова: астма, Толл-рецептор, полиморфизм, белок клеток Клара

Бронхіальна астма (БА) є глобальною проблемою, оскільки в світі нараховується близько 300 млн осіб, що страждають на дану патологію [5]. Ґрунтуючись на стандартизованих методах оцінки поширеності БА у дорослих і дітей, можна стверджувати, що даний показник у різних країнах світу складає від 1 до 18% населення та має стійку тенденцію до зростання. Зокрема, в Росії за останні 20 років поширеність БА зростає майже у 2 рази і складає сьогодні 10-15% населення [18]. Багатофакторний характер формування БА включає генетичну схильність, вплив навколишнього середовища, імунні та нейрогенні ланки неспецифічної і специфічної гіперреактивності, роль вірусно-мікробного чинника вимагає врахування кожного додаткового компоненту, здатного впливати на перебіг астми [1]. Генетичні аспекти астми та атопії широко вивчаються. Генів-кандидатів та локусів хромосом, що вірогідно відповідають за виникнення атопічної БА

велика кількість. Найчастіше в літературних джерелах посилаються на ділянки хромосом 5q23-31,6p21.1-r23, 11q13, 12q14-24.33 і 13q11-32. В цьому плані в останнє десятиріччя викликають великий інтерес роботи пов'язані зі зміною генетичного регулювання об'єктів розпізнавальних рецепторів [8], у першу чергу – Toll-подібних рецепторів (TLR). Результати роботи E.Gali та співав. [4] не знайшли асоціації між екземою, харчовою алергією та місенс-мутацією TLR2, тоді як інші дослідження підтверджують зв'язок між концентрацією IL4, IgE та порушеннями у вказаному гені [11]. Деякі автори вказують на асоціацію між рівнем секреторного IgE та генами TLR4 [14], інші науковці стверджують, що локуси генів, які пов'язані з БА в певних випадках не мають взаємозв'язку із специфічною сенсibilізацією [7]. За результатами багатьох досліджень можна зробити висновок, що наявність поліморфних варіантів генів TLR4 у дітей хворих на атопі-

\* Цитування при атестації кадрів: Ляховська Н.В., Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Кайдашев І.П. Роль поліморфізмів генів Толл-подібних рецепторів 2,4 та білка клітин Клара в розвитку бронхіальної астми у дорослих // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 5-6. – С. 71 –75.

чний дерматит може сприяти чутливості до вірусних інфекцій та обтяжувати перебіг захворювання [15]; визначає зміну характеру перебігу та ступеня вираженості клінічних проявів у дітей з БА [13]. Сьогодні проведена обмежена кількість досліджень щодо впливу генетичних варіантів СС 16 на розвиток БА, та їх результати неоднозначні (Baldini et al., 1998; Gui et al., 2003; Kalyoncu et al., 2003; Laing et al., 1998a; Laing et al., 1998; Sengler et al., 2003; Sharma and Ghosh, 2004). Більшість наукових розробок в малих популяційних виборках підтверджують асоціацію між поліморфізмом СС16 та ризиком виникнення астми (Candelaria et al., 2005; Kalyoncu et al., 2003; Laing et al., 1998; Mansur et al., 2002; Saadat et al., 2004).

Метою нашої роботи стало вивчення поліморфізмів 2258G/A гену TLR2 (rs5743708) та 896A/G гену TLR4 (rs4986791), гену білку клітин Клара (A38G), питомою вагою 16 кДа, (СС16) серед дорослого населення Полтавської популяції та визначення особливостей імунологічного статусу та клінічного перебігу БА в залежності від змін в геномі.

### Матеріали та методи

Нами було обстежено 45 осіб хворих на БА. Діагноз БА та ступінь її тяжкості встановлено відповідно до затверджених критеріїв (міжнародні рекомендації GINA, 2011) на базі алергологічного і пульмонологічного відділення Полтавської обласної клінічної лікарні. Анамнестичні дані зібрані шляхом анкетування з використанням спеціального опитувальника. Усім пацієнтам з БА були проведені загальноклінічні лабораторні, інструментальні та алергологічне обстеження (прик-тест). Обстеження проводили за умови відсутності у пацієнта загострення основного чи супутніх хронічних, відсутності гострих інфекційних захворювань та тяжкої супутньої патології, яка б могла вплинути на результати дослідження. До групи контролю увійшли зразки ДНК 90 практично здорових осіб, без алергологічного анамнезу з бази ДНК НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Визначення поліморфізмів 2258G/A гену TLR2 та 896A/G гену TLR4, гену СС16 проведено методом полімеразної ланцюгової реакції [12]. Фенотип лімфоцитів аналізували шляхом визначення рівнів експресії поверхневих антигенів клітин з використанням моноклональних антитіл CD4, CD25 (виробництво «Сорбент», Росія) та внутрішньо-

клітинного білку FoxP3 («eBioscience», США) методом проточної цитофлюориметрії на проточному цитофлюориметрі EPIX LX-MCL (Beckman Coulter, США), використовуючи програму System II TM software. Рівень загального IgE, інтерлейкіну-4,10 (ТОВ «Укрмед-Дон», Україна) в сироватці крові визначали за допомогою непрямого імуоферментного аналізу.

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  $\chi^2$ . Порівняння частот генотипів між досліджуваними групами проводили шляхом аналізу таблиць спряженості за допомогою точного тесту Фішера. Для порівняння частот алелей використовували критерій  $\chi^2$ . Для оцінки достовірності відмінностей між групами використовували точний двосторонній критерій Фішера (для малих груп). Для усіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при  $p < 0,05$ .

### Результати та їх обговорення

Серед обстежених у 5 (11,1%) пацієнтів захворювання мало інтермітуючий характер, у 23 (51,2%) осіб була легка ступінь, у 17 (37,7%) хворих – середня ступінь тяжкості перебігу БА. Генетична детермінованість БА в останній час розглядається, як один з основних факторів в етіопатогенезі даного захворювання [16]. Серед обстежених у 3 (6,6 %) хворих відмічалися алергічні прояви з боку обох батьків, матері – у 16 осіб (35,5%), батька – у 10 осіб (22,2%). Таким чином, передача спадкової схильності до алергічних захворювань частіше відмічена за лінією матері, що узгоджується з літературними даними [17].

Нами була проаналізована частота поліморфних варіантів генів TLR 2, TLR4, гену СС16 серед хворих на БА та в групі популяційного контролю (табл.1). В осіб, що входили до групи контролю, частота генотипу TLR2 GG становила 97,8%; частота гетерозиготного генотипу GA – 2,2%, генотип AA не був виявлений. У хворих на БА відповідні результати були такими: GG – 88,9%, GA – 11,1% та AA також не був виявлений, тобто відмічається статистично значима різниця ( $p = 0,04$ ) між частотами генотипів у групі контролю та у хворих на БА. Частота алелі А серед групи контролю складала 1,1%, а серед хворих на БА – 5,6%, що достовірно не відрізнялось ( $\chi^2=3,1$ ; ВШ= 4,59; ДІ 1,007-20,94;  $p=0,08$ ) (табл.1).

Табл 1.  
Внутрішньогруповий розподіл частот генотипів та поліморфних алелей генів TLR2, TLR4, СС16

Ген, поліморфізм	Частота генотипу	Група контролю	Хворі (n=45)	$p^*$	Частота алелі	Група контролю (n=90)	Хворі на БА, (n=45)	$\chi^2$ Пірсона, df=1	ВШ* (95% ДІ)	$P^{**}$
TLR2 2258G/A	GG	97,8 (88)	88,9 (40)	0,04	G	98,9 (178)	94,4 (85)	3,10	4,59 (1,007-20,94)	0,08
	GA	2,2 (2)	11,1 (5)		A	1,1 (2)	5,6 (5)			
	AA	-	-							
TLR4 896A/G	AA	95,6 (86)	84,4 (38)	0,04	A	97,8 (176)	92,2 (83)	3,42	3,52 (1,06-11,66)	0,06
	AG	4,5 (4)	15,6 (7)		G	2,2 (4)	7,8 (7)			
	GG	-	-							
CC 16 A38G	AA	86,9 (40)	64,4 (29)	0,019	A	86	71	6,99	3,84 (1,45-10,12)	0,08
	AG	13 (6)	28,9 (13)		G	6	19			
	GG	-	6,52 (3)							

Примітка:  $p^{**}$  - рівень значимості, отриманий тестом  $\chi^2$  – для груп контролю та хворих на АБА.  
 $p$  - рівень значимості, отриманий точним тестом Фішера.

При дослідженні поліморфізму 896A/G гену TLR4 в групі контролю частота генотипу AA становила 95,6%, гетерозиготного генотипу AG – 4,5%, генотип GG не

виявлений. У хворих на БА відповідно: AA – 84,4%, AG – 15,6%, GG – не знайдено. Між частотами генотипів у групі популяційного контролю та хворих на БА

виявлена достовірна різниця ( $p < 0,05$ ), що може характеризувати дану патологію, як спадкове порушення імунної відповіді. Частота мутантної алелі G у групі хворих на БА була статистично вища ( $\chi^2 = 3,42$ ;  $p = 0,064$ ) та склала 7,8%, у порівнянні з групою контролю (табл. 1).

В групу контролю для вивчення поліморфізму гену CC16 відібрано 46 зразків ДНК осіб, що не страждали на алергічну патологію. У вказаній групі результати були наступними: частота гомозиготного генотипу AA становила 86,9% (40 осіб) генотип GG не був виявлений, частота гетерозиготного генотипу AG склала 13% (6 осіб). У хворих на АБА відповідні дані були такими: генотип AA – 64,4% (29 осіб), AG – 28,9% (13 осіб), GG у 6,52% хворих (3 осіб), тобто між частотами генотипів у групі контролю та у хворих на БА відмічається достовірна різниця ( $p = 0,019$ ). Частота алелю A у контрольній групі склала 93,4%, у хворих на АБА – 78,9%. Частота алелю G серед хворих на БА склала 7,8%, серед групи контролю – 2,2%, що достовірно не відрізнялось ( $\chi^2=3,42$ ; ВШ= 3,52; ДІ 1,06- 11,66;  $p=0,06$ ) (табл.1).

При аналізі внутрішньогрупового розподілу частот всіх вище зазначених генотипів та поліморфних алелей спостерігався нерівномірний розподіл алелей, на що вказує проведений аналіз показника врахування рідкісних алелей ( $\mu < 2$ ) і частки рідкісних алелей ( $h > 0$ ). Для всіх досліджуваних локусів в групах контролю та

хворих на БА розподіли генотипів відповідали очікуваним за рівновагою Харді – Вайнберга. Також виявлено співпадання очікуваної гетерозиготності та гетерозиготності, яка спостерігається, що свідчить про рівновагу генетичної структури даної популяції.

Одиничний нуклеотидний поліморфізм (ОНП) генів Толл-подібних рецепторів впливають на загальний соматичний стан мають клінічні прояви АБА. Гетерозиготний генотип GA гену TLR 2 ( $n=5$ ) спостерігався тільки у жінок (100%). Достовірно частіше у носіїв алелі A ( $p = 0,046$ ) в анамнезі були пневмонії (2 і більше разів за життя), а також відмічались ознаки кандидозу ( $p = 0,034$ ) в порівнянні з пацієнтами без поліморфізму (табл.2). Внаслідок змін в генах TLR2 відбувається порушення розпізнавання інфекційних агентів (в тому числі грибкових), що призводить до дисбалансу функціонування системи вродженого імунітету та розвитку хронічних запальних захворювань. При порівнянні рівнів імунологічних показників серед хворих на БА з різними варіантами гену TLR2 статистично достовірна відмінність спостерігаються лише в концентрації цитокінів. Так, вищий рівень IL-4 ( $63,7 \pm 8,7$  пг/л) спостерігався у групі без проявів поліморфізму (критерій Манна-Уїтні  $U_{(n1=40; n2=5)} = 2,79$ ;  $p=0,005$ ), а рівень IL-10 був достовірно підвищений у носіїв гетерозиготного варіанту геному TLR2 (критерій Манна-Уїтні  $U_{(n1=40; n2=5)}=33,0$ ;  $p=0,01$ ) (табл.3).

Табл.2  
Клінічні ознаки в залежності від варіанту генів TLR2, TLR4, CC16

Наявність ознаки		Носії генотипу GG гену TLR2, (n=40)	Носії генотипу GA гену TLR2, (n=5)	p
<b>Поліморфізм 2258G/A гена TLR2</b>				
В анамнезі часті пневмонії (2 і більше разів за життя)	так	12	4	0,046
	ні	28	1	
В анамнезі ознаки кандидозу та або грибкового ураження шкіри	так	11	4	0,036
	ні	29	1	
<b>Поліморфізм 896A/G гена TLR4</b>				
		Носії генотипу AA гену TLR4, (n=38)	Носії генотипу AG гену TLR4, (n=7)	p
Полі сенсibiliзація, що включає харчові алергени	так	7	7	0,013
	ні	31	0	
Супутні полі алергічні прояви (риніт, кон'юнктивіт)	так	6	5	0,045
	ні	32	2	
В анамнезі прояви "атопічного маршу"	так	7	6	0,029
	ні	31	1	
<b>Поліморфізм A38G гена CC16</b>				
		Носії генотипу AA гену CC16, (n=29)	Носії алелі G гену CC16, (n=16)	p
Мають прояви atopічного дерматиту	так	4	6	0,04
	ні	24	10	
Частіше користуються інгаляційними глюкокортикоїдами	так	3	9	0,02
	ні	26	7	
Прояви грибової сенсibiliзації	так	3	8	0,03
	ні	26	8	

ОНП гена TLR4, який кодує позаклітинну структуру ектодомену рецептора, полягає в заміні аспарагінової амінокислоти на гліцинову Asp299Gly 1187 (rs4986790) та на кінцевому етапі пов'язано з пригніченим фосфорилуванням I $\kappa$ B- $\alpha$  після стимуляції ЛПС, що, своєю чергою, призводить до зниження транслокації NF $\kappa$ B в ядро та позначається на пригніченні синтезу відповідних прозапальних цитокінів. Подальше порушення передачі активаційного сигналу NF $\kappa$ B су-

проводжується дисбалансом синтезу T $\alpha$ 1/T $\alpha$ 2, та визначає ступінь вираженості клінічних проявів захворювання та наявності супутньої патології. Поліморфізм Asp299 Gly TLR4 зі зміною алелю Asp на Gly був виявлений у 7 осіб. У 6 осіб цієї групи ( $p=0,03$ ) прояви АБА починалися в ранньому дитинстві; 4 пацієнти пройшли типові етапи "атопічного маршу". Достовірно частіше ( $p=0,02$ ) у цих хворих у порівнянні з пацієнтами без вказаних генетичних змін визначалась харчові

фактори сенсibilізації. Клінічною ознакою вказаного ОНП TLR4 також була супутня алергічна патологія (ринокон'юнктивальний синдром та дерматит) ( $p=0,045$ ) та захворювання ШКТ (табл.2). Отже, поліморфізм гену Asp299 Gly TLR4 здебільшого впливає на загальні прояви atopії у хворих на БА, ніж на ознаки бронхо-легеневої дифункції та ступінь тяжкості да-

ної патології, на відміну від даних отриманих іншими авторами [10]. Відмічені достовірні зміни рівня  $CD4^+/25^+/Foxp3^+$  (критерій Манна-Уїтні  $U_{(n=38;n=7)} = 68,0$ ;  $p=0,04$ ) та IL10 у хворих з поліморфізмом 896A/G гену TLR4 (критерій Манна-Уїтні  $U_{(n=38;n=7)} = 60,5$ ;  $p=0,02$ ) (табл.3).

Табл.3  
Імунологічні показники в залежності від генотипу гену

Імунологічні показники	Носії генотипу GG гену TLR2, (n=40)	Носії генотипу GA гену TLR2, (n=5)	p
Поліморфізм 2258G/A гену TLR2			
IL-10, пг/л	0,42±0,02	0,7 ± 0,05	<b>0,013</b>
IL-4, пг/л	63,7±8,7	24,1 ±6,28	<b>0,03</b>
Поліморфізм 896A/G гену TLR4			
	Носії генотипу AA гену TLR4, (n=38)	Носії генотипу AG гену TLR4, (n=7)	p
CD 4 <sup>+</sup> /25 <sup>+</sup> /Foxp3 <sup>+</sup> , Г/л	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01	<b>0,04</b>
IL-10, пг/л	0,45±0,02	0,35 ± 0,03	<b>0,02</b>
Поліморфізм A38G гену CC16			
	Носії генотипу AA гену CC16, (n=29)	Носії алелі G гену CC16, (n=16)	p
IgE, МОд/мл	123,7 ± 12,26	244,9 ± 30,33	<b>0,0013</b>

При розгляді результатів поліморфізму гену CC 16 з'ясовано, що переважна більшість осіб з ОНП вказаного гену мали сенсibilізацію до двох і більше алергенів, особливістю цих хворих була гіперчутливість до грибкових алергенів (найчастіше до групи *Aspergillus*), так в групі з гетерозиготою гену CC16 вказані прояви були у 6 осіб, з мутантною гомозиготою у 2 осіб, що є статистично достовірно при порівнянні з генотипом AA гену CC16 (табл. 3). Отримані нами результати співпадають з даними науковців зі США Claire de Burbure та співавторів [3] про пошкоджуючу дію на епітелій легень грибкових алергенів, проте статистично достовірних показників, на відміну від нас, вони не отримали. Серед супутньої патології звертає на себе увагу достовірна різниця за точним методом Фішера (табл.2) по кількості осіб, що мають прояви atopічного дерматиту при порівнянні груп з поліморфізмом гену CC 16. Так, серед носіїв генотипу GG 2 особи, що мають інтермітуючий перебіг хворіють на atopічний дерматит, серед носіїв генотипу AG- 4 особи. Насправді, вплив поліморфізму генів епітеліальних клітин легень (CC16) на ушкодження шкіри має суперечливий характер, але є автори [2], які вказують на прямий взаємозв'язок поліморфізму гену CC16 з atopічним дерматитом у дорослих. При опрацюванні імунологічних даних хворих на АБА з різними варіантами генотипів гену CC16 з'ясовано, що статистично достовірна різниця відмічалась лише за рівнем загального IgE. У хворих, які є носіями гетерозиготи гену CC16 цей показник склав 244,9 ± 30,33 МОд/мл, гомозиготи GG 191,7± 13,0 МОд/мл, гомозиготи за AA склав 123,7 ± 12,26 МОд/мл, що є статистично вірогідно (метод Краскала-Уоліса,  $p=0,0013$ ) (табл.3), тобто спостерігається залежність рівня загального IgE від стану генетичного апарату. Можливо це пов'язано з однаковим розташуванням на хромосомі 11q13, як гену білка клітин Клара, так і високоафінного FcεRI-рецептора-β (FcεRI-β) IgE.

Під час аналізування лікарських засобів, що приймали хворі з'ясовано, що особи, які були носіями генотипу AG або GG гену CC 16 частіше використовували глюкокортикоїдні препарати (табл.2). Це можна пояснити, де в чому схожою дією на молекулярному рівні білків клітин Клара та глюкокортикоїдів. Відомо,

що активація гену CC16 інгібує функцію ядерного фактору - κB (NF-κB) шляхом подавлення фосфорилування IκB-β в епітеліальних клітинах дихальних шляхів, що в свою чергу призводить до зменшення запалення в легеневій тканині [9]. Дослідження останніх років свідчать, що глюкокортикоїди взаємодіють не тільки з GRE (glucocorticoid response element), а і з різними факторами транскрипції, такими як AP-1 і NF-κB та інші. Кортикостероїди впливають на транскрипційну активацію цитоплазматичного інгібітора NF-κB – IκBα. Ще однією особливістю носіїв мутантного гомозиготного генотипу (GG) є перенесений активний туберкульоз у 2 пацієнтів (8 та 18 років до моменту нашого обстеження); при порівнянні з носіями генотипу AA є статистично вірогідна різниця ( $p=0,047$ ) (табл.2). Відомо, що туберкульоз є інфекційним захворюванням, сприйнятливість до якого залежить від багатьох факторів серед них, можливо, і зміни в гені CC16. Проте є дані, що активація TLR2 призводить до внутрішньоклітинного кілінгу *M. tuberculosis* макрофагами [6]. Для з'ясування можливого поєднання різних генотипів всіх генів, що визначаються проведено аналіз гаплотипів. Для проведення статистичної обробки отриманих даних відібрано 46 зразків ДНК з вказаної вище контрольної групи по TLR-рецепторам. Виявлено, що найчастіше зустрічається гаплотип GGAAAA, як в групі контролю, так і у хворих АБА (табл.4). В нашому дослідженні виявлено, що 1 особа з генотипом GG гену CC16 (гаплотип- GAAAGG) та 1 особа з генотипом AA (гаплотип GAAAAA) гену CC16 мали гетерозиготний варіант (GA) гену TLR2 і мали в анамнезі прояви активного туберкульозу. При аналізі гаплотипів генів TLR4 та CC16 з'ясовано, що 3 особи з гетерозиготним генотипом гену CC16 (гаплотип GGAGAG) та 1 особа з гомозиготою (гаплотип GGAGGG) мали гетерозиготний варіант гену TLR4, у всіх цих хворих відмічалась часті прояви ГПБІ, що мали затяжний характер та потребували використання антибактеріальних препаратів. При аналізі імунологічних показників серед носіїв гаплотипів виявлено, що на рівні статистичної тенденції ( $p \leq 0,06$ ) відрізняється рівень  $CD4^+/25^+/Foxp3^+$  у носіїв гаплотипів з мутантним алелем. Вивчення поліморфних гаплотипів генів CC16,

TLR2 та TLR4 є важливим аспектом у розумінні клінічних проявів БА.

Табл. 4

Внутрішньогруповий розподіл гаплотипів генів TLR2, TLR4, CC16

CC16 TLR4 TLR2	GG AA AA	GA AA AA	AA AA AA	GG AA AG	GA AA AG	AA AA AG	GG AA GG	GA AA GG	AA AA GG	GG AG AA	GA AG AA	AA AG AA	GG AG AG	GA AG AG	AA AG AG	GG AG GG	GA AG GG	AA AG GG	GG GG AA	GA GG AA	AA GG AA	GG GG AG	GA GG GA	AA GG AG	GG GG AA	GA GG GG	AA GG GG
Група контролю (n= 46)	63,0 (29)	4,3 (2)	0	23,9 (11)	0	0	0	0	0	4,3 (2)	0	0	4,3 (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Хворі на АБА (n= 45)	51,1 (23)	6,7 (3)	0	20,0 (9)	2,2 (1)	0	2,2 (1)	2,2 (1)	0	6,7 (3)	0	0	6,7 (3)	0	0	2,2 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

**Висновки:**

1. В групі хворих на БА достовірно частіше зустрічається генотип GA (11,1%) гену TLR2 (p=0,04) в порівнянні з групою контролю. У пацієнтів, які є носіями мутантної алелі A гену TLR2 в анамнезі частіше відмічались пневмонії (p = 0,046), а також були ознаки кандидозу (p = 0,034) в порівнянні з пацієнтами без поліморфізму.

2. При вивченні поліморфізму гену TLR 4 з'ясовано, що генотип AG статистично вірогідніше (p =0,04) зустрічається в групі з БА (15,6%) ніж в контрольній групі. У хворих з поліморфізмом 896A/G гену TLR4 захворювання починалось з дитинства (p=0,03), в спектрі сенсibiliзації були харчові чинники (p=0,02) та мали місце прояви іншої алергічної патології (p=0,045).

3. Поліморфний варіант 38G гену CC16 достовірно частіше зустрічається у хворих з БА ніж в групі популяційного контролю (p = 0,019). Особливостями клінічних проявів БА у хворих, які є носіями алелі 38G гену CC16 є: грибоквова сенсibiliзація, atopічний дерматит та туберкульоз в анамнезі, необхідність в частішому прийомі глюкокортикостероїдів.

Отже, дослідження поліморфізмів 896A/G гену TLR4 та 2258G/A гену TLR2, A38G гену CC16 має важливе значення, як в діагностиці так і в лікуванні та профілактиці БА.

**Література**

- Anne L. Wright Анализ эпидемиологических исследований: факты и артефакты // Аллергология. — 2003. — № 2. — P.26-28
- Candelaria P.V. Association between asthma-related phenotypes and the CC16 A38G polymorphism in an unselected population of young adult Danes./ P.V. Candelaria, Backer V, et al // Immunogenetics. -- 2005.-- №57 -- P.25-32.
- Claire de Burbure. Uteroglobin-Related Protein 1 and Clara Cell Protein in Induced Sputum of Patients With Asthma and Rhinitis/ Claire de Burbure, Patrizia Pignatti, Massimo Corradi // Chest.—2007.— №131.—P.172-179.
- Galli E., Ciucci A., Cersosimo S. Et al. Eczema and food allergy in an Italian pediatric cohort: no association with TLR-2 and TLR-4 polymorphisms. J. Immunopathol. 2010- №2- P. 671- 675.
- Guyatt GH, Oxman AD, Kunz R. Going from evidence to recommendation.// BMJ- 2008.- P. 336

- Long Xiao-Bo. Clara Cell 10-kDa Protein Gene Transfection Inhibits NF-kB Activity in Airway Epithelial Cells./ Xiao-Bo Long// April 2012.-- Volume 7.-- режим доступу: www.plosone.org
- Michael S. D. Kormann, PhD. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. J. Allergy and clinical immunology. 2008; Vol.122: 86-92.
- Postma D., Koppelman G. Genetics of asthma: where are we and where do we go? The Proceedings of the American Thoracic Society. 2009; V. 6: 283-287.
- Thoma-Uszynski S. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-like receptor/ S. Thoma-Uszynski // Science.- 2001. — Vol 291. — P. 1544 – 1547.
- Yang I.A. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics/ IA Yang1, SJ Barton1, S Rorke1 and other// Genes and Immunity.-2004.- V5.-P. 41–45
- Yoshika M., Fukuishi N., Iriguchi S., et al. Lipoteichoic acid downregulates FcεRI expression on human mast cells through Toll-like receptor 2. J. Allergy. Clin. Immunol. 2007.- V. 120.-P. 452-461.
- Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Боброва Н.О. та ін. Роль поліморфізму Toll-подібного рецептора 4 Asp299Gly у розвитку бактеріальних інфекцій, що передаються статевим шляхом / Проблеми екол. та мед. — 2009. — Т.13, № 5-6. — С. 3-6.
- Крючко Т.О., Кайдашев І.П., Вовк Ю.О. и др. Генетичний поліморфізм Toll-подібного рецептора 4 у дітей з atopічною бронхіальною астмою / Клін. імунол. Алергол. Інфектол. — 2011. — № 5. — С. 52-54.
- Куценко Н.Л. Ассоциация полиморфизма Toll-подобного рецептора 4 Asp299Gly с повышенным уровнем продукции аллергенспецифических иммуноглобулинов E у пациентов с аллергическими заболеваниями./ Н.Л Куценко., О.В Измайлова., Л.Э. Веснина [та ін.]// Иммунология. —2011.-- №6 -- С. 310-313.
- Левченко Л. Ю. Поліморфізм 896 A/G гену TLR4, а не гену 1196 C/T гену TLR4 та 2258 G/A гену TLR2, визначає тяжкий перебіг atopічного дерматиту у дітей. / Л. Ю. Левченко, О.В. Ізмайлова, О. А. Шликова [та ін.]// Цитология і генетика. — 2013-- №1.—С. 41-45.
- Охотникова Е.Н. Аллергический «марш»: связь поколений и эскалация аллергии у детей (лекция) // Современ. педиатрия. - 2008. - №4(21). - С.190-197.
- Черкашина И.И., Никулина С.Ю. Клинико-генетические особенности больных бронхиальной астмой и их родственников // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2008. — №9. — С. 47-50.
- Чучалин А.Г. Бронхиальная астма и астма подобные состояния // Пульмонология. — 2007. — №11. — С. 1-9

## English version: THE ROLE OF GENES POLYMORPHISM OF TOLL-LIKE RECEPTORS 2,4 AND CLARA CELL PROTEIN IN THE DEVELOPMENT OF ASTHMA IN ADULTS\*

Lyahovskaya N.V., Izmailova O.V., Shlykova O.A., Kaydashev I.P.

Research Institute for Genetic and immunological bases for the development of pathology and pharmacogenetics Supreme State educational institution of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava.

*Genetic aspects of asthma and atopy have been widely studied. Candidate genes and loci of chromosomes probably responsible for the occurrence of bronchial asthma (BA) is defined by a large amount. The aim of our work was to study polymorphisms 2258G / A gene TLR2 (rs5743708) and 896A / G gene TLR4 (rs4986791), Clara cell protein gene (A38G), with a specific weight of 16 kDa (CC16) in the adult population. Materials and Methods. We examined 45 patients with asthma in the period without exacerbation. Diagnosis of asthma severity and installed in accordance with the approved criteria. Results: Patients with BA significantly more common had genotype GA (11,1%) gene TLR2 ( $p = 0.04$ ) compared with the control group. In patients who are carriers of a mutant allele of a gene TLR2 A history pneumonia frequently observed ( $p = 0.046$ ) and there were signs of candidiasis ( $p = 0.034$ ) compared with patients with no polymorphism. In the study of polymorphism of TLR 4 found that genotype AG statistically more likely ( $p = 0.04$ ) is found in the BA group (15.6%) than in the control group. Patients with polymorphism 896A / G TLR4 gene disease begins in childhood ( $p = 0.03$ ) in the spectrum of sensitization were dietary factors ( $p = 0.02$ ) and there were other manifestations of allergic diseases ( $p = 0.045$ ). Polymorphic variant gene 38G CC16 significantly more common in patients with BA than in the control population ( $p = 0.019$ ). Clinical manifestations in patients with BA who are carriers of the gene allele 38G CC16 are fungal sensitization, atopic dermatitis and history of tuberculosis, the need for frequent doses of glucocorticoids.*

Key words: asthma, Toll Like receptor, polymorphism, Clara cell protein.

Bronchial asthma (BA) is a global problem [5]. Based on standardized methods for estimating the prevalence of asthma in adults and children, it can be argued that this figure in different countries ranges from 1 to 18% of the population has steadily increased. In particular, in Russia for the last 20 years, the prevalence of asthma increased by almost a factor of 2 and is now 10-15% of the population [18]. Multifactorial nature of the formation of asthma include genetic predisposition, environmental influences, immune and neurogenic level of nonspecific and specific hyperreactivity, the role of viral and microbial factor requires consideration of each additional component, capable of influencing the course of asthma [1]. Genetic aspects of asthma and atopy have been widely studied. Candidate genes and loci of chromosomes probably responsible for the occurrence of BA has defined a large number. Most often in the literature refer about the regions of chromosomes 5q23-31, 6p21.1-p23, 11q13, 12q14-24.33 and 13q11-32. In this regard, in the last decade of great interest associated with a change of the genetic regulation of Toll-like receptors (TLR) [8]. E.Gali et al. [4] found no association between eczema and food allergy mix-mutation TLR2, whereas other studies confirm the correlation between the concentration of IL4, IgE and violations in this gene [11]. Some authors point to a relationship between the level of IgE and genes TLR4 [14], other scholars argue that in some cases do not have the relationship with specific sensitization [7]. We can conclude that the presence of TLR4 gene polymorphisms in children with atopic dermatitis can promote hypersensitivity to viral infections and burden of the disease [15] define the changing nature of the course and severity of clinical manifestations of asthma in children. [13].

Currently, a limited number of studies conducted on the impact of genetic variants on the development of BA CC16, their results have been mixed (Baldini et al., 1998; Gui et al., 2003; Kalyoncu et al., 2003; Laing et al., 1998a; Laing et al., 1998; Sengler et al., 2003; Sharma and Ghosh, 2004). Most scientific research in small population group confirm the association between the polymorphism of CC16 and risk asthma (Candelaria et al., 2005; Kalyoncu et al., 2003; Laing et al., 1998; Mansur et al., 2002; Saadat et al., 2004).

The aim of our work was to study polymorphisms 2258G / A gene TLR2 (rs5743708) and 896A / G gene TLR4 (rs4986791), Clara cell protein gene (A38G), with a specific weight of 16 kDa (SS16) in the adult population of Poltava regions and determine the clinical course BA based on changes in the genome.

Materials and Methods. We examined 45 patients with the BA. Diagnosis of asthma and its severity will establish the approved criteria (international recommendations GINA, 2011) on the basis of Allergy and Pulmonology Poltava Regional Hospital. All patients with BA were held general clinical laboratory and instrumental examination of allergy (skin prick test). The survey was carried out in the absence of the patient's worsening primary or concomitant chronic, non-acute intercurrent infectious diseases and severe comorbidity, which could affect the results of the study. The control group included 90 DNA samples from healthy individuals without allergic history of DNA base CRI genetic and immunological bases for the development of pathology and pharmacogenetics of Ukrainian Medical Dental Academy. Identification of polymorphisms 2258G / A gene TLR2 and 896A / G gene TLR4, gene CC16 conducted by polymerase chain reac-

\* To cite this English version: Lyahovskaya N.V., Izmailova O.V., Shlykova O.A., Kaydashev I.P.. The Role of Genes Polymorphism of Toll-like Receptors 2,4 and Clara Cell Protein in the Development of Asthma in Adults // Problemy ekologii ta medytsyny. - 2013. - Vol 17, № 5-6. - P. 76 -80.

tion [12]. The phenotype of the lymphocytes was assessed by determining the expression levels of cell surface antigens using the monoclonal antibodies CD4 +, CD25 ("Sorbent", Russia), and Intracellular protein FoxP3 («eBioscience», USA) on a flow cytometry EPIX LX-MCL (Beckman Coulter, USA) using a program System II TM software. Serum total IgE, IL-4, 10 (OOO "Ukrmed Don", Ukraine) in serum was determined by indirect IFA analysis.

Mathematical processing of the data was performed using the program «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc). The distribution of genotypes of polymorphic loci with the test checked for compliance with Hardy-Weinberg equilibrium using the criterion  $\chi^2$ . Comparison of genotype frequencies between the study groups was performed by analysis of contingency tables using Fisher's exact test. To compare the allele frequencies used criterion  $\chi^2$ . To assess the significance of differences between groups using two-tailed Fisher's exact (for small groups). For all types of analysis were considered statistically significant differences at  $p < 0.05$ .

Results and discussion. Genetic determinism of BA recently regarded as one of the main factors in the etiopathogenesis of this disease [16]. Among surveyed in 3 (6.6%) patients had allergic reactions on the part of both parents, mother - in 16 people (35.5%), father - in 10 people (22.2%). Thus, the transmission of hereditary predisposition to allergic diseases often marked on the mother, which is consistent with literature data [17].

We analyzed the frequency of polymorphic variants of genes TLR 2, TLR4, CC16 gene among patients with BA and population control group (Table 1). Individuals who belonged to the control group, the frequency of TLR2 GG genotype was 97.8%, the frequency of heterozygous genotype GA - 2.2%, AA genotype was detected. Pa-

tients with BA results were : GG - 88.9%, GA - 11.1% and AA also was not identified, there was a statistically significant difference ( $p = 0.04$ ) between the frequencies of genotypes in the control group and patients BA. Frequency of allele A of the control group was 1.1%, and among patients BA - 5.6%, which did not differ significantly ( $p = 0, 08$ ) (Table 1).

In the study of polymorphism 896A / G TLR4 gene in the control group, the frequency of AA genotype was 95.6%, heterozygous genotype AG - 4.5%, GG genotype was not found. Patients BA respectively: AA - 84.4%, AG - 15.6%, GG - not found. Between the frequencies of genotypes in the population control group and patients with BA was significant difference ( $p < 0.05$ ), which can characterize this pathology is an inherited disorder of the immune response. The frequency of the mutant G allele in patients with BA was statistically higher ( $p = 0.064$ ) and was 7.8%, compared with the control group (Table 1).

The control group for the study of gene polymorphism CC16 was selected 46 DNA samples from people who are not suffering from an allergic pathology. Within this group the results were as follows: the frequency of the homozygous AA genotype was 86.9% (40 people), GG genotype was not detected, the frequency of the heterozygous genotype AG was 13% (6 people). Patients BA relevant data were as follows: genotype AA - 64.4% (29 people), AG - 28.9% (13 people), GG 6.52% of patients (3 people), that is, between the frequencies of genotypes in the group control and patients BA noted a significant difference ( $p = 0.019$ ). Frequency of allele A in the control group was 93.4% in patients with AAA - 78.9%. G allele frequency among patients with BA was 7.8% in the control group - 2.2%, which did not differ significantly ( $p = 0.06$ ) (Table 1).

Table 1. The Frequency Distribution of Genotypes and Alleles gene's TLR2, TLR4, CC16

Gene, polymorphism	Genotypes	Control group	Patients with asthma (n=45)	p*	Alleles	Control group	Patients with asthma (n=45)	$\chi^2$ , df=1	p**
TLR2 2258G/A	GG	97,8 (88)	88,9 (40)	0,04	G	98,9 (178)	94,4 (85)	3,10	0,08
	GA	2,2 (2)	11,1 (5)		A	1,1 (2)	5,6 (5)		
	AA	-	-						
TLR4 896A/G	AA	95,6 (86)	84,4 (38)	0,04	A	97,8 (176)	92,2 (83)	3,42	0,06
	AG	4,5 (4)	15,6 (7)		G	2,2 (4)	7,8 (7)		
	GG	-	-						
CC 16 A38G	AA	86,9 (40)	64,4 (29)	0,019	A	86	71	6,99	0,008
	AG	13 (6)	28,9 (13)		G	6	19		
	GG	-	6,52 (3)						

\* $p \leq 0,05$  in comparison with the control group

In the analysis of intra-frequency distribution of all the above genotypes and alleles observed uneven distribution of alleles, as indicated by the analysis of index excluding rare alleles ( $a < 2$ ) and the proportion of rare alleles ( $h > 0$ ). For all the studied loci in the control groups and patients ABA genotype distributions were as expected for the equilibrium of Hardy - Weinberg. Also found a match expected heterozygosity and heterozygosity, which is observed, indicating that the equilibrium genetic structure of the population. Heterozygous genotype GA gene TLR 2 ( $n = 5$ ) was observed only in women (100%). Significantly more often carriers of allele A ( $p = 0.046$ ) had a history of pneumonia (2 or more times during his life), and there were signs of candidiasis ( $p = 0.034$ ) compared with patients without the polymorphism

(Table 2). Due to changes in the TLR2 gene detection is a disturbance of infectious agents (including fungal), which leads to an imbalance of the innate immune system functioning and development of chronic inflammatory diseases. When comparing the levels of immunological parameters in patients with different BA TLR2 gene variants statistically significant difference was observed only in the concentrations of cytokines. Thus, high levels of IL-4 ( $63,7 \pm 8,7$ , pg /L) were observed in the group without exhibiting polymorphism (Mann-Whitney U ( $n_1 = 40$ ;  $n_2 = 5$ ) 2.79,  $p = 0.005$ ) and IL-10 levels were significantly elevated in carriers of heterozygous genomic embodiment TLR2 (Mann-Whitney U ( $n_1 = 40$ ;  $n_2 = 5$ ) 33.0,  $p = 0.01$ ) (Table 3).

Table 2  
The Clinical Features of Asthma Depend on Genes Variants TLR2, TLR4, CC16

Attribute		Genotypes GG gene TLR2, (n=40)	Genotypes GA gene TLR2, (n=5)	p <sup>*</sup>
Polymorphism 2258G/A gene TLR2				
Frequent pneumonia (more than 2 time a life)	yes	12	4	<b>0,046</b>
	no	28	1	
Symptoms of candidiasis and \ or fungal skin lesions	yes	11	4	<b>0,036</b>
	no	29	1	
Polymorphism 896A/G gene TLR4				
		Genotypes AA gene TLR4, (n=38)	Genotypes AG gene TLR4, (n=7)	p <sup>*</sup>
Polysensibilisation that including food alergens	yes	7	7	<b>0,013</b>
	no	31	0	
Comorbidities (rhinitis, conjunctivitis)	yes	6	5	<b>0,045</b>
	no	32	2	
"Atopic march" in the history of deases	yes	7	6	<b>0,029</b>
	no	31	1	
Polymorphism A38G gene CC16				
		Genotypes AA gene CC16, (n=29)	Genotypes AG gene CC16, (n=16)	p <sup>*</sup>
Comorbidities atopc dermatitis	yes	4	6	<b>0,04</b>
	no	24	10	
More likely to use inhaled glucocorticoids	yes	3	9	<b>0,02</b>
	no	26	7	
Funginal sensibilisation	yes	3	8	<b>0,03</b>
	no	26	8	

Gene SNP TLR4, which encodes the extracellular structure ektodomenu receptor is replaced by a glycine amino acid aspartic Asp299Gly 1187 (rs4986790) and the final stage is connected with a suppressed phosphorylation of IκB-alpha following stimulation with LPS, which in turn leads to a decrease in translocation of NFκB nucleus and affects the synthesis of the corresponding inhibition of proinflammatory cytokines. Further disruption of NFκB activation signal is accompanied by an imbalance of Th1/Th2 synthesis and determines the severity of the clinical manifestations of the disease and the presence of comorbidity. Asp299 Gly TLR4 polymorphism with change of Asp to Gly allele was detected in 7 patients. In 6 persons in this group (p = 0.03) manifestations BA began in early childhood, and 4 patients underwent standard steps "atopic march." Significantly more often (p = 0.02) in these patients compared with patients without these genetic changes determined dietary factors sensitization. Clinical sign of the TLR4 SNP was also associated with allergic pathology (p = 0.045) and gastrointestinal diseases (Table 2). Thus, gene polymorphism Asp299 Gly TLR4 mainly affects the common manifestations of atopy patients with BA than signs bronchopulmonary difunktsii and severity of this disease, in contrast to the data obtained by other authors [10] showed a significant change in the level of CD4<sup>+</sup> / 25<sup>+</sup> / Foxp3<sup>+</sup>

(Mann-Whitney U (n = 38; n = 7) = 68,0; p = 0,04) and IL10 patients with polymorphism 896A / G gene TLR4 (Mann-Whitney U (n = 38; n = 7) = 60,5; p = 0,02) (Table 3). In reviewing the results of gene polymorphism CC 16 found that the vast majority of individuals had sensitization to two or more allergens feature of these patients had hypersensitivity to fungal allergens (often group Aspergillus), so in the group with heterozygotes gene CC16 these manifestations were 6 people mutant homozygotes in 2 people, which is statistically significant when compared with the AA genotype CC16 gene (Table 3). Our results coincide with the scientific data [3] on the importance pathogenetic damaging effects on lung epithelium fungal allergens, but statistically significant indicators, unlike us, they have not received. Among comorbidities noteworthy significant difference on Fisher's exact test (Table 2) by the number of individuals with atopic dermatitis in comparison with groups polymorphism CC16. Thus, among the genotype GG2 persons who suffer from intermittent for atopic dermatitis among genotype AG - 4 people. In fact, the effect of the polymorphism of lung epithelial cells (CC16) on the skin damage is contradictory character, but there are authors [2], which indicate a direct relationship between gene polymorphism CC16 patients with atopic dermatitis in adults.



Table 3  
Immunological parameters Dependency Genotypes

Immunological parameters	Genotypes GG gene TLR2, (n=40)	Genotypes GA gene TLR2, (n=5)	p <sup>*</sup>
Polymorphism 2258G/A gene TLR2			
IL-10, pg/l	0,42±0,02	0,7 ± 0,05	<b>0,013</b>
IL-4, pg/l	63,7±8,7	24,1 ±6,28	<b>0,03</b>
Polymorphism 896A/G gene TLR4			
	Genotypes AA gene TLR4, (n=38)	Genotypes AG gene TLR4, (n=7)	p <sup>*</sup>
CD 4 <sup>+</sup> /25 <sup>+</sup> /Foxp3 <sup>+</sup> , G/l	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01	<b>0,04</b>
IL-10, pg/l	0,45±0,02	0,35 ± 0,03	<b>0,02</b>
Polymorphism A38G gene CC16			
	Genotypes AA gene CC16, (n=29)	Genotypes AG gene CC16, (n=16)	p <sup>*</sup>
IgE, MOd/ml	123,7 ± 12,26	244,9 ± 30,33	<b>0,0013</b>

In the analysis of immunological data of patients with different variants of the BA genotypes CC16 found that a statistically significant difference was observed only at the level of total IgE. The carriers of the heterozygous gene CC16 figure was 244,9 ± 30,33 MOD / ml, homozygote GG 191,7 ± 13,0 MOD / ml, homozygote AA - 123,7 ± 12,26 MOD / ml, which is significantly (Kruskal-Wolisa method, p = 0.0013) (Table 3). The data on total IgE levels depending on the state of the genetic apparatus CC16. Perhaps this is due to located on chromosome 11q13, as Clara cell protein gene and FcεRI-receptor - b (FcεRI-b) IgE.

In the analysis of drug treatment found that genotype AG or GG CC 16 gene significantly increased the use of glucocorticoids (Table 2). Low sensitivity to these agents can be explained by similar mechanism of action of Clara cell protein and glucocorticoids [9].

Another feature of the carriers of the mutant homozygous genotype (GG) is transferred active tuberculosis in 2 of 3 patients (8 and 18 years prior to our survey). It is known that tuberculosis is an infectious disease whose activity depends on many factors, among them, possibly, changes in gene SS16. However, there is evidence that activation of TLR2 leads to intracellular killing M. tubercu-

losis macrophages [6]. To determine the possible combinations of different genotypes of all genes, which are determined by an analysis of haplotypes. For carrying out statistical processing of the data 46 DNA samples selected from the above control group TLR-receptors. Revealed that most often occurring haplotype GGAAAA as in the control group, and patients BA (Table 4). In our study revealed that one person with the GG genotype SS16 gene (haplotype - GAAAGG) and 1 man with the AA genotype (haplotype GAAAAA) SS16 gene variant were heterozygous (GA) TLR2 gene and had a history of manifestations of active TB. In the analysis of haplotypes and gene TLR4 CC16 found that 3 people from the heterozygous genotype SS16 gene (haplotype GGAGAG) and 1 person from homozygotes (haplotype GGAGGG) were heterozygous gene variant Tlr4, all these patients had frequent manifestation of SARS that were protracted and require the use of antimicrobials. In the analysis of immunological parameters of carrier haplotypes revealed that the level of a statistical trend (r ≤ 0,06) different levels of CD4<sup>+</sup> / 25<sup>+</sup> / Foxp3<sup>+</sup> carriers haplotypes with mutant allele. Study of polymorphic gene haplotypes CC16, TLR2 and TLR4 is an important aspect in understanding the clinical manifestations of the BA.

Table 4  
Gaplotypes of genes TLR2, TLR4, CC16

CC 16 TLR 4 TLR 2	GG AA AA	GA AA AA	AA AA AA	GG AA AG	GA AA AG	AA AA AG	GG AA GG	GA AA GG	AA AA GG	GG AG AA	GA AG AA	AA AG AA	GG AG AG	GA AG AG	AA AG AG	GG GG AA	GA GG AA	AA GG AA	GG GG AG	GA GG GA	AA GG AG	GG GG AA	GA GG GG	AA GG GG
Control group (n= 46)	63,0 (29)	4,3 (2)	0	23,9 (11)	0	0	0	0	0	4,3 (2)	0	0	4,3 (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Patients with asthma (n=45)	51,1 (23)	6,7(3)	0	20,0 (9)	2,2 (1)	0	2,2 (1)	2,2 (1)	0	6,7 (3)	0	0	6,7 (3)	0	0	2,2 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0

**Conclusions:**

Patients with BA significantly more common had genotype GA (11,1%) gene TLR2 (p = 0.04) compared with the control group. In patients who are carriers of a mutant allele of a gene TLR2 A history pneumonia frequently observed (p = 0.046) and there were signs of candidiasis (p = 0.034) compared with patients with no polymorphism.

In the study of polymorphism of TLR 4 found that genotype AG statistically more likely (p = 0.04) is found in the BA group (15.6%) than in the control group. Patients with polymorphism 896A / G TLR4 gene disease begins in childhood (p = 0.03) in the spectrum of sensitization were dietary factors (p = 0.02) and there were other manifestations of allergic diseases (p = 0.045).

Polymorphic variant gene 38G CC16 significantly more common in patients with BA than in the control population (p = 0.019). Clinical manifestations in patients

with AAA who are carriers of the gene allele 38G CC16 are fungal sensitization, atopic dermatitis and history of tuberculosis, the need for frequent doses of glucocorticoids.

Thus, the study of polymorphisms 896A / G TLR4 gene and 2258G / A gene TLR2, A38G CC16 gene is important in the diagnosis and treatment and prevention of the BA.

#### literature

1. Anne L. Wright Анализ эпидемиологических исследований: факты и артефакты // Аллергология. — 2003. — № 2.—P.26-28
2. Candelaria P.V. Association between asthma-related phenotypes and the CC16 A38G polymorphism in an unselected population of young adult Danes./ P.V. Candelaria, Backer V, et al // Immunogenetics. -- 2005.-- №57 -- P.25-32.
3. Claire de Burbure. Uteroglobin-Related Protein 1 and Clara Cell Protein in Induced Sputum of Patients With Asthma and Rhinitis/ Claire de Burbure, Patrizia Pignatti, Massimo Corradi // Chest.—2007.-- №131.—P.172-179.
4. Galli E., Ciucci A., Cersosimo S. Et al. Eczema and food allergy in an Italian pediatric cohort: no association with TLR-2 and TLR-4 polymorphisms. J. Immunopathol. 2010-№2- P. 671- 675.
5. Guyatt GH, Oxman AD, Kunz R. Going from evidence to recommendation.// BMJ- 2008.- P. 336
6. Long Xiao-Bo. Clara Cell 10-kDa Protein Gene Transfection Inhibits NF-κB Activity in Airway Epithelial Cells./ Xiao-Bo Long// April 2012.-- Volume 7.-- режим доступа: www.plosone.org
7. Michael S. D. Kormann, PhD. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. J. Allergy and clinical immunology. 2008; Vol.122: 86-92.
8. Postma D., Koppelman G. Genetics of asthma: where are we and where do we go? The Proceedings of the American Thoracic Society. 2009; V. 6: 283-287.
9. Thoma-Uszynski S. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-like receptor/ S. Thoma-Uszynski // Science.- 2001. – Vol 291. – P. 1544 – 1547.
10. Yang I.A. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics/ IA Yang<sup>1</sup>, SJ Barton<sup>1</sup>, S Rorke<sup>1</sup> and other// Genes and Immunity.-2004.- V5.-P. 41–45
11. Yoshika M., Fukuishi N., Iriguchi S., et al. Lipoteichoic acid downregulates FcεRI expression on human mast cells through Toll-like receptor 2. J. Allergy. Clin. Immunol. 2007.- V. 120.-P. 452-461.
12. Izmaylova O.V., Shlikova O.A., Bobrova N.O. та in. Rol' polimorfizmu Toll-podibnogo receptora 4 Asp299Gly u rozvitku bakterial'nich infekziy, schope-redayut'sya statevim shlyachom / Problemi ekol. ta med. – 2009. – T.13, № 5-6. – S. 3-6.
13. Kryuchko T.O., Kaydashev I.P., Vovk Yu.O. i dr. Genetichniy polimorfizm Toll-podibnogo receptora 4 u ditey z atopichnoyu bronchial'noyu astmoyu / Klin. imunol. Alergol. Infektol. – 2011. – № 5. – S. 52-54.
14. Kuzenko N.L. Assoziatsiya polimorfizma Toll-podobnogo receptora 4 Asp299Gly s povyshennym uro-vnem produkzii allergenspezificheskikh immunoglo-bulinov E u pazientov s allergicheskimi zabolevani-yami./ N.L. Kuzenko., O.V. Izmaylova., L.E. Vesnina [ta in.] // Immunologiya. –2011.-- №6 -- S. 310-313.
15. Levchenko L. Yu. Polimorfizm 896 A/G genu TLR4, a ne genu 1196 S/T genu TLR4 ta 2258 G/A genu TLR2, viznachae tyazhkiy perebig atopichnogo dermatitu u ditey. / L. Yu. Levchenko, O.V. Izmaylova, O. A. Shlikova [ta in.]// Zitologiya i genetika. – 2013-- №1.—С. 41-45.
16. Ochotnikova E.N. Allergicheskii «marsh»: svyaz' pokoleniy i eskalaziya allergii u detey (lekziya) // Sovre-men. pediatriya. - 2008. - №4(21). - S.190-197.
17. Cherkashina I.I., Nikulina S.Yu. Kliniko-geneticheskie osobennosti bol'nykh bronchial'noy astmoy i ich rodstvennikov // Problemy tuberkuleza i bolezney leg-kich. - 2008. – №9. – S. 47-50.
18. Chuchalin A.G. Bronchial'naya astma i astma podobnye sostoyaniya // Pul'monologiya. – 2007. – №11. – S. 1-9.

*Матеріал надійшов до редакції 3.12.2013.*