

УДК [577.21:616.5-002]-053.3/.5

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

Науково-дослідний інститут генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики

Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Вміст медіаторів алергічного запалення в сироватці крові у хворих на atopічну бронхіальну астму залежно від поліморфізму 2258G/A гена TLR-2

Ключові слова: поліморфізм Toll-подібних рецепторів, T-регуляторні клітини, atopічна бронхіальна астма.

Атопічна бронхіальна астма (АБА) є мультифакторним захворюванням, що характеризується дисбалансом регуляторної функції Т-хелперів (Th), в тому числі Т-регуляторних клітин (T-reg). Висловлено припущення, що ці лімфоцити виконують супресивну роль в алергічному запаленні та маніфестації АБА [12]. Ці дослідження дають можливість розглядати Т-reg клітини як одну з мішеней для фармакологічного впливу на розвиток цього складного захворювання. Виявлено, що Т-reg клітини контролюють реакції не тільки адаптивного, але і вродженого імунітету, в тому числі Toll-подібних рецепторів (TLR) [18]. Доведена важлива роль цих патерн-розпізнавальних рецепторів у патогенезі ряду захворювань: atopічної бронхіальної астми (БА) у дітей [5], бронхіоліту [19], уrogenітальних інфекцій [4], запальних хвороб пародонту [6], герпесвірусної інфекції [3], цукрового діабету [9], ревматоїдного артрити [1], атеросклерозу [2], хронічного саркоїдозу [14].

Вплив активації TLR на Т-reg клітини є неоднозначним, наприклад, TLR-4 та TLR-5 підвищують їх супресорний потенціал [12], в той час як активація TLR-8 призводить до пригнічення функції Т-reg клітин. TLR-2 сприяє збільшенню кількості Т-reg [15] клітин, але разом з тим – втраті супресорної активності *in vivo* та *in vitro* [18].

Генетичні зміни – одонуклеотидні поліморфізми (ОНП) – у вказаних патерн-розпізнавальних молекулах широко вивчаються, але єдиної точки зору щодо їх впливу на активність Т-reg клітин при АБА у дорослих немає [16].

Метою нашого дослідження було з'ясувати механізми імунорегуляції у хворих на АБА залежно від поліморфізму 2258G/A гена TLR-2 (rs5743708).

Матеріали та методи дослідження

Було обстежено 45 осіб, хворих на АБА. Діагноз АБА та ступінь її тяжкості встановлено відповідно до затвер-

джених критеріїв (наказ МОЗ України №767 та міжнародні рекомендації GINA, 2011) на базі алергологічного і пульмонологічного відділень Полтавської обласної клінічної лікарні ім. Скліфосовського. Анамнестичні дані зібрано шляхом анкетування з використанням спеціального опитувальника. Усім пацієнтам з АБА було проведено загальноклінічні лабораторні, інструментальні та алергологічне обстеження. Обстеження проводили за умови відсутності у пацієнта загострення основного чи супутніх хронічних захворювань, відсутності гострих інтеркурентних інфекційних захворювань та тяжкої супутньої патології, яка б могла вплинути на результати дослідження. В якості контролю були відібрані зразки ДНК 90 практично здорових осіб без алергологічного анамнезу з бази НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія». Дослідження проводили відповідно до наданої письмової згоди на проведення обстеження та ухвали комісії з етичних питань та біоетики цієї установи. Виділення геномної ДНК здійснювали методом фенол-хлороформної екстракції. Визначення поліморфізму 2258G/A гена TLR-2 проведено методом полімеразної ланцюгової реакції [19]. Фенотип лімфоцитів аналізували шляхом визначення рівнів експресії поверхневих антигенів клітин з використанням моноклональних антитіл CD4, CD25 (виробництво «Сорбент», Росія) та внутрішньоклітинного білка FoxP3 («eBioscience», США) методом проточної цитофлюориметрії на проточному цитофлюорометрі 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).

Результати та їх обговорення

Серед обстежених у 5 (11,1 %) пацієнтів АБА мала інтермітуючий характер, у 23 (51,2 %) осіб була легка ступінь, у 17 (37,7 %) – середня ступінь тяжкості перебігу захворювання. При дослідженні показників периферичної крові у 45 обстежених виявлено, що рівень лейкоцитів в середньому становив $6 \pm 0,45 \times 10^9/\text{л}$, еозинофілів – $0,06 \pm 0,008 \times 10^9/\text{л}$, кількість лімфоцитів – $1,56 \times 10^9/\text{л} \pm 0,13$, тобто дані не виходили за межі показників практично здорових осіб. При дослідженні Th клітин відмічено, що в середньому рівень CD4^+ становив $0,68 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$, рівень $\text{CD4}^+/\text{CD25}^+$ – $0,17 \pm 0,02 \times 10^9/\text{л}$, що не виходить за межі показників практично здорових людей. Рівень експресії молекул $\text{CD4}^+/\text{CD25}^+/\text{Foxp3}$ – $0,07 \pm 0,01 \times 10^9/\text{л}$.

При аналізі сироваткових медіаторів з'ясовано, що в середньому у всіх обстежених концентрація IgE становила $164,9 \pm 13,9$ МОд/мл (від 27,9 до 440,4 МОд/мл), IL-4 – $59,5 \pm 8,2$ пг/мл (від 59,3 до 313,8), що вище показників практично здорових осіб. Це підтверджує загальноприйняті факти про IL-4-залежну активацію В-лімфоцитарної ланки імунітету [7]. Отримані нами дані підтверджують визначення АБА як захворювання з хронічним персистуючим перебігом, навіть у період ремісії [10]. Рівень IL-10 у хворих на АБА становив $0,45 \pm 0,02$ пг/мл. У групах хворих з різним ступенем тяжкості достовірних відмінностей не знайдено.

У 90 осіб, що входили до групи контролю, частота «дикого типу» генотипу TLR-2 (GG) становила 97,8 %; частота гетерозиготного генотипу (GA) – 2,2 %, генотип AA не було виявлено. У хворих на АБА відповідні результати були такими: GG – 88,9 %, GA – 11,11 % та AA – не виявлено. При статистичному опрацюванні відмічається достовірно значима різниця ($p = 0,04$) між частотами генотипів (GA) у групі контролю та у хворих

на АБА. Частота мутантного алеля A у групі контролю становила 1,1 %, а серед хворих на АБА – 5,6 %, що достовірно не відрізнялося ($\chi^2 = 3,1$; $p = 0,078$) (табл. 1).

Таблиця 1
Розподіл частот генотипів та алелей 2258G/A гена TLR-2 у групах хворих на АБА та популяційного контролю

Генотип, алель	Популяційний контроль (n = 90)	Хворі на АБА (n = 45)
GG	97,8 (88)	88,9 (40)
GA	2,2 (2)	11,1 (5)*
AA	0	0
G	98,9 (178)	94,4 (85)
A	1,1 (2)	5,6 (5)

Примітка: * – $p \leq 0,05$ порівняно з групою осіб популяційного контролю.

Розподіл мутантних алелей у групах хворих з різним ступенем тяжкості відбувся таким чином: у групі з легким перебігом – у 4 осіб, з інтермітуючим перебігом – у 1 особи, що не є статистично достовірним. В групі з середньою тяжкістю ОНП TLR-2 не виявлено, можливо, це підтверджує дані про відсутність кореляцій між тяжкістю перебігу АБА та вказаним генетичним варіантом [13]. При порівнянні рівнів імунологічних показників у хворих на АБА (див. табл. 1) носіїв «дикого алеля» гена TLR-2 та мутантного алеля статистично достовірна відмінність спостерігається лише в концентрації цитокінів (табл. 2). Так, вищий рівень IL-4 ($63,7 \pm 8,7$) пг/л спостерігався у групі без проявів поліморфізму (критерій Манна–Уїтні U ($n_1 = 40$; $n_2 = 5$) 2,79; $p = 0,005$), а рівень IL-10 був достовірно підвищений у носіїв гетерозиготного варіанту геному TLR-2 (критерій Манна–Уїтні U ($n_1 = 40$; $n_2 = 5$) 33,0; $p = 0,01$). Відмічено, що у осіб з ОНП концентрація IgE була нижчою за показники

Таблиця 2
Імунологічні показники у хворих на АБА залежно від генотипу 2258G/A гена TLR-2

Показник	Носії «дикого алеля» (GG), хворі на АБА (n = 40)	Носії мутантного алеля (GA), хворі на АБА (n = 5)
CD4^+ , Г/л	$0,67 \pm 0,07$	$0,82 \pm 0,07$
$\text{CD4}^+/\text{CD25}^+$, Г/л	$0,17 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,03$
$\text{CD4}^+/\text{CD25}^+/\text{Foxp3}^+$, Г/л	$0,07 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$
Лейкоцити, Г/л	$6,69 \pm 0,49$	$8,44 \pm 0,49$
Еозинофіли, Г/л	$0,05 \pm 0,01$	$0,1 \pm 0,04$
Лімфоцити, Г/л	$1,49 \pm 0,13$	$2,09 \pm 0,6$
IgE, МОд/мл	$173,4 \pm 14,6$	$96,7 \pm 34,8$
IL-10, пг/л	$0,42 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,05^*$
IL-4, пг/л	$63,7 \pm 8,7$	$24,1 \pm 6,28^*$

Примітка: * – $p \leq 0,05$ порівняно з групою осіб – носіїв «дикого алеля».

у практично здорових осіб та становила ($96,7 \pm 34,8$) МОд/мл – це цілком логічно з огляду на високий рівень IL-10 та його вплив на Th2. Зменшення концентрації прозапального цитокіну IL-4 у групі хворих зі змінами в генах TLR-2 може означати переключення імунної відповіді з класичної В-залежної на Т-рег-залежну, що підтверджують наведені нижче кореляційні зв'язки.

При проведенні кореляційного аналізу у групі із ОНП TLR-2 (табл. 3) відмічено стійкий взаємозв'язок Т-клітин з іншими імунокомпетентними клітинами та з цитокінами (IL-4, IL-10), а також з IgE, що підтверджує патогенетичні ланки алергічного запалення АБА. У носіїв мутантного алеля А спостерігається утворення нової кореляційної пари ($CD4^+/25^+/Foxp3^+$ та лімфоцити) та збільшення коефіцієнту кореляції між $CD4^+$ та $CD4^+/25^+/Foxp3^+$ (див. табл. 3). Враховуючи, що патогенетично та функціонально значимими є сильні та вірогідні зв'язки, дані кореляційні пари можна розглядати як певний фенотип імунокомпетентних клітин [8]. Ці дані дають підстави припустити, що контрольованість перебігу АБА за умови гетерозиготного генетичного апарату TLR-2, а отже і певного зниження активності вродженого імунітету, можлива завдяки прямій взаємодії Т-регулюючих клітин з іншими видами лімфоцитів, що створює баланс між ефекторними та регуляторними механізмами імунної відповіді. Підвищений рівень індукційних IL-10 Т-рег клітин при АБА дозволяє підтвердити дані про їх важливу роль в діагностиці та в перспективі щодо лікування atopічних станів, особливо у пацієнтів з функціональними генетичними вадами.

Висновки

1. У полтавській популяції хворих на atopічну бронхіальну астму частіше, ніж у здорових осіб, відмічається однонуклеотидний поліморфізм 2258G/A гена TLR-2.

2. Характерною ознакою компенсованого перебігу atopічної бронхіальної астми у хворих, які несуть алель G в гомозиготному вигляді, є широкий спектр позитивних кореляційних взаємозв'язків на фоні підвищеного рівня IL-4.

3. Гетерозиготний варіант гена TLR-2 у пацієнтів з компенсацією atopічної бронхіальної астми сприяє дисбалансу у діяльності імунної системи, що характеризується активацією продукції IL-10, значним зменшенням кількості кореляційних взаємозв'язків імунозалежних структур та прямими лінійними зв'язками між натуральними Т-регуляторними клітинами з Т-хелперами і лімфоцитами.

Література

1. *Поліморфізм гена Toll-like рецептора 4 Asp299Gly у больных ревматоидным артритом* [Текст] / К. В. Белоглазова [та ін.] // Проблеми екол. та мед. – 2009. – Т. 13, № 5–6. – С. 15–17.
2. *Бондаренко, В. М.* Микробный фактор и Toll-подобные рецепторы в патогенезе атеросклероза [Текст] / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед // Журн. микробиол. – 2009. – № 6. – С. 107–112.
3. *Исследование экспрессии генов TLR-9, NF-kB, ФНОα в клетках слизистой цервикального канала беременных с герпес-вирусной инфекцией* [Текст] / О. А. Ганковская [та ін.] // Журн. микробиол. – 2009. – № 2. – С. 61–64.
4. *Роль поліморфізму Toll-подібного рецептора 4 Asp299Gly у розвитку бактеріальних інфекцій, що передаються статевим шляхом* [Текст] / О. В. Ізмайлова [та ін.] // Проблеми екол. та мед. – 2009. – Т. 13, № 5–6. – С. 3–6.
5. *Генетичний поліморфізм Toll-подібного рецептора 4 у дітей з atopічною бронхіальною астмою* [Текст] / Т. О. Крючко [та ін.] // Клін. імунол. алергол. інфектол. – 2011. – № 5. – С. 52–54.
6. *Поліморфізм Asp299Gly гена Toll-подібного рецептора 4 у генезі змін ясен у вагітних* [Текст] / Л. Й. Островська [та ін.] // Укр. стоматол. альманах. – 2009. – № 6 – С. 17–19.
7. *Рябова, Л. В.* Различия каскада цитокинов у больных бронхиальной астмой в зависимости от стадии течения заболевания [Текст] / Л. В. Рябова, А. В. Зурочка // Мед. иммунология – 2007. – Т. 9, № 4–5. – С. 493–498.

Таблиця 3

Рівень кореляційного зв'язку імунологічних показників у хворих на АБА залежно від генотипу 2258G/A гена TLR-2

Кореляційні пари	Носії «дикого алеля» (GG), хворі на АБА (n = 40)	Носії мутантного алеля (GA), хворі на АБА (n = 5)
CD4 та CD4/25	0,53	–
CD4 та CD4/25/Foxp3	0,32	0,97
CD4 та лейкоцити	0,79	–
CD4 та еозинофіли	0,41	–
CD4 та лімфоцити	0,9	–
CD4/25 та лімфоцити	0,57	–
CD4/25/Foxp3 та лімфоцити	–	0,97
CD4/25/Foxp3 та IL-10	0,57	–
Лейкоцити та еозинофіли	0,51	–
Лейкоцити та лімфоцити	0,77	–
Еозинофіли та лімфоцити	0,49	–
IgE та IL-4	0,57	–

Примітка: всі вказані кореляційні пари є статистично вірогідними ($p \leq 0,05$).

8. Саидов, М. З. Информативность корреляционных взаимосвязей между показателями врожденного и адаптивного иммунитета у часто болеющих детей с адено tonsиллярной гипертрофией [Текст] / М. З. Саидов, Х. Ш. Давудов, С. В. Климова // Иммунология. — 2010. — № 6. — С. 325–331.

9. Сульская, Ю. В. Генетический полиморфизм Toll-like рецепторов 4 типа у больных сахарным диабетом 2 типа [Текст] / Ю. В. Сульская // Таврический медико-биол. вестник. — 2009. — Т. 12, № 3 (47). — С. 72–74.

10. Фещенко, Ю. И. Бронхиальная астма — современные возможности диагностики и пути достижения контроля [Текст] / Ю. И. Фещенко, Л. А. Яшина // Здоров'я України. — 2010. — № 2. — С. 18–20.

11. Bousquet J., Khaltaev N. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases. A comprehensive approach. Global Alliance Against Chronic Respiratory Diseases. Wld Health Organization [Электронный ресурс]. — Режим доступа : <http://www.ginasthma.org>.

12. Crellin, N. K. Human CD4+ T cells express TLR-5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells [Text] / N. K. Crellin [et al.] // J. Immunol. — 2005. — Vol. 175. — P. 8051–8059.

13. Eder, W. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers [Text] / W. Eder [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. — 2004. — Vol. 113. — P. 482–488.

14. Pabst, S. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms are associated with a chronic course of sarcoidosis [Text] / S. Pabst [et al.] // J. Clin. Exp. Immunol. — 2004. — Vol. 143, № 3. — P. 420–426.

15. Peng, G. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function [Text] / G. Peng [et al.] // J. Science. — 2005. — Vol. 309. — P. 1380–1384.

16. Suttmüller, R., Garritsen A., Adema G.J. Regulatory T cells and toll-like receptors: regulating the regulators. [Электронный ресурс]. — Режим доступа : http://ard.bmj.com/content/66/suppl_3/iii91.full.html.

17. Ryanna, K. Regulatory T cells in bronchial asthma [Text] / K. Ryanna [et al.] // J. Allergy. — 2009. — Vol. 64. — P. 335–347.

18. Suttmüller, R. P. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells [Text] / R. P. Suttmüller [et al.] // J. Clin. Invest. — 2006. — Vol. 116. — P. 485–494.

19. Tal, G. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease [Text] / G. Tal [et al.] // J. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 189, № 1. — P. 2057–2063.

20. Xystrakis, E. Regulatory T cell therapy as individualized medicine for asthma and allergy [Text] / E. Xystrakis [et al.] // J. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. — 2007. — Vol. 7. — P. 535–541.

СОДЕРЖАНИЕ МЕДИАТОРОВ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМА 2258G/A ГЕНА TLR-2

Н. В. Ляховская, О. А. Шлыкова, Н. А. Боброва,
О. В. Измайлова, И. П. Кайдашев

Резюме

Атопическая бронхиальная астма является мультифакторным заболеванием, которое характеризуется дисбалансом регуляции Т-хелперов (Th). Генетические изменения — однонуклеотидные полиморфизмы — Toll-подобного рецептора 2 широко изучаются, но единой точки зрения относительно их влияния на активность Т-рег клеток при атопической бронхиальной астме у взрослых нет.

Цель исследования: выяснить механизмы иммунного ответа у больных атопической бронхиальной астмой в зависимости от полиморфизма 2258G/A гена TLR-2.

Материалы и методы: обследовано 45 больных атопической бронхиальной астмой, кроме общеклинических исследований проведен анализ фенотипов лимфоцитов путем определения уровней экспрессии поверхностных антигенов клеток с использованием моноклональных антител CD4, CD25 и выявление полиморфизма 2258G/A гена TLR-2 методом полимеразной цепной реакции.

Результаты: авторы выяснили, что в полтавской популяции больных атопической бронхиальной астмой частота генотипов TLR2 составила GG — 88,9 %, GA — 11,1 % и AA — не обнаружен, что чаще,

чем в контроле ($p \leq 0,04$); статистически достоверной разницы по частоте аллелей в указанных группах нет. Характерным признаком компенсированного течения атопической бронхиальной астмы у больных, носителей аллели G в гомозиготном виде, является широкий спектр положительных корреляционных взаимосвязей на фоне повышенного уровня IL-4 ($63,7 \pm 8,7$) пг/л. Гетерозиготный вариант гена TLR-2 у пациентов с компенсацией атопической бронхиальной астмы способствует дисбалансу в деятельности иммунной системы, который характеризуется активацией продукции IL-10, значительным уменьшением количества корреляционных взаимосвязей иммунозависимых структур и прямыми линейными связями между натуральными Т-регуляторными клетками с Т-хелперами и с лимфоцитами.

Выводы: полиморфизм 2258G/A гена TLR-2 играет важную роль в течении атопической бронхиальной астмы.

Ключевые слова: полиморфизм Toll-подобных рецепторов, Т-регуляторные клетки, атопическая бронхиальная астма.

Научно-практический журнал «Астма и аллергия», 2013, №3.

Н. В. Ляховская

Научно-исследовательский институт генетических и иммунологических основ развития патологии и фармакогенетики Высшего государственного учебного заведения Украины «УМСА», аспирант 36024, Украина, г. Полтава, ул. Шевченко, 23
тел./факс: 38053 227 0539
e-mail: congres2007@yandex.ru

THE CONTENT OF MEDIATORS OF ALLERGIC INFLAMMATION IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH ATOPIC ASTHMA, DEPENDING ON THE POLYMORPHISM 2258G/A GENE TLR-2

N. V. Lyakhovskaya, O. A. Shlykova, N. A. Bobrova,
O. V. Izmailova, I. P. Kaidashev

Summary

Atopic asthma is a multifactorial disease that characterized by an imbalance of the regulation of T-helper (Th) and the cytokines IL-4, IL-5 and IL-13, which are crucial for the induction of allergic asthma symptoms. Genetic variations — single nucleotide polymorphisms — of Toll like receptor 2 have been widely studied, but the common point of view with regard to their effect on the activity of T-reg cells in atopic asthma in adults do not.

Aim: to clarify the mechanisms of the immune response in patients with atopic asthma, depending on the polymorphism 2258G / A gene TLR-2.

Materials and methods: the study involved 45 patients with atopic asthma, other than general clinical research they analyzed the phenotype of lymphocytes by determining the levels of expression of cell surface antigens using monoclonal antibodies CD4, CD25 and identification of polymorphism 2258G / A TLR-2 gene using PLR.

Results: the frequency of genotypes of TLR-2 was GG — 88,9 %, GA — 11,1 % and the AA — is not found in cohort of patients with atopic asthma that more often than in the control group ($p \leq 0,04$). A characteristic feature of the compensated flow atopic asthma patients, carriers G allele in homozygous form is a wide range of positive correlation relationship against high levels of IL-4 ($63,7 \pm 8,7$) pg/l. The heterozygous variant of TLR-2 gene in patients with atopic asthma compensation contributes to an imbalance in the immune system, which is characterized by the activation of IL-10, a significant decrease in the number of mutual correlations of immune structures and direct linear relationship between the natural regulatory T-cells, T-helper cells and lymphocytes.

Conclusion: polymorphism 2258G / A TLR-2 gene plays an important role in the course of asthma.

Key words: polymorphism of Toll-like receptors, T-regulatory cells, atopic asthma.

Theoretical and practical J. «Asthma and Allergy», 2013, 3

N. V. Lyakhovskaya

Postgraduate of Research Institute of the genetic and immunological basis for the development of pathology and pharmacogenetics of the State Supreme scholar institutions of Ukraine «UMCA» 36024, Ukraine, Poltava, Shevchenko str., 23
tel./fax: 38053 227 0539
e-mail: congres2007@yandex.ru