

ПОЛИМОРФНЫЕ МАРКЕРЫ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ВЗРОСЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Шушанова Л.В.¹, Барычева Л.Ю.¹, Минасян М.М.¹, Душина Л.В.²

¹ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ставрополь, e-mail: schuschanova.lili@yandex.ru;

²АНМО «Ставропольский краевой клинический консультативно-диагностический центр», Ставрополь, e-mail: dushina.stv@gmail.com

Большое практическое значение в современной медицине представляет определение биологических предикторов заболевания, которые могут использоваться для оценки риска его развития и реализации клинко-патогенетических фенотипов. Установлено, что TLR участвуют в распознавании аллергенов в дыхательных путях, регулируют активность и поляризацию адаптивного Th1, Th2, Th17 – иммунного ответа, играя важную патогенетическую роль в развитии бронхиальной астмы (БА). Цель исследования: определение клинко-патогенетического значения полиморфных маркеров рецепторов врожденного иммунитета в развитии бронхиальной астмы. В исследование включены 100 взрослых больных с бронхиальной астмой, в том числе 65 – с аллергической бронхиальной астмой, 35 – с неаллергической бронхиальной астмой. Установлено, что полиморфизмы генов рецепторов врожденного иммунитета TLR2 G2258A (rs5743708), TLR6 C745T (rs5743810) ассоциированы с развитием бронхиальной астмы у пациентов русской национальности Юга России. Не установлено ассоциации полиморфных маркеров CD14 C (-159)T (rs2569190) с развитием бронхиальной астмы. Показано, что молекулярно-генетическими маркерами повышенного риска развития бронхиальной астмы являются аллели TLR2 2258A, TLR6 745C. Протективными свойствами обладают генотипические варианты TLR2 G2258G и TLR6 C745C и аллель TLR2 2258G.

Ключевые слова: бронхиальная астма, полиморфные маркеры генов, рецепторы врожденного иммунитета.

POLYMORPHIC MARKERS OF THE GENES OF RECEPTORS OF THE CONGENITAL IMMUNITY IN ADULT PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

Shushanova L.V.¹, Barycheva L.Yu.¹, Minasyan M.M.¹, Dushina L.V.²

¹FGBO VO «Stavropol state medical university» Health Ministry of Russian Federation, Stavropol, e-mail: schuschanova.lili@yandex.ru;

²ANMO «Stavropol Regional Clinical Diagnostic Center», Stavropol, e-mail: dushina.stv@gmail.com

The definition of biological predictors of the disease that can be used to assess the risk of its development and realization of clinical and pathogenic phenotypes is of great practical importance in modern medicine. The aim of the study was to determine the clinical and pathogenetic significance of polymorphic markers of congenital immunity receptors in the development of bronchial asthma. The study included 100 adult patients with bronchial asthma, including 65 - allergic bronchial asthma, 35 - with non-allergic bronchial asthma. It was found that polymorphisms of congenital immunity receptor genes TLR2 G2258A (rs5743708), TLR6 C745T (rs5743810) were associated with the development of bronchial asthma in patients Russian nationality in the South of Russia. The association of polymorphic markers of CD 14 C (-159)T (rs2569190) with the development of bronchial asthma was not established. It is shown that molecular genetic markers of increased risk of development bronchial asthma are the alleles of TLR2 2258A, TLR6 745C. Genotypic variants of TLR2 and TLR6 G2258G C745C and allele of TLR2 2258G have protective properties.

Keywords: bronchial asthma, polymorphic markers of the genes, receptors of the congenital immunity's.

Бронхиальная астма (БА) – гетерогенное заболевание с большим количеством клинко-патогенетических вариантов, которое развивается при сложном взаимодействии множества генов, факторов внешней среды (триггеров) и ген-средовых взаимодействий [1, 2].

Определяющим условием для успешного лечения бронхиальной астмы становится концепция, объединяющая генетику с патогенезом заболевания, поэтому молекулярно-

генетические исследования при БА представляют особый интерес.

Перспективными для изучения при бронхиальной астме являются рецепторы врожденного иммунитета (TLR), реализующие свое действие на начальных этапах иммунного ответа и во многом определяющие интенсивность иммунных реакций на микробные и немикробные аллергены [2].

Установлено, что TLR участвуют в распознавании аллергенов в дыхательных путях, регулируют активность и поляризацию адаптивного Th1, Th2, Th17 – иммунного ответа, играя важную патогенетическую роль в развитии БА [1].

Цель исследования: определение клиничко-патогенетического значения полиморфных маркеров рецепторов врожденного иммунитета (TLR) в развитии бронхиальной астмы.

Материал и методы исследования

Иммуногенетические исследования выполнены у 100 человек с бронхиальной астмой русской национальности Юга России, находившихся под наблюдением в ГБУЗ «Городская поликлиника № 1» г. Ставрополя в 2016–2017 гг.

У 65 человек диагностирована аллергическая БА, у 35 – неаллергическая БА. Включенные в исследование больные находились в возрасте от 20 до 75 лет, с медианой возраста в группе АБА – 34 [23,5; 45] года, в группе НБА – 61 [47; 66] год, $p < 0,001$.

В контрольную группу вошли 50 практически здоровых людей русской национальности Южного региона России в возрасте от 18 до 60 лет.

Типирование SNPs TLR2, TLR6, CD14 проводили методом ПДРФ (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP analysis) с предварительной амплификацией интересующего участка и последующим выполнением эндонуклеазой рестрикции. Амплификацию осуществляли с применением многоканального амплификатора «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия) с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Для выявления полиморфизмов TLR2, TLR6, CD14 методом полимеразной цепной реакции в геноме человека в работе использовали диагностические тест-системы «SNP-экспресс» ООО НПФ «Литех», г. Москва.

Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 3%-ном агарозном геле, приготовленном на TEA буфере, с использованием электрофоретической детекции результатов ПЦР («BioRad Laboratories», США).

Для идентификации результатов электрофореза применяли 1%-ный раствор бромистого этидия, фрагменты ДНК визуализировались в виде светящихся оранжево-красных полос (УФ излучение длиной волны 310 нм).

Для статистического анализа данных применяли пакет программ «Statistica SPSS»,

«Attestat 10.5.1.», «Калькулятор для расчета статистики». Для определения соответствия распределения генотипов в популяции закону Харди–Вайнберга использовали программное обеспечение Hardy-Weinberg equilibrium calculator. Достоверность различий в частотах аллельных вариантов и генотипов определяли посредством критерия χ^2 Пирсона, при множественных сравнениях – с помощью критерия χ^2 с поправкой Йетса. Для оценки значимости признака вычисляли отношение шансов с определением 95%-ного доверительного интервала.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученное в исследовании распределение частот генотипов *TLR6 C745T* ($\chi^2=1,02$, $p>0,05$) и *CD14 C(-159)T* ($\chi^2=1,02$, $p>0,05$) соответствовало равновесному распределению Харди–Вайнберга. Для полиморфизма *G2258A* ($\chi^2=21,5$, $p<0,001$) установлено отклонение от равновесия Харди–Вайнберга, что было обусловлено различиями между наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью.

При определении полиморфного варианта rs5743708 *TLR2 (2258 G>A)* установлено, что у пациентов с БА (84,5%), как и в общей популяции (97%), преобладает мажорный аллель 2258G. Однако он встречается реже, чем в контрольной группе (84,5% и 97%, $p<0,05$), в отличие от минорного аллеля 2258A (15,5% и 3%, $p<0,05$), относительный риск развития заболевания у резидентов которого составил 4,4 (95% CI: 1,51–12,8) (табл. 1).

Распространенность генотипа *G2258G* преобладала в группе условно здоровых людей (97% и 84,5%, $p<0,01$). Следует отметить, что наличие генотипа *G2258G* уменьшало риск развития БА (OR=0,24; CI: 0,07–0,85).

Частота гомозиготного генотипа *A2258A* в 5 раз чаще встречалась при бронхиальной астме, чем в группе здоровых респондентов, однако достоверных отличий получено не было.

В доминантной модели показано увеличение риска развития БА (как для гомозигот, так и для гетерозигот) по предрасполагающему аллелю *A*, OR=4,17 (95% ДИ: 1,18–14,7) (табл. 2).

Таблица 1

Распределение частот аллелей и генотипов *TLR2* у больных бронхиальной астмой

Ген	Аллели /генотип	Бронхиальная астма (n=100)	Контрольная группа (n=50)	χ^2	OR (95% CI)
2258 G/A TLR2 -753	G	169/200 (84,5%)	96/100 (97%)	$p=0,004$	0,23 (0,08-0,66)
	A	31/200 (15,5%)	4/100 (3%)	$p=0,004$	4,4 (1,51-12,85)
	GG	79/100 (79%)	47/50 (94%)	$p=0,02$	0,24 (0,07-0,85)
	GA	11/100 (11%)	2/50 (4%)	$p=0,15$	2,97 (0,60-13,9)
	AA	10/100 (10%)	1/50 (2%)	$p=0,08$	5,4 (0,68-43,79)

p – достоверность различий по сравнению с контрольной группой (критерий χ^2 Пирсона)

OR – отношение шансов, CI – 95%-ный доверительный интервал

Доминантная и рецессивная модели распределения генотипов TLR2
у больных бронхиальной астмой

Модель	Генотипы	БА (n=100)	Контрольная группа	χ^2	OR (95% CI)
rs5743708 TLR2 2258 G/A Доминантная	GG	79/100 (79%)	47/50 (94%)	p<0,001	4,17 (1,18–14,7)
	GA+AA	21/100 (21%)	3/50 (6%)		
rs5743708 TLR2 2258 G/A Рецессивная	GA+GG	90/100 (90%)	49/50 (98%)	p=0,150	5,44 (0,68–43,8)
	AA	10/100 (10%)	1/50 (2%)		

p – достоверность различий по сравнению с контрольной группой (критерий χ^2 Пирсона)
OR – отношение шансов, *CI* – 95%-ный доверительный интервал

Таким образом, можно предполагать, что носительство редкого аллеля 2258A повышает риск развития заболевания и обладает предиктивными свойствами в отношении развития бронхиальной астмы, в то время как наличие основного аллеля 2258G и гомозиготного генотипа G2258G уменьшает риск развития БА.

Ранее сообщалось, что иммунный ответ, индуцированный при взаимодействии с TLR2, играет важную роль в развитии Th2-ассоциированных заболеваний и может участвовать в развитии экспериментальной бронхиальной астмы [1-3].

Установлено, что активация TLR2 его синтетическими лигандами APC Pam3Cys способствует увеличению синтеза Th2-ассоциированных молекул IL13 и IL1 β , GM-CSF и уменьшению продукции цитокинов, опосредованных Th1 (IL12, IFN α , IL18, IL27) [3].

Существует мнение, что TLR2, присутствующий на поверхности альвеолярных макрофагов, участвует в распознавании аллергенов клещей домашней пыли [2] с формированием Th2 ответа и развитием аллергического воспаления.

Полученные нами результаты согласуются с данными Hussein Y.M, et al., 2012 г., Tizaoui K. et al., 2015 г., свидетельствующими об увеличении числа пациентов с генотипом TLR2_2258GA и TLR2_2258AA в группах детей и взрослых с бронхиальной астмой [4].

При изучении полиморфных маркеров гена TL6 C745T (rs5743810) у пациентов с бронхиальной астмой чаще, чем в контрольной группе, выявлялся распространенный аллель 745C (46% и 30%, p<0,05), реже – минорный 745T (54% и 70%). Относительный риск развития заболевания у резидентов мажорного аллеля составил 1,99 (95% CI:1, 19–3,31) (табл. 3).

При анализе генотипов отмечалось достоверное уменьшение по сравнению со здоровыми индивидуумами гомозиготного генотипа по минорному аллелю T745T (27% и 52%, p<0,05) с уменьшением вероятности развития БА у его обладателей в кодоминантной

модели (OR=0,34; 95% CI: 0,17–0,69) (табл. 4).

Низкий риск развития БА у гомозигот, обладающих редким аллелем 745T, подтвержден в рецессивной модели (табл. 4).

Таблица 3

Распределение частот аллелей и генотипов TLR6 у больных бронхиальной астмой

Ген	Аллели /генотип	БА (n=100)	Контрольная группа (n=50)	χ^2	OR (95% CI)
TLR6	C	92/200 (46%)	30/100 (30%)	p=0,049	1,99 (1,19–3,31)
	T	108/200 (54%)	70/100 (70%)	p=0,008	0,50 (0,30–0,84)
C745T	CC	20/100 (20%)	6/50 (12%)	p=0,205	1,83 (0,69–4,90)
	CT	53/100 (53%)	18/50 (36%)	p=0,053	2,01 (0,98–4,03)
	TT	27/100 (27%)	26/50 (52%)	p=0,003	0,34 (0,17–0,69)

p – достоверность различий по сравнению с контрольной группой (критерий χ^2 Пирсона)

OR – отношение шансов, CI – 95%-ный доверительный интервал

Таблица 4

Доминантная и рецессивная модели распределения генотипов TLR6 у больных бронхиальной астмой

Модель	Генотипы	БА (n=100)	Контрольная группа	χ^2	OR (95% CI)
rs5743810 TLR6 745 C/T Доминантная	CC	20/100 (20%)	6/50 (12%)	p=0,43	0,55 (0,20–1,46)
	CT+TT	80/100 (80%)	44/50 (88%)		
rs5743810 TLR6 745 C/T Рецессивная	CT+CC	73/100 (73%)	24/50 (48%)	p<0,005	0,34 (0,17–0,69)
	TT	27/100 (27%)	26/50 (52%)		

p – достоверность различий по сравнению с контрольной группой (критерий χ^2 Пирсона)

OR-отношение шансов, CI - 95% доверительный интервал

Таким образом, можно предполагать, что носительство полиморфного маркера *TLR6 745C* является генетическим фактором риска развития бронхиальной астмы, в то время как наличие гомозиготного генотипа по минорному аллелю 745T уменьшает риск развития БА и обладает протективными свойствами.

Клинические исследования, проведенные в последнее десятилетие, показали, что одиночные нуклеотидные полиморфизмы *TLR6* играют определенную роль в защите от астмы [5].

Кроме того, было установлено, что лимфоидные клетки у носителей защитного варианта *TLR6* демонстрируют повышенную экспрессию цитокинов Th1 и снижение Th2-ассоциированной продукции IL4 после специфической стимуляции [6].

В настоящем исследовании установлено, что аллель *TLR6 – 745C* обладает предиктивными свойствами и способствует развитию БА, что может быть связано с низкой продукцией IF γ и высокой IL10 респондентами 745C.

Клеточный механизм, объясняющий ассоциацию полиморфизма *TLR6* с уменьшенной продукцией $IF\gamma$ Th1, не известен.

Существует предположение, что доминирующий вариант аллеля *745C TLR6* обуславливает снижение числа функциональных карманов в LRR участке рецептора и нарушает его взаимодействие с лигандами, а также активацию фактора транскрипции NF- κ B, в то время как редкий аллель *745T TLR6* увеличивает их число и ассоциируется с высокой продукцией провоспалительных цитокинов [6].

Высокий уровень IL12 поддерживает поляризацию Th1, что обуславливает недостаточную функцию Th2.

Анализ полиморфного варианта *CD14 rs2569190 C(-159)T* не выявил статистически значимых различий распространенности мажорного (59,5% и 55%) и минорного (40,5% и 45%) аллелей у пациентов с бронхиальной астмой по сравнению с контрольной группой.

Не было установлено различий показателей встречаемости гетерозиготного *C(-159)T* и гомозиготных *C(-159)C*, *T(-159)T* генотипов по сравнению со здоровыми респондентами. Риск развития заболевания для гомозигот и гетерозигот или только для гомозигот не увеличивался в доминантной и рецессивной моделях (табл. 5).

В серии исследований, проведенных ранее, не подтверждено, что полиморфные варианты *C159T* связаны с развитием бронхиальной астмы [7-9], в других – показано, что ген *CD14* можно рассматривать в качестве гена-кандидата, увеличивающего восприимчивость к atopической бронхиальной астме [10, 11].

Таблица 5

Распределение частот аллелей и генотипов *CD14* у больных бронхиальной астмой

Ген	Аллели /генотип	БА (n=100)	Контрольная группа (n=50)	χ^2	OR (95% CI)
CD 14 C(-159)T	C	119/200 (59,5%)	55/100 (55%)	p=0,46	1,20 (0,74–1,95)
	T	81/200 (40,5%)	45/100 (45%)	p=0,46	0,83 (0,51–1,35)
	CC	37/100 (37%)	14/50 (28%)	p=0,36	1,51 (0,77–3,16)
	CT	43/100 (43%)	27/50 (54%)	p=0,27	1,76 (0,97–3,21)
	TT	20/100 (20%)	9/50 (18%)	p=0,94	1,14 (0,48–2,72)

p – достоверность различий по сравнению с контрольной группой (критерий χ^2 Пирсона)
OR – отношение шансов, CI – 95%-ный доверительный интервал

Таблица 6

Доминантная и рецессивная модели распределения генотипов *CD14* у больных бронхиальной астмой

Модель	Генотипы	БА (n=100)	Контрольная группа	χ^2	OR (95% CI)
rs2569190 CD14	CC	37/100 (37%)	14/50 (28%)	p=0,36	0,66 (0,32–1,39)

C(-159)T Доминантная	СТ+ТТ	63/100 (63%)	36/50 (72%)		
rs2569190 CD14 C(-159)T	СТ+СС	80/100 (80%)	41/50 (82%)	P=0,94	1,14 (0,48–2,72)
Рецессивная	ТТ	20/100 (20%)	9/50 (18%)		

p – достоверность различий по сравнению с контрольной группой (критерий χ^2 Пирсона)
OR – отношение шансов, *CI* – 95%-ный доверительный интервал

Установлено, что присутствие аллеля С в качестве полиморфного маркера *CD14* ассоциировано с увеличением уровня общего IgE [11]. Вероятно, требуются дополнительные исследования по изучению генного полиморфизма *CD14* в зависимости от фенотипа БА.

Выводы

1. Полиморфизмы генов врожденного иммунитета *TLR2 G2258A* (rs5743708), *TLR6 C745T* (rs5743810) ассоциированы с развитием бронхиальной астмы у русских пациентов Юга России. Не установлено ассоциации полиморфных маркеров гена *CD14 C(-159)T* с развитием бронхиальной астмы.

2. Молекулярно-генетическими маркерами повышенного риска развития бронхиальной астмы являются аллели *TLR2 2258A*, *TLR6 745C*. Протективными свойствами обладают генотипические варианты *TLR2 G2258G* и *TLR6 C745C* и аллель *TLR2 2258G*.

Список литературы

1. Гималова Г.Ф., Карунас А.С., Кондрахова А.И., Гизатуллина Э.Н., Сальманова И.А., Кувайцев А.С., Хуснутдинова Э.К. Ген-генные взаимодействия в развитии аллергических заболеваний // Биотехнология от науки к практике. 2014. Т.2. С. 19-24.
2. Свитич О.А., Агеева И.В., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Терапевтический потенциал лигандов TOLL-подобных рецепторов в иммунотерапии бронхиальной астмы // Аллергология и иммунология. 2017. Т.18. №2. С.80-90.
3. Redecke V., Hacker H., Datta S.K., Fermin A., Pitha P.M., Broide D.H., Raz E. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J. Immunol.* 2004. Vol. 172. №5. P. 2739-2743.
4. Hussein Y.M., Awad H.A., Shalaby S.M., Ali A.S., Alzahrani S.S. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms and susceptibility to asthma and allergic rhinitis: a case-control analysis. *Cell. Immunol.* 2012. Vol. 274. №1-2. 34-822402138. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22402138>.
5. Puthothu B., Heinzmann A. Is toll-like receptor 6 or toll-like receptor 10 involved in asthma genetics--or both? *Allergy.* 2006. Vol. 61. №5. P. 649–650.

6. Kormann M.S., Depner M., Hartl D., Klopp N., Illig T., Adamski J., Vogelberg C., Stephan K. Weiland, Erika von Mutius, Kabesch M.. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008. Vol. 122. P.86–92.
7. Soo-Jong Hong, Hyo-Bin Kim, Mi-Jin Kang, So-Yeon Lee, Ja-Hyung Kim, Bong-Seong Kim, Seong-Ok Jang, Hyung-Doo Shin, Choon-Sik Park TNF- β (-308 g/a) and CD14 (-159T/C) polymorphisms in the bronchial responsiveness of Korean children with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2007. Vol. 119. No. 2. P. 398-404.
8. Zhao L. Association of CD14-260 (-159) C>T and asthma: a systematic review and meta-analysis. *BMC medical genetics.* 2011. Vol. 12. P.93.
9. Бисюк Ю.А., Белоглазов В.А., Дубовой А.И. С159Т полиморфизм гена рецептора CD14 у взрослых больных бронхиальной астмой в популяции Крыма // Таврический медико-биологический вестник. 2013. Т.16. №3. С.27-30.
10. Zaborowski T., Wojas-Krawczyk K., Krawczyk P., Jankowska O., Siwiec J., Kucharczyk T., Grzybek M., Milanowski J. The effect of CD14 and TLR4 gene polymorphisms on the occurrence of atopic and non-atopic asthma. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2011. Vol. 20. №4. P. 413-421.
11. Şahin F., Yıldız P., Kuskucu A., Kuskucu M.A., Karaca N., Midilli K. The effect of CD14 and TLR4 gene polymorphisms on asthma phenotypes in adult Turkish asthma patients: a genetic study. *BMC Pulmonary Medicine.* 2014. Vol. 14. №20. DOI: 10.1186/1471-2466-14-20.