

Полиморфизм (Asp299Gly) гена TLR-4 у взрослых больных бронхиальной астмой с atopическим и неатопическим фенотипом в популяции Крыма

ГУ "Крымский государственный медицинский университет им. С.И.Георгиевского": 95006, Симферополь, б-р Ленина, 5 / 7

Yu.A.Bisyuk

TLR-4 gene polymorphism (Asp299Gly) in adult patients with atopic and non-atopic bronchial asthma in the Crimea population

State Institution S.I.Georgievskiy Crimea State Medical University; Simferopol, Russia

Summary

The aim of the study was to investigate TLR-4 gene polymorphism in adult patients with atopic and non-atopic bronchial asthma in the Crimea population.

Methods. TLR-4 gene polymorphism (Asp299Gly) was studied in 275 patients with atopic asthma and 56 patients with non-atopic asthma; a control group included 285 healthy residents of Crimea. The allele-specific polymerase chain reaction with electrophoretic detection of polymorphism was used.

Results. In the control group, genotype frequency distribution (AA 85 %, AG 14 %, GG 1 %) was significantly different ($\chi^2 = 6.598, p = 0.037$) from that in the atopic asthmatics (AA 76 %, AG 22 %, GG 2 %). In patients with non-atopic asthma, genotype frequency distribution (AA 91 %, AG 9 %, GG 0 %) did not differ significantly ($\chi^2 = 1.721, p = 0.423$) from that in the control group. The results have shown that the risk of atopic asthma development was associated with increase in G-allele and decrease in A allele frequency (OR = 1.634, $\chi^2 = 6.08, p = 0.014$).

Conclusion. Thus, TLR-4 gene polymorphism (Asp299Gly) is related to occurrence of bronchial asthma in the Crimea population. The AA genotype (Asp299 Asp) of this gene plays a protective role against asthma occurrence. The G allele frequency in patients with atopic asthma was significantly higher than it was in patients with non-atopic asthma.

Key words: bronchial asthma, endotoxin, TLR4 gene polymorphism Asp299Gly.

Резюме

Изучен полиморфизм гена TLR-4 (Asp299Gly) у пациентов с atopическим ($n = 275$) и неатопическим фенотипом ($n = 56$) бронхиальной астмы (БА). Контрольную группу составили практически здоровые жители Крыма ($n = 285$). Для анализа полиморфизма гена TLR-4 (Asp299Gly) был использован метод аллель-специфической полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией. В контрольной группе частота распределения генотипов (AA – 85 %, AG – 14 %, GG – 1 %) достоверно отличалась ($\chi^2 = 6,598, p = 0,037$) от atopической БА (AA – 76 %, AG – 22 %, GG – 2 %). У пациентов с неатопической БА частота распределения генотипов (AA – 91 %, AG – 9 %, GG – 0 %) достоверно не отличалась ($\chi^2 = 1,721, p = 0,423$) от контроля. Результаты исследования показали, что риск развития atopической БА связан с увеличением частоты аллеля G и уменьшением A (ОШ = 1,634, $\chi^2 = 6,08, p = 0,014$) гена TLR-4. Таким образом, полиморфизм Asp299Gly гена TLR-4 связан с риском развития atopической БА в популяции Крыма. Генотип AA (Asp299 Asp) гена TLR-4 обладает протективными свойствами по отношению к развитию atopической БА. При atopической БА частота аллеля G достоверно выше, а частота аллеля A ниже по сравнению с неатопической БА.

Ключевые слова: бронхиальная астма, эндотоксин, полиморфизм Asp299Gly гена TLR-4.

Распространенность бронхиальной астмы (БА), диагностированной врачом, по данным кросс-секционного исследования [1] в > 70 странах составляет 4,27 %, с наибольшей частотой в Австралии – 20,96 % и наименьшей – в Китае (0,19 %); в РФ этот показатель составляет 2,50 %, в Украине – 2,77 %.

Гигиеническая теория развития аллергических заболеваний, предложенная D.P.Strachan в 1989 г. [2], стала первой попыткой объяснить увеличения заболеваемости у жителей городской местности, а исследования в данной области за последнее 20 лет значительно расширили наше понимание о патогенезе аллергических заболеваний и БА.

Основными регуляторами иммунного ответа являются Т-хелперы 1-го, 2-го, 17-го и 22-го типов, а также регуляторные Т-лимфоциты [3]. Развитие

иммунной системы в условиях стерильности может привести к дисбалансу иммунного ответа с активацией Т-хелперов 2-го типа и последующим синтезом иммуноглобулина (Ig) E [4].

Одним из модификаторов иммунного ответа является эндотоксин грамотрицательных бактерий [5]. Эндотоксин или липополисахарид при попадании в организм связывается со специфическим белком *Lipopolysaccharide binding protein* (LBP) с последующим присоединением к рецепторам CD14 и *Toll like receptor-4* (TLR-4) на поверхности моноцитов, макрофагов и гранулоцитов [6]. Активация данных рецепторов приводит к синтезу провоспалительных цитокинов, в микроокружении которых наивные Т-хелперы трансформируются в Т-хелперы 1-го типа [7]. Т-хелперы 1-го типа, в основном, обладают

протекторными свойствами по отношению к развитию БА, но чрезмерная экспозиция липополисахарида может вызвать противоположный эффект, что, возможно, связано с полиморфизмом генов, кодирующих рецепторы к эндотоксину [8].

Ген TLR4 расположен в хромосоме 9q32-33. Полиморфный участок Asp299Gly (rs4986790) гена TLR4 представляет собой однонуклеотидную замену аденина (A) на гуанин (G) в положении + 896 экзона 3, приводящую к аминокислотной замене аспарагиновой кислоты на глицин в 299 положении полипептидной цепи рецептора [9].

При исследовании распределения частоты аллелей и генотипов данного маркера у взрослых индивидов русского происхождения, проживающих в Москве, не было выявлено прямой ассоциации полиморфизма Asp299Gly с развитием atopической БА [10]. У жителей Полтавской области (Украина) частота аллеля G у детей, страдающих atopической БА, составила 7,54 %, аллеля A – 92,45 %, что достоверно отличалось (отношение шансов – ОШ = 1,059; 95%-ный доверительный интервал – ДИ – 0,9989–1,122; $p = 0,049$) от контроля (G – 2,11 %, A – 97,89 %), кроме того, наличие мутантного аллеля G в > 4 раза увеличивало вероятность неконтролируемого течения atopической БА (ОШ = 4,13; 95%-ный ДИ – 1,05–1,44; $p = 0,02$) [11].

В популяции Крыма исследований по изучению полиморфизма Asp299Gly гена TLR-4 и его связи с пенетрацией БА не проводилось.

Цель исследования – изучить наличия ассоциации между полиморфизмом гена TLR-4 (Asp299Gly) и развитием atopической и неатопической БА у взрослых больных в популяции Крыма.

Материалы и методы

Для исследования полиморфизма Asp299Gly гена рецептора TLR-4 в популяции Крыма принимали участие только лица, которые родились в данном регионе.

В исследования были включены больные БА ($n = 331$). Диагноз и лечение БА проводились в соответствии с критериями GINA (2012). Все больные БА были разделены на две группы, в зависимости от atopического и неатопического фенотипа. Критериями для atopического фенотипа были положительный аллергоанамнез и кожные аллерготесты с пыльцевыми или бытовыми аллергенами с размером папулы > 3 мм. Отсутствие данных критериев подтвердило неатопический вариант БА.

Группу контроля составили практически здоровые жители Крыма ($n = 285$). Все волонтеры обследовались на предмет atopической патологии посредством изучения анамнеза и проведения кожных аллерготестов. Для проведения кожных прик-тестов использовались аллергены производства "Иммунолог" (Украина).

Для анализа полиморфизма гена TLR-4 (Asp299Gly) был использован метод аллель-специфической полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией. Выделение ДНК осуществлялось из

цельной крови пациентов с БА и здоровых добровольцев с помощью набора "ДНК-экспресс кровь" ("Литех", Россия) согласно инструкции производителя. Постановка аллель-специфической ПЦР осуществлялась с помощью наборов "Мутация толл-подобного рецептора 4 Asp299Gly, rs4986790" ("Литех", Россия) согласно инструкции производителя. Детекция продуктов амплификации осуществлялась методом горизонтального электрофореза с помощью готового набора ("Литех", Россия).

Все полученные результаты подвергнуты статистической обработке для параметрических и непараметрических критериев с использованием программы *Minitab 16*. При анализе проверки распределения на нормальность использовали тест Колмогорова–Смирнова, сравнение центральных тенденций 2 независимых выборок с использованием U-критерия Манна–Уитни и сравнение средних 2 независимых выборок по критерию Стьюдента. Количественные переменные представлены в виде средних значений и среднеквадратических отклонений для параметрических методов и медианы с 1-м и 3-м квартилями – для непараметрических. Для установления распределения генотипов соответственно закону Харди–Вайнберга использовался точный тест Фишера и χ^2 . Для определения разницы в частоте генотипов и аллелей контроля и больных БА была использована логистическая регрессия с помощью *on-line* калькулятора (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

В данной работе риск по аллелю G подразумевал доминантную модель G, когда частота генотипа AG объединяется с генотипом GG и сравнивается с генотипом AA. Подсчет частоты аллеля A проводился по следующей формуле:

$$nAA \times 2 + nAG,$$

где: A – частота аллеля, nAA – число обследуемых с генотипом AA, nAG – число обследуемых с генотипом AG; для аллеля G использовалась аналогичная формула:

$$nGG \times 2 + nAG,$$

где: G – частота аллеля nGG – число обследуемых с генотипом GG, nAG – число обследуемых с генотипом AG.

У всех получено добровольное письменное согласие на участие в научном исследовании, на которое есть разрешение комиссии по биоэтике ГУ "КГМУ им. С.И.Георгиевского".

Результаты и обсуждение

Аллергоанамнез и результаты кожных тестов выявили пациенты ($n = 275$) с atopическим и неатопическим ($n = 56$) фенотипом БА. Средний возраст больных с atopической БА ($51,66 \pm 10,69$ года), неатопической ($54,27 \pm 9,85$ года) и волонтеров ($50,7 \pm 10,2$ года) достоверно не отличался ($p > 0,05$).

Продолжительность заболевания для atopического фенотипа БА составила $19,88 \pm 11,80$ года, что

Таблица 1

Частота распределение генотипов TLR-4 (Asp299Gly) у больных БА и здоровых лиц

Показатель	Контроль, n = 285	БА, n = 331	ОШ	95%-ный ДИ	χ^2	p
Распределение генотипов						
AA	242 (85 %)	261 (79 %)	–	–	3,824	0,148
AG	40 (14 %)	66 (20 %)				
GG	3 (1 %)	4 (1 %)				
Риск по аллелю G ([AA] < - > [AG + GG])						
AA	242 (85 %)	261 (79 %)	1,509	0,994–2,293	3,75	0,053
AG + GG	43 (15 %)	70 (21 %)				
Разница частот аллелей						
A	524 (92 %)	588 (89 %)	A < - > G 1,434	0,974–2,110	3,37	0,067
			G < - > A 0,698	0,474–1,027	3,37	0,067
G	46 (8 %)	74 (11 %)				

достоверно отличалось ($p < 0,001$) от неатопического – $12,96 \pm 9,21$ года ($p < 0,001$). Начало проявления симптомов БА было более ранним для атопической БА ($31,77 \pm 9,26$ года) по сравнению с неатопической ($41,30 \pm 9,12$ года; $p < 0,001$).

Результаты анализа начала заболевания БА согласуются с классическими представлениями о том, что неатопический фенотип наблюдается чаще в позднем возрасте по сравнению с атопическим.

Различия в частоте генотипов и аллелей TLR-4 (Asp299Gly) здоровых волонтеров и больных с БА в популяции Крыма представлены в табл. 1.

Распределения генотипов (см. табл. 1) контроля (AA – 85 %, AG – 14 %, GG – 1 %) и больных БА (AA – 79 %, AG – 20 %, GG – 1 %) находились в соответствии с законом Харди–Вайнберга и достоверно не различались ($\chi^2 = 3,824$; $p = 0,148$) между собой.

При анализе данных с использованием доминантной модели по аллелю G (см. табл. 1) у пациентов с БА наблюдалась тенденция ($\chi^2 = 3,75$; $p = 0,053$) к превалированию генотипов AG + GG (21 %) по сравнению с контролем (15 %). При сравнении частоты аллелей G и A в исследуемых группах также не выявлено достоверных отличий ($\chi^2 = 3,37$; $p = 0,067$).

Следующим этапом работы стал анализ частоты распределения генотипов у больных с атопическим фенотипом БА по сравнению с контролем (табл. 2).

У больных с атопическим фенотипом БА (см. табл. 2) частота распределения генотипов TLR-4 (AA – 76 %, AG, – 22 %, GG – 2 %) достоверно отличалась ($\chi^2 = 6,598$; $p = 0,037$) от контроля (AA – 85 %, AG – 14 %, GG – 1 %).

При анализе риска по аллелю G выявлена связь мутантного аллеля с риском развития атопической БА. Частота гетерозиготного и гомозиготного генотипа превалировала у пациентов с атопической БА (AG + GG – 24 %) по сравнению с контролем (AG + GG – 15 %; $24 \% \chi^2 = 6,57$; $p = 0,010$). При этом риск развития данного заболевания связан с увеличением частоты аллеля G и уменьшением аллеля A (ОШ 1,634; $\chi^2 = 6,08$; $p = 0,014$).

При анализе результатов, представленных в табл. 2, выявлено наличие связи полиморфизма (Asp299Gly) гена TLR-4 с риском развития атопической БА в популяции Крыма.

Для выяснения роли полиморфизма гена TLR-4 у больных неатопической БА был проведен аналогичный анализ (табл. 3).

Таблица 2

Частота распределения генотипов TLR-4 (Asp299Gly) у пациентов с атопическим фенотипом БА и здоровых лиц

Показатель	Контроль, n = 285	Атопическая БА, n = 275	ОШ	95%-ный ДИ	χ^2	p
Распределение генотипов						
AA	242 (85 %)	210 (76 %)	–	–	6,598	0,037
AG	40 (14 %)	61 (22 %)				
GG	3 (1 %)	4 (2 %)				
Риск по аллелю G (AA < - > AG + GG)						
AA	242 (85 %)	210 (76 %)	1,742	1,136–2,671	6,57	0,010
AG + GG	43 (15 %)	65 (24 %)				
Разница частот аллелей						
A	524 (92 %)	481 (87 %)	A < - > G 1,634	1,103–2,421	6,08	0,014
			G < - > A 0,612	0,413–0,907	6,08	0,014
G	46 (8 %)	69 (13 %)				

Таблица 3
Частота распределения генотипов TLR-4 (Asp299Gly) рецептора у больных с неатопическим фенотипом БА и здоровых лиц

Показатель	Контроль, n = 285	Неатопическая БА, n = 56	ОШ	95%-ный ДИ	χ^2	p
Распределение генотипов						
AA	242 (85 %)	51 (91 %)	–	–	1,721	0,423
AG	40 (14 %)	5 (9 %)				
GG	3 (1 %)	0 (0 %)				
Риск по аллелю G (AA < - > AG + GG)						
AA	242 (85 %)	51 (91 %)	0,552	0,208–1,461	1,47	0,226
AG + GG	43 (15 %)	5 (9 %)				
Разница частот аллелей						
A	524 (92 %)	107 (96 %)	A < - > G 0,532	0,207–1,371	1,76	0,185
			G < - > A 1,879	0,729–4,838	1,76	0,185
G	46 (8 %)	5 (4 %)				

У пациентов с неатопической БА (см. табл. 3) частота генотипов гена TLR-4 достоверно не отличалась ($\chi^2 = 1,721$; $p = 0,423$) от контроля, ассоциаций с частотой аллеля G у данной категории пациентов также не обнаружено ($\chi^2 = 1,76$; $p = 0,185$).

Суммируя данные результаты, можно считать, что полиморфизм изучаемого гена не связан с развитием неатопической БА.

На данном этапе работе выяснена роль распределения частоты аллеля G внутри популяции больных БА с учетом атопического и неатопического фенотипа (табл. 4).

При анализе табл. 4 показано, что частота распределения генотипов у пациентов с атопической и неатопической БА достоверно отличалась ($\chi^2 = 6,189$; $p = 0,045$). Риск по аллелю G был больше для пациентов с атопической БА (AG + GG – 24 %) в сравнении с неатопической (AG + GG – 9 %). Частота аллеля G встречается в 3 раза чаще у больных с атопическим фенотипом БА (ОШ = 3,070; $p = 0,013$).

Обобщая результаты данного исследования, можно предположить, что риск не заболеть БА связан

с аллелем А, а вероятность заболеть атопической БА – с аллелем G.

Полученные результаты согласуются с данными исследования [12], по результатам которого установлено, что риск развития атопической БА был достоверно выше у лиц с генотипом AG по сравнению с AA (ОШ = 2,33; 95%-ный ДИ – 1,033–5,261; $p < 0,05$). По данным метаанализа, основанного на 9 исследованиях, и сравнении 1 838 случаев БА и 1 765 – контроля не было обнаружено достоверной связи между Asp299Gly полиморфизмом и БА [13].

Повышенный риск развития атопической БА у лиц с гетерозиготным генотипом AG (Asp299Gly) связан с ответом иммунной системы на эндотоксин [14]. Так, у пациентов с БА уровень эндотоксин-индуцированной секреции интерлейкина-12 значительно ниже при AG-генотипе, чем при AA, что создает условия для активации Т-хелперов 2-го типа и переключения иммунного ответа на синтез IgE.

Для более широкого понимания связи полиморфизма Asp299Gly гена TLR-4 с развитием БА, очевидно, нужно выходить за рамки стратификации

Таблица 4
Сравнение частоты распределения генотипов TLR-4 (Asp299Gly) рецептора у больных с атопическим и неатопическим фенотипами БА

Показатель	Атопическая БА, n = 275	Неатопическая БА, n = 56	ОШ	95%-ный ДИ	χ^2	p
Распределение генотипов						
AA	210 (76 %)	51 (91 %)	–	–	6,189	0,045
AG	61 (22 %)	5 (9 %)				
GG	4 (2 %)	0 (0 %)				
Риск по аллелю G ([AA] < - > [AG + GG])						
AA	210 (76 %)	51 (91 %)	0,317	0,121–0,827	6,04	0,014
AG + GG	65 (24 %)	5 (9 %)				
Разница частот аллелей						
A	481 (87 %)	107 (96 %)	A < - > G 0,326	0,128–0,827	6,12	0,013
			G < - > A 3,070	1,209–7,793	6,12	0,013
G	69 (13 %)	5 (4 %)				

пациентов сугубо на atopический или неatopический варианты, а анализ частоты генотипов гена данного рецептора с учетом других фенотипов и эндотипов эндотоксин-зависимого воспаления позволит выявить новые взаимосвязи в контексте изучаемой проблемы.

Заклучение

Полиморфизм Asp299Gly гена TLR-4 связан с риском развития atopической БА в популяции Крыма.

Протективными свойствами по отношению к развитию atopической БА обладают генотип AA (Asp299 Asp) гена TLR-4.

При atopической БА частота аллеля G достоверно выше, а частота аллеля A ниже по сравнению с неatopической БА ($\chi^2 = 6,12$; $p = 0,013$).

Литература / References

1. To T., Stanojevic S., Moores G. et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. BMC Publ. Hlth. 2012; 12 (1): 204.
2. Strachan D.P. Hay fever, hygiene, and household size. Br. Med. J. 1989; 299 (6710): 1259–1260.
3. Wenzel S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. Nat. Med. 2012; 18 (5): 716–725.
4. Holgate S.T. Innate and adaptive immune responses in asthma. Nat. Med. 2012; 18 (5): 673–683.
5. Kim Y.-M., Kim Y.-S., Jeon S.G. et al. Immunopathogenesis of allergic asthma: more than the Th2 hypothesis. Allergy Asthma Immunol. Res. 2013; 5 (4): 189–196.
6. Park B.S., Lee J.-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. Exp. Mol. Med. 2013; 45 (12): e66.
7. Tesse R., Pandey R.C., Kabesch M. Genetic variations in toll-like receptor pathway genes influence asthma and atopy. Allergy. 2011; 66 (3): 307–316.
8. Simpson A., Martinez F.D. The role of lipopolysaccharide in the development of atopy in humans. Clin. Exp. Allergy. 2010; 40 (2): 209–223.
9. Yang I.A., Barton S.J., Rorke S. et al. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. Genes Immun. 2004; 5 (1): 41–45.
10. Дмитриева-Здорова Е.В. Изучение генетической предрасположенности к atopической бронхиальной астме с использованием полиморфных маркеров генов-кандидатов: Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2010. / Dmitrieva-Zdorova E.V. Investigation of Genetic Predisposition to Bronchial Asthma Using Candidate Genes Polymorphic Markers: Diss. Moscow; 2010 (in Russian).
11. Крючко Т.А., Вовк Ю.А., Ткаченко О.Я. Роль генетических факторов в развитии тяжелой atopической бронхиальной астмы у детей. Здоровье ребенка. 2012; 5 (40): 58–62. / Kryuchko T.A., Vovk Yu.A., Tkachenko O.Ya. A role of genetic factors for occurrence of severe childhood bronchial asthma. Zdorov'e rebenka. 2012; 5 (40): 58–62 (in Russian).
12. Zaborowski T., Wojas-Krawczyk K., Krawczyk P. et al. The effect of CD14 and TLR4 gene polymorphisms on the occurrence of atopic and non-atopic asthma. Adv. Clin. Exp. Med. 2011; 20 (4): 413–421.
13. Chen S. Association between the TLR4 +896A>G (Asp299Gly) polymorphism and asthma: A systematic review and meta-analysis. J. Asthma. 2012; 49 (10): 999–1003.
14. Lundberg A., Wikberg L.A., Ilonen J. et al. Lipopolysaccharide-induced immune responses in relation to the TLR4 (Asp299Gly) gene polymorphism. Clin. Vaccine Immunol. 2008; 15 (12): 1878–1883.

Информация об авторе

Бисюк Юрий Анатольевич – к. м. н., доцент кафедры внутренней медицины № 2 ГУ "КГМУ им. С.И.Георгиевского"; тел.: 38 (0652) 55-49-45; e-mail: bisyuk@gmail.com

Поступила 06.02.14
© Бисюк Ю.А., 2014
УДК 616.248-056.7(477.575)