

УДК 616.23-056-053.5:575

## ОСОБЕННОСТИ МАНИФЕСТАЦИИ И КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ПОЛИМОРФИЗМОМ TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 4

Лапшин В.Ф., Крючко Т.А., Вовк Ю.А., Ткаченко О.Я.

ВУГЗУ «Украинская медицинская стоматологическая академия».

### Резюме.

ОСОБЛИВОСТІ МАНІФЕСТАЦІЇ ТА КЛІНІЧНОГО ПЕРЕБІГУ АТОПІЧНОЇ  
БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДІТЕЙ ІЗ ГЕНЕТИЧНИМ ПОЛІМОРФІЗМОМ  
TOLL-ПОДІБНОГО РЕЦЕПТОРА 4

Лапшин В.Ф., Крючко Т.О., Вовк Ю.О., Ткаченко О.Я.

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Ефективна профілактика бронхіальної астми передбачає своєчасне прогнозування захворювання в ранньому віці. Тому, пошуки достовірних маркерів атопії залишаються актуальним питанням сучасної клінічної імунології.

Ми дослідили поширеність поліморфної алелі Asp299Gly гену TLR4 серед дітей хворих на атопічну бронхіальну астму (n=53). Групу контролю склали здорові мешканці Полтавської області (n=95).

Підтверджена вища поширеність мутантної алелі в групі хворих із атопічною БА (p<0,001). Встановлений статистично значимий зв'язок генотипів Asp299Gly, Gly299Gly із раннім початком атопічного «маршу» у дітей (p<0,001). Крім того наявність поліморфізму визначало маніфестацію захворювання до 3-річного віку (p<0,001), прогресуючий перебіг БА, та формуванням вираженої сенсibilізації до алергенів (p<0,001). Доведений зв'язок обтяженої спадковості по алергопатології із наявністю мутантного генотипу.

Таким чином, обстеження дітей на генетичний поліморфізм Asp299Gly гену TLR4 допоможе спрогнозувати ризик розвитку та особливості клінічного перебігу БА, що обґрунтує своєчасність початку превентивної терапії.

**Ключові слова:** бронхіальна астма, діти, Toll-подібний рецептор 4,

поліморфізм, прогнозування.

### **Резюме.**

## **ОСОБЕННОСТИ МАНИФЕСТАЦИИ И КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ПОЛИМОРФИЗМОМ TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 4**

Лапшин В.Ф., Крючко Т.А., Вовк Ю.А., Ткаченко О.Я.

ВУГЗУ «Украинская медицинская стоматологическая академия», г. Полтава

Эффективность профилактики бронхиальной астмы предусматривает своевременность прогнозирования заболевания еще в раннем детском возрасте. Поэтому, поиск достоверных маркеров атопии – актуальная задача современной клинической иммунологии.

Исследовали распространенность полиморфизма гена TLR4 Asp299Gly среди больных атопической бронхиальной астмой (n=53). В контрольную группу вошли здоровые жители Полтавской области (n=95).

Выявлено большую частоту мутантной аллели 299Gly у больных на атопическую БА ( $p<0,05$ ). Доказана статистически значимая связь генотипов Asp299Gly, Gly299Gly с ранним началом атопического «марша» у детей ( $p<0,001$ ). Кроме того, наличие мутантного генотипа определяло манифестацию заболевания до 3-летнего возраста ( $p<0,001$ ), прогрессирующее течение БА ( $p<0,001$ ) и формирование выраженного спектра сенсибилизации к аллергенам ( $p<0,001$ ). Доказана значимость отягощенной наследственности по аллергопатологии с наличием мутантного генотипа.

Таким образом, обследование детей на генетический полиморфизм Asp299Gly гена TLR4 поможет спрогнозировать риск развития и особенности течения БА, что обосновывает своевременную превентивную терапию .

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, дети, Toll-подобный рецептор, полиморфизм, прогнозирование.

### **Summary.**

**MANIFESTATION AND CLINICAL FLOW OF ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN WITH GENETIC POLYMORPHISM OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4**

V.Ph. Lapshyn, T.A. Kruchko, J.A. Vovk, O.Y. Tkachenko.

HSNIU «Ukraine medical dentist faculty», Poltava

Efficiency prophylaxis of bronchial asthma foresees the timeliness of prognostication of disease as early child's age. Therefore, a search of reliable markers of atopy is a - актуальная task of modern clinical immunology.

Investigated prevalence of polymorphism Asp299Gly (TLR4) among patients by atopic bronchitis asthma (n=53). A control group was entered by the healthy habitants of the Poltava area (n=95).

Statistically significant association of allele 299G with the presence atopy bronchial asthma in children. Where are meaningful connection of Asp299Gly, Gly299Gly with the early beginning of atopic "march" for children ( $p<0,001$ ). In addition, the presence of mutant genotip determined manifestation of disease to 3-years-old age ( $p<0,001$ ), making progress flow OH ( $p<0,001$ ) and forming severe spectrum sensitization of allergen ( $p<0,001$ ). Meaningfulness of the burdened heredity is well-proven on аллергопатологии with the presence of mutant genotype.

Thus, the inspection of children on genetic polymorphism of Asp299Gly of gene of TLR4 will help prognosis the risk of development and feature of flow OH, that grounds timely preventive therapy.

Одной из наиболее актуальных проблем современной педиатрии является гиподиагностика бронхиальной астмы (БА), способствующая росту тяжелых клинических проявлений заболевания, которые нередко становятся причиной ухудшения качества жизни, инвалидизации, а иногда и смертельных исходов у детей [2, 3, 6, 14]. Несвоевременная и необъективная диагностики БА, даже при имеющихся признаках респираторной дисфункции, приводит к неадекватному проведению профилактических и лечебных мероприятий, что обуславливает актуальность поиска достоверных методов прогнозирования заболевания еще в раннем детском возрасте [2, 6, 7, 14].

Бронхиальная астма является классическим примером мультифакторной патологии, развивающейся при взаимодействии факторов окружающей среды и

наследственной предрасположенности. Изучение генетических основ данного заболевания остается по-прежнему актуальной задачей, поскольку пока трудно представить всю картину взаимодействия наследственных и средовых факторов в реализации столь сложного патологического фенотипа [4, 7, 8]. Поэтому, недостаточно изученная генетическая составляющая бронхиальной астмы выдвигает новые аспекты для исследования и поиска скрининговых маркеров, что позволило бы разработать индивидуальные эффективные программы ее профилактики и тактики лечения [13, 14, 18].

На протяжении последних лет генетика врожденного иммунитета (ВИ), стала центром активных международных исследований как возможное патогенетическое звено атопии [5, 10, 11, 15, 16]. Перспективно рассматривается концепция точечных замен в геномной ДНК (однонуклеотидный полиморфизм, ОНП), которые кодируют структуру Toll-подобного рецептора 4, нарушая тем самым регуляцию врожденной иммунной системы при взаимодействии с липополисахаридом, что может быть ключевым фактором дисбаланса  $T_1/T_2$  хелперов в раннем детском возрасте [11, 12].

Поскольку различия в генах, контролирующих защитные реакции организма, могут определять различный характер течения воспалительного ответа и специфических иммунологических реакций при внедрении чужеродных агентов, изучение распространенности однонуклеотидных замен у детей с бронхиальной астмой, представляет особенный интерес.

**Цель** нашего исследования: с современных позиций оценить значимость полиморфизма Asp299Gly Toll-подобного рецептора 4 в реализации склонности к атопической бронхиальной астме в детском возрасте для обоснования и разработки методов раннего прогнозирования заболевания.

**Объекты и методы исследования.** Для достижения поставленной цели нами обследована группа детей больных бронхиальной астмой в возрасте 6-10 лет ( $n=53$ ), находившиеся на стационарном лечении и обследовании. Постановка диагноза соответствовала критериям “Консенсусу вопросов классификации, диагностики и лечения бронхиальной астмы у детей” [3].

В качестве материала исследования использовали периферическую венозную кровь. Для изучения генотипа гена Toll-like рецептора 4 выделяли геномную ДНК методом фенол-хлороформной экстракции. Полиморфный участок Asp299Gly генотипировали методом полимеразной цепной реакции с использованием олигонуклеотидных праймеров. Амплификация проводилась на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Москва).

Группу контроля составили 95 практически здоровых людей с базы генетических образцов НИИ Генетических и иммунных основ развития патологии и фармакогенетики ВГУЗУ «УМСА».

Полученные результаты статистически обработаны параметрическими и непараметрическими критериями с использованием «STATISTICA for Windows 7.0» (StatSoft Inc) и электронных таблиц MS Excel. Распределение генотипов по полиморфному локусу проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью критерия  $\chi^2$ . Распределение частот аллелей между группами изучали с помощью  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность при числе степеней свободы равных 1. Сопоставление частот генотипов между исследуемыми группами проводили с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот вариантов в независимых группах использовали показатель отношения шансов (ОШ) с определением 95% доверительного интервала (ДИ). Для всех видов анализа статистически значимыми считались отличия при  $p < 0,05$  [1, 9].

### **Результаты исследования**

В рамках генетического исследования нами изучена распространенность полиморфизма Asp299Gly гена Toll-подобного рецептора 4 в группе больных детей и сопоставлено с соответствующими данными здоровой популяции.

Анализ распределения частот генотипов по исследуемому гену в группах наблюдения отображен в таблице 1. Исходя из полученных результатов, в группе контроля необходимо подчеркнуть несоответствие равновесию Харди-Вайнберга: в 96,85% обследуемых определялся «дикий тип» генотипа TLR4 (AA), частота гетерозигот (AG) составила 2,1%, гомозигот по мутантной аллели (GG) – 1,05% ( $\chi^2=22,7$ ;  $df=1$ ). У детей с atopической БА выявлена следующая частота генотипов

TLR4: AA - 86,80%, AG - 11,32% та GG - 1,88%, что соответствовало теоретически ожидаемому по равновесию Харди-Вайнберга ( $\chi^2=1,89$ ;  $df=1$ ).

**Таблица 1. Распределение частоты генотипов в группах одномоментного наблюдения по маркеру Asp299Gly гена Toll-подобного рецептора 4, % (n)**

ген, полиморфизм	генотип	группа контроля, n=95	больные на АБА, n=53	p*
TLR4 Asp299Gly	AA	96,85% (92)	86,80% (46)	0,0385
	AG	2,10% (2)	11,32% (6)	
	GG	1,05% (1)	1,88 (1)	

p\* - уровень значимости, полученный точным тестом Фишера.

Изучение распространенности нормальной и мутантной аллели 299Gly гена Toll-подобного рецептора 4 в обследуемых группах (таблица 2) показало, что среди здоровых аллель Asp встречалась с частотой 97,89%, а аллель Gly - 2,11%. У детей с бронхиальной астмой, соответственная частота составила 92,45% и 7,54%, что в 3,5 раза превышало распространенность полиморфной аллели в группе контроля (таблица 2).

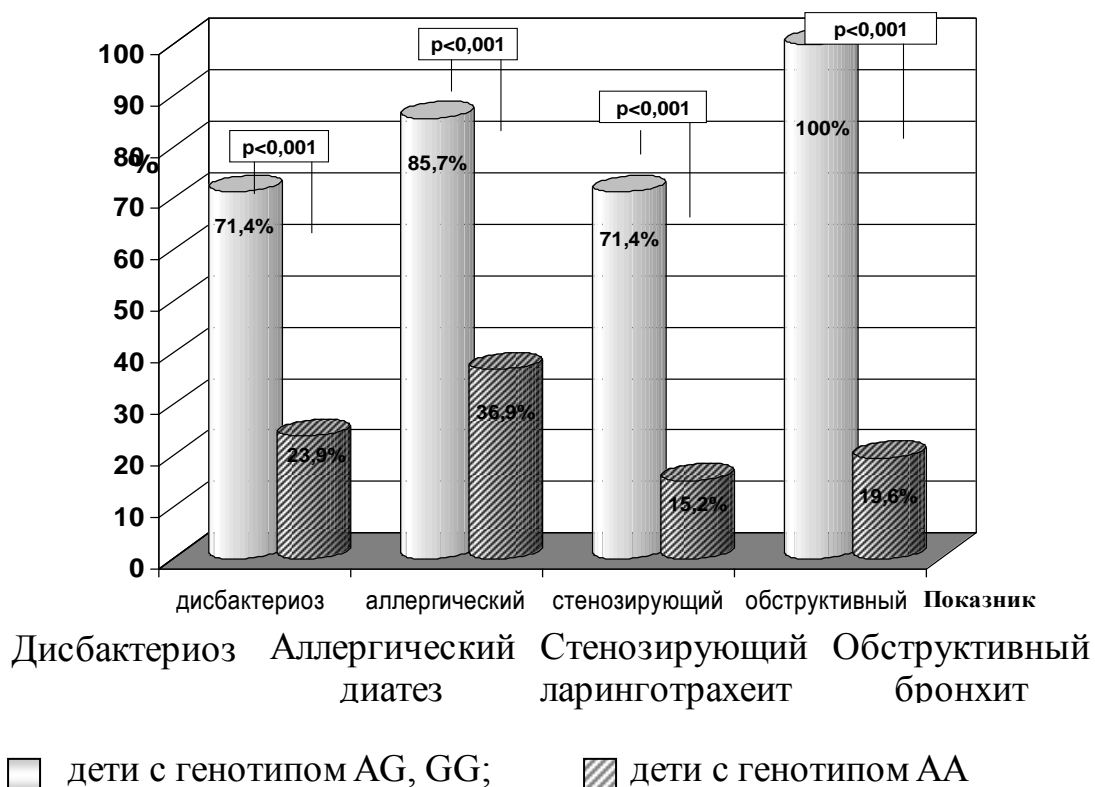
**Таблица 2. Распределение частоты аллелей в группах одномоментного наблюдения по маркеру Asp299Gly гена Toll-подобного рецептора 4, % (n)**

ген, полиморфизм	аллель	группа контроля, n=95	больные на АБА, n=53	$\chi^2$ Пирсона, df=1	ОШ (95% ДІ)	p**
TLR4 Asp299Gly	A	97,89% (186)	92,45% (98)	3,876	1,059 (0,9989-1,122)	0,049
	G	2,11% (4)	7,54% (8)			

p\*\* - уровень значимости при сравнении показателей с контрольной группой (критерий  $\chi^2$  Пирсона).

Для определения значимых клинических особенностей АБА у детей мы сформировали две подгруппы больных: I - с диагностированным полиморфизмом Asp299Gly (генотипы AG, GG) и II - с «диким» (нормальным распределением аллелей) генотипом AA гена Toll-подобного рецептора 4.

Изучая период манифестации атопической БА, мы выявили клинические особенности, подтверждающие патогенетический вклад мутантной аллели 299Gly в формирование атопического «марша» у детей (рисунок 1). На сегодняшний день не секрет, что нарушение барьера пищеварительного тракта, представленного анатомическим, физиологическим и иммунным компонентами, может способствовать манифестации аллергического диатеза и атопического дерматита. Среди обследованных с БА, дисбактериоз кишечника чаще выявлено у детей с полиморфизмом врожденных компонентов иммунной системы, который находится, согласно литературных данных, в прямой корреляционной связи с мутантным генотипом Asp299Gly гена TLR4 [15, 19]. Учитывая важнейшую роль Toll-подобного рецептора 4 в формировании оральной толерантности и торможении аллергических реакций у новорожденных детей, его дисфункция способствует нарушению продукции дендритными клетками цитокинов, которые контролируют баланс соотношение Th1/Th2 лимфоцитов [17].



***Рисунок 1. Анализ ассоциации генотипов TLR4 из особенностями формирования atopического марша у детей на первом году жизни, (%).***

Кроме того, мы выявили, что у детей с мутантным генотипом чаще наблюдались эпизоды обструктивного бронхита ( $p < 0,001$ ) и стенозирующего ларинготрахеита на первом году жизни, которые по своей частоте более чем в 4 раза соответственно, превосходили данные показатели детей с нормальным генотипом ( $p < 0,001$ ).

При анализе факторов риска было отмечено, что сопутствующие аллергические заболевания отмечались у всех детей с диагностированным полиморфизмом. Выявлена ассоциация мутантного генотипа с развитием у больных персистирующего аллергического ринита и atopического дерматита, которые более чем в 2 и 8 раз чаще реализовались у детей первой подгруппы нежели у больных с Asp/Asp генотипом ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, точечный полиморфизм влияет на формирование бронхиальной астмы до 3-летнего возраста, что подчеркивает важность активного наблюдения детского населения для выявления первых клинических признаков формирования atopического континуума.

В группах обследованных детей atopическая бронхиальная астма характеризовалась существенной вариабельностью по срокам манифестации (таблица 3). Как выявилось, генотипы Asp/Gly и Gly/Gly у больных первой подгруппы ассоциировались с ранней манифестацией клинических явлений до 3-летнего возраста, а также более тяжелым неконтролируемым течением астмы, в то время как у больных с нормальным распределением аллелей TLR4 наблюдалась поздняя реализация патологии и контролируемая легкая степень тяжести заболевания ( $p < 0,001$ ).

Таблица 3.

**Анализ ассоциации генотипов TLR4 с особенностями клинической картины**

**АБА, n (%)**

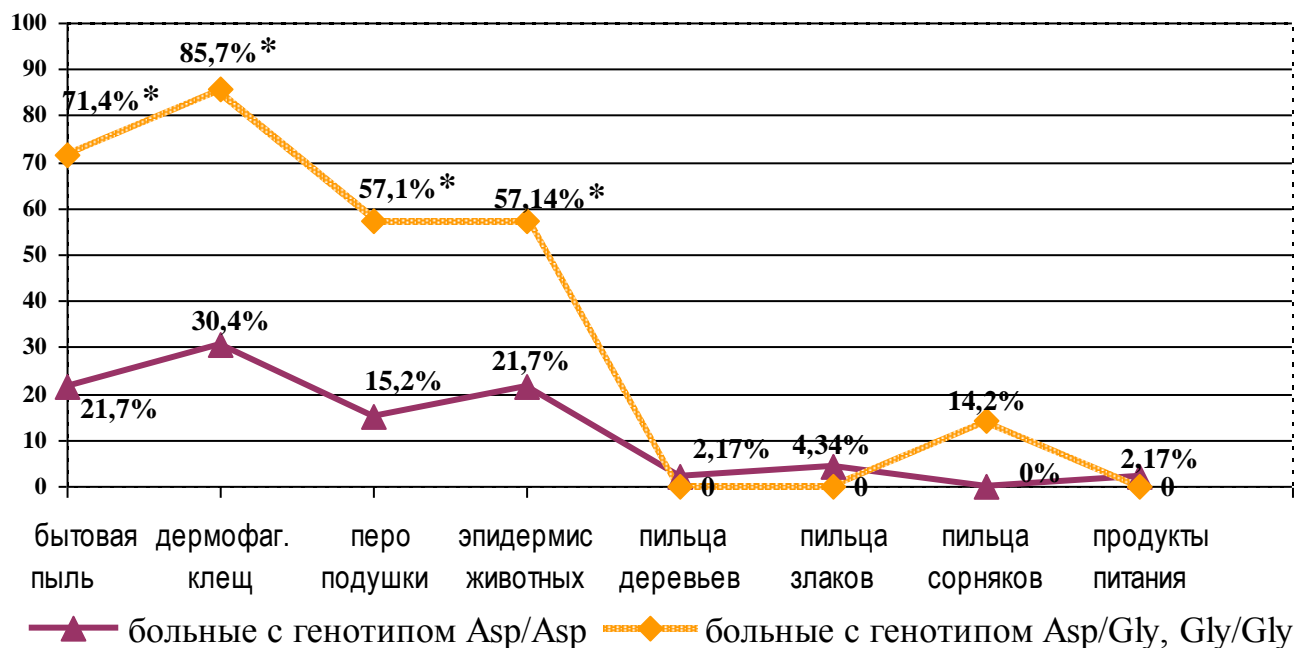
Исследуемый	Частота больных	$\chi^2$ ( $\chi^2$ с поправкой)	p*
-------------	-----------------	----------------------------------	----



симптом	Asp/Gly, Gly/Gly	Asp/Asp	Йетса); ВШ(ДИ)	
Манифестация БА до 3 лет	5(71,44%)	3 (6,52%)	15,22; ВШ=35,8(4,9-76,19)	<0,001*
Персистирующая II ст.	0 (0%)	27 (58,7%)	6,19; ВШ=0,0001(9,9-,01)	<0,001*
Персистирующая III ст.	6 (85,7%)	13(28,26%)	6,4; ВШ=15,23 (1,8-157)	<0,001*
Нестойкая ремисия	6 (85,7%)	11 (23,9%)	8,0; Ш=19,1 (,34-200)	<0,001*
Персистирующий АР	7 (100%)	21 (45,7%)	5,1; ВШ=0,02(0,002-0,7)	<0,001*
Атопический дерматит	5(71,43%)	4 (8,7%)	12,8; ВШ=26,25 3,7-179)	<0,001*

p\* - уровень значимости, полученный тестом  $\chi^2$  с поправкой Йетса.

Анализируя уровень чувствительности к аллергенам мы выявили отличия между группами обследуемых (рисунок 2.). Для больных с генотипом по мутантной аллели диагностирована выраженная гиперчувствительность к бытовым аллергенам, которая чаще регистрировалась в основной подгруппе, в отличие от детей с нормальным генотипом, у которых чаще выявлялась умеренная сенсibilизация к аллергенам (p<0,001).



**Рисунок 1.2. Анализ ассоциации генотипов Asp/Gly, Gly/Gly и Asp/Asp гена TLR 4 с выраженной сенсibilизацией к аллергенам, n (%)**

Выявлено, что наличие у родственников пробанда atopической патологии, в особенности по первой линии родства имеет большое в прогностическом смысле значение, влияющие на формирование БА у детей с генетическим полиморфизмом. Присутствие в генотипе однонуклеотидного полиморфизма коррелировало с аллергопатологией у матери ( $\tau=0,64$ ;  $p<0,005$ ), что еще раз подтверждает ведущую роль наследования по женской линии в реализации atopии. Важно подчеркнуть о прямой корреляционной связи аллели 299Gly с отягощенной наследственностью по atopической патологии как минимум у троих родственников ( $\tau=0,44$ ;  $p<0,005$ ) и высоким генеалогическим индексом, ( $\tau=0,64$ ;  $p<0,005$ ).

Особое внимание заслуживает связь полиморфизма с наследственностью по двум линиям родословной ( $\tau=0,47$ ;  $p<0,005$ ), что позволяет предположить присутствие мутантной аллели в геноме целого поколения родословной, которая определяет Th2 направленность иммунного ответа и может реализоваться фенотипично под действием внешних и внутренних факторов в atopическую бронхиальную астму.

Таким образом, однонуклеотидные точечные мутации, отвечающие за структуру TLR4 (позиция 1187 (rs4986790), можно считать генетическим пусковым механизмом, формирующим эволюционный процесс atopических изменений в организме человека, что имеет определенную последовательность и в раннем детском возрасте клинически проявляется atopическим «маршем», конечным этапом чего является ранняя реализация тяжелой плохо контролируемой АБА.

Полученные результаты заставляют нас по-новому взглянуть на механизмы возникновения atopии, научиться выявлять ранние маркеры аллергического воспаления у детей групп риска, используя клинические и генетические методы обследования, что позволит своевременно осуществлять мероприятия первичной и вторичной профилактики этого социально значимого заболевания. Комплексное генетическое исследование при БА позволит оптимизировать диагностические протоколы, что в значительной мере будет способствовать внедрению

профилактического лечения для решениям проблем трансформации одной формы аллергического заболевания в другую.

### **Выводы.**

Таким образом, генетически детерминированная атопия ассоциирована с высоким риском развития БА. Процесс сенсибилизации развивается эволюционно, начинаясь с внутриутробного этапа, когда закладывается потенциальная сенсибилизация, а после рождения происходит прогрессирующее расширение ее «плацдарма» в виде манифестации «аллергического марша» уже в раннем детском возрасте.

Исследование генетического полиморфизма Asp299Gly гена TLR4 при диспансеризации позволяет выявлять детей с высоким риском развития аллергической формы БА, что отвечает задачам первичной профилактики, направленной на предотвращение иммунологической сенсибилизации, а также вторичной, сориентированной на предупреждении развития системности процесса у больных с атопическим дерматитом и/или аллергическим риноконъюнктивитом.

### **Список литературы**

1. Бабич П.Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение второе. Применение критерия хи-квадрат / П.Н. Бабич, А.В. Чубенко // Український медичний часопис – 2004. - №2 (40) – III/IV – с.138-144.
2. Беш Л.В. Нове в діагностиці та лікуванні бронхіальної астми у дітей: практичний підхід до прочитання найсучасніших міжнародних узгоджувальних документів / Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2010. - №3. - с. 49-52.
3. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / Под ред. Чучалина А.Г. М.: Атмосфера, 2007. - 104с.

4. Иванов В.П. Анализ ассоциаций делеционных полиморфизмов генов глутатион S-трансфераз GSTM1 и GSTT1 с предрасположенностью к бронхиальной астме и особенностями ее клинических проявлений в Курской популяции / В.П. Иванов, А.В. Полоников, М.А. Солодилова, М.А. Кожухов, В.И. Панфилов // Человек и его здоровье. - 2005, № 3. – Р. 49-55.
5. Кайдашев І.П. Роль поліморфізму Toll-подібного рецептора 4 Asp299Gly у розвитку бактеріальних інфекцій, що передаються статевим шляхом / Кайдашев І.П., Ізмайлова О.В., Шликова О.А., Боброва Н.О. // Проблеми екології та медицини. – 2009. - №5-6, Т. 13. – С. 3-6.
6. Победенная Г.П. Особенности диагностики и лечения бронхообструктивного синдрома при бронхиальной астме / Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2011. - №2. – с.28-34
7. Полоников А.В.Изучение связи двух распространенных полиморфизмов S27P и -15C T гена IL3 с развитием аллергической и неаллергической бронхиальной астмы у русских жителей Центрального Черноземья / А.В.Полоников, В.П.Иванов, Д.А.Белугин и др. // Медицинская иммунология. -2006. - Т. 8, № 5-6. –С. 731-736.
8. Фрейдин М.Б. Генетика бронхиальной астмы / М.Б. Фрейдин, Л.М. Огородова, А.Н. Цой, Н.Г. Бердникова. – М.: Атмосфера, 2010. – 78 с.
9. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. – СПб.: ВМедА., 2002. – 266 с.
10. Bottcher MF. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children / M. F. Bottcher et al. // J Allergy Clin Immunol. – 2004. - P. 561-567.
11. Ferwerda B. Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms / B. Ferwerda, M. B. McCall, K. Verheijen, B. J. Kullberg // MOL MED 14 (5-6). – 2008. - P. 346-352.
12. Garcia-Rodriguez C. Toll-like receptor 4-dependent pathways as sensors of endogenous “danger” signals. New evidences and potential therapeutic targets / C. Garcia-Rodriguez // Inmunologia. – 2007. - Vol. 26. - №4. - P.210-215

13. Holloway JW. Genetics of allergic disease / JW. Holloway, IA. Yang , ST. Holgate // *J Allergy Clin Immunol.* – 2010. - №125. – P.81–S94.
14. Kuna P. Difficulties of asthma treatment in youth // *Allergia Astma Immunologia* — 2006 — T. 11, Suppl. 1. — P. 1–5.
15. Lundberg A. Lipopolysaccharide induced immune responses in relation to TLR4(Asp299Gly) gene polymorphism / A. Lundberg, LA. Wikberg, J. Ilonen, O. Vaarala, MF. Bottcher // *Clinical and Vaccine Immunology.* – 2008. - vol 15 (12). - P 1878-1883.
16. Marsik C. The Toll-Like Receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms Influence the Late Inflammatory Response in Human Endotoxemia / C. Marsik, B. Jilma, C. Joukhadar, C. Mannhalter, O. Wagner // *Clinical Chemistry* 51, No.11, 2005. - P.2178-2180.
17. Moser, M., and K. M. Murphy. 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 1:199-205.
18. Schwartz D. The Genetics of Innate Immunity / David A. Schwartz // *CHEST.* – 2002 (121) - P.62-68.
19. Yang, I.A. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics / I.A. Yang, S.J. Barton, S. Rorke, J.A. // *Genes Immun.* – 2004. - №5. – P.41-5.