

УДК 612.2
ББК 23.922
П 50

Руденко К.А.

Аспирант кафедры ботаники факультета естествознания Адыгейского государственного университета, Майкоп, тел. (8772) 59-38-02, e-mail: lab_genetic@mail.ru

Тугуз А.Р.

Доктор биологических наук, профессор кафедры ботаники факультета естествознания, зав. иммуногенетической лабораторией НИИ комплексных проблем Адыгейского государственного университета, Майкоп, тел. (8772) 59-38-02, e-mail: lab_genetic@mail.ru

Анохина Е.Н.

Аспирант кафедры ботаники факультета естествознания Адыгейского государственного университета, Майкоп, тел. (8772) 59-38-02, e-mail: lab_genetic@mail.ru

Муженя Д.В.

Кандидат биологических наук, инженер-генетик иммуногенетической лаборатории НИИ комплексных проблем Адыгейского государственного университета, Майкоп, тел. (8772) 59-38-02, e-mail: lab_genetic@mail.ru

Полиморфизмы генов Toll-подобных рецепторов, ассоциированные с наследственной отягощенностью и возрастом манифестации бронхиальной астмы
(Рецензирована)

Аннотация

При исследовании ассоциации трех SNP (single nucleotide polymorphisms) генов Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptor) мембранного TLR4 (миссенс-мутации Asp299Gly; rs4986790 и Thr399Ile; rs4986790) и внутриклеточного TLR9 (A2848G; rs352140 – нуклеотидные замены в кодирующем регионе гена) с бронхиальной астмой в зависимости от возраста манифестации и наследственной отягощенности статистически значимые отличия между донорами и больными выявлены по частотам генотипов SNP гена внутриклеточного TLR9. Для A2848/2848G полиморфизмов, расположенных в кодирующем регионе гена внутриклеточного TLR9, установлена ассоциация патологического гомозиготного (G2848/2848G или GG) генотипа с ненаследственной формой бронхиальной астмы ($\chi^2=3,62$; OR=3,03) и зрелым возрастом манифестации болезни ($\chi^2=4,69$; OR=5,19). У жителей Республики Адыгея из трех наиболее часто регистрируемых генотипов по исследованным SNP TLR4 и TLR9 (AspAsp/ThrThr/AA, AspAsp/ThrThr/AG, AspAsp/ThrThr/GG) повышенный риск развития бронхиальной астмы в зрелом возрасте связан с сочетанным носительством AspAsp/ThrThr/GG.

Ключевые слова: гены Toll-подобных рецепторов, TLR4 и TLR9, SNP, Asp299Gly и Thr399Ile (TLR4); A2848G (TLR9), бронхиальная астма.

Rudenko K.A.

Post-graduate Student of Botany Department of Natural Science Faculty, Adyghe State University, Maikop, ph. (8772) 59-38-02, e-mail: lab_genetic@mail.ru

Tuguz A.R.

Doctor of Biology, Professor of Botany Department of Natural Science Faculty, Head of Immunogenetic Laboratory of Research Institute of Complex Problems, Adyghe State University, Maikop, ph. (8772) 59-38-02, e-mail: lab_genetic@mail.ru

Anokhina E.N.

Post-graduate Student of Botany Department of Natural Science Faculty, Adyghe State University, Maikop, ph. (8772) 59-38-02, e-mail: lab_genetic@mail.ru

Muzhenya D.V.

Candidate of Biology, Engineer-Geneticist of Immunogenetic Laboratory of Research Institute of Complex Problems, Adyghe State University, Maikop, ph. (8772) 59-38-02, e-mail: lab_genetic@mail.ru

Toll-like receptor gene polymorphisms, associated with a hereditary history and age of bronchial asthma manifestation

Abstract

As a result of study of association of three single nucleotide polymorphisms (SNP) of Toll-like receptor genes of membrane TLR4 (missens-mutations of Asp299Gly; rs4986790 and Thr399Ile; rs4986790) and intra-

cellular TLR9 (A2848G; rs352140 – nucleotide replacements in the coding region of a gene) with bronchial asthma depending on age of manifestation and hereditary history, statistically significant differences in frequencies of SNP genotypes of an intracellular TLR9 gene are revealed between donors and patients. For A2848/2848G of the polymorphisms located in the coding region of an intracellular TLR9 gene, the association is detected of pathological homozygous (G2848/2848G or GG) genotype with non-hereditary form of bronchial asthma ($\chi^2=3.62$; OR=3.03) and mature age of an illness manifestation ($\chi^2=4.69$; OR=5.19). At inhabitants of the Adyghea Republic, of three most often registered genotypes of studied SNP TLR4 and TLR9 (AspAsp/ThrThr/AA, AspAsp/ThrThr/AG, AspAsp/ThrThr/GG), the increased risk of development of bronchial asthma at mature age is connected with the combined availability of AspAsp/ThrThr/GG.

Keywords: Toll-like receptor genes, TLR4 and TLR9, SNP, Asp299Gly and Thr399Ile (TLR4); A2848G (TLR9), bronchial asthma.

Введение

Исследование ассоциации SNP генов TLR4 и TLR9 с хроническими воспалительными заболеваниями органов дыхания обусловлено их ролью в распознавании «паттернов» основных групп вирусов и бактерий, активацией специфического иммунитета, каскада неспецифических базовых воспалительных реакций, вовлеченных в патогенез бронхиальной астмы (БА) [1-3]. Из типированных SNP генов TLR4 и TLR9 (169 для мембранного TLR4 и 33 – внутриклеточного TLR9) в мировых популяциях наиболее распространены Asp299Gly (rs4986790) и Thr399Ile (rs4986790) (TLR4); A2848G (rs352140) (TLR9) [4, 5]. В соотношении частот Asp299/299Gly полиморфизмов гена мембранного TLR4 преобладает нормальная Asp29 аллель (0,93-0,96). Носители редкой «мутантной» 299Gly аллели не превышают 7% населения мира, а в азиатских популяциях этот полиморфизм практически не выявлен. По Thr399Ile SNP гена TLR4 прослеживаются аналогичные закономерности: мутантная 399Ile аллель, регистрируемая у 3-6% населения Европы и Америки, не типруется в Азии и Африке. A2848G полиморфные варианты гена внутриклеточного TLR9 в Америке, Азии и Европе регистрируются примерно с одинаковой частотой (0,52-0,48), однако у жителей африканского континента преобладает мутантная 2848G аллель (соотношение частот A2848/2848G по данным Ensembl составляет 0,69:0,31) [4]. SNP генов мембранного TLR4 и внутриклеточного TLR9 могут быть вовлечены в патогенез бронхиальной астмы, но единичные работы по выявлению их роли в развитии хронических воспалительных заболеваний легких проведены только в нескольких регионах мира [5-9].

Цель работы: исследование частотного распределения полиморфизмов генов TLR4 (Asp299/299Gly), TLR4 (Thr399/399Ile), TLR9 (A2848/2848G) у жителей Республики Адыгея (РА) и их ассоциированности с бронхиальной астмой в зависимости от возраста манифестации, гендерных различий, наследственной отягощенности.

Материалы и методы

В исследование включено 57 этнических русских, проживающих в РА, в том числе: 28 неродственных доноров в возрасте 18-43 лет без клинических проявлений и наследственной отягощенности БА (контрольная группа), 29 стационарных больных (19-56 лет) пульмонологического отделения Адыгейской Республиканской клинической больницы с тяжелыми формами наследственной и ненаследственной бронхиальной астмы, диагностированными в соответствии с критериями GINA, 2011 [1]. Согласно общепринятой классификации возрастной периодизации развития человека, принятой на VII конференции по проблемам возрастной морфологии, физиологии и биохимии (Москва, 1965), больные в зависимости от возраста манифестации бронхиальной астмы разделены на две группы: 1 группа ($n=5$) – с первыми клиническими проявлениями в период раннего и первого детства (0-7 лет); 2 группа ($n=18$) – в периоды I (21/22-35/35 лет) и II (36/36-55/60 лет) зрелого возраста. Полиморфизмы генов TLR4 (Asp299/299Gly), TLR4 (Thr399/399Ile), TLR9 (A2848/2848G) исследованы SNP-

методом на тест-системах НПФ «Литех» (Москва) с электрофоретической детекцией результатов. Геномная ДНК выделена из периферической крови доноров и больных «ДНК-экспресс кровь» НПФ «Литех» (Москва). Концентрации и качество образцов ДНК тестированы на спектрофотометре NanoDrop 2000c «Thermo Scientific» (USA). Статистически значимые различия ($P < 0,05$) частот аллелей гена TLR4 (Asp299/299Gly), TLR4 (Thr399/399Ile), TLR9 (A2848/2848G) рассчитаны с использованием непараметрического метода Фишера, χ^2 (хи-квадрата), OR (odds-ratios – отношения шансов), 95% доверительного интервала (95% CI).

Результаты исследования

В распределении аллельных вариантов и генотипов TLR4 (Asp299/299Gly), TLR4 (Thr399/399Ile) и TLR9 (A2848/2848G) у жителей РА прослеживаются сходные с мировыми популяциями (по данным базы Ensembl) закономерности. Частоты редких «мутантных» 299Gly и 399Ile аллелей генов мембранных TLR4 у жителей РА незначительно повышены (11,5% и 9,3%), а по соотношению A2848/2848G полиморфизмов гена внутриклеточного TLR9 не различаются [4].

При сравнении доноров и больных с тяжелой формой БА без учета наследственной отягощенности, гендерных различий и др. параметров у жителей РА не выявлено достоверных различий по частотам исследованных полиморфных вариантов, что согласуется с данными Chen S., 2012 [3]. Установленная в исследованиях Воронько О.Е. (2011) ассоциация 299Gly «мутантного» аллеля гена мембранного TLR4 с тяжелым течением БА у русских жителей Московской области не нашла экспериментального подтверждения для этнических русских, проживающих в Республике Адыгея [6].

У мужчин и женщин РА с хроническими воспалительными заболеваниями легких не установлены статистически значимые гендерные различия в соотношении частот Asp299 и 299Gly TLR4 (соответственно 0,909:0,091, $\chi^2=0,35$; OR=0,57 и 0,971:0,029, $\chi^2=1,20$; OR=0,29). Наши данные не согласуются с утверждениями Adjers K. et al. (2005) об ассоциации «мутантной» 299Gly аллели гена TLR4 и определенного генотипа «высокого риска» развития БА для женщин Финляндии, что может быть обусловлено этническими особенностями. Следует отметить, что у мужчин и женщин РА по другим исследуемым SNP генов TLR4 (Thr399/399Ile), TLR9 (A2848/2848G) экспериментально также не выявлено ассоциации с хроническими воспалительными заболеваниями легких [10].

При SNP-типировании аллельных вариантов генов TLR4 (Asp299/299Gly), TLR4 (Thr399/399Ile), TLR9 (A2848/2848G) у больных с БА наследственная отягощенность, как правило, не учитывается [5]. Поэтому нами исследовано частотное распределение и возможная ассоциация TLR4 (Asp299/299Gly), TLR4 (Thr399/399Ile), TLR9 (A2848/2848G) с риском развития БА в зависимости от наличия или отсутствия у близких родственников обследуемых больных хронических воспалительных заболеваний легких в двух предшествующих поколениях (табл. 1). Согласно полученным экспериментальным данным, у обследованных жителей РА с наследственной БА не ассоциирован ни один из трех SNP TLR4 и TLR9 (rs4986790, rs4986790, rs352140). При ненаследственных формах БА в сравнении с донорами статистически значимые различия определены только по частотам патологического гомозиготного G2848/2848G генотипа для A2848/2848G полиморфизмов гена внутриклеточного TLR9, участвующего в распознавании как вирусных, так и бактериальных паттернов (табл. 1).

Для определения возможной ассоциации полиморфных вариантов TLR4 (Asp299/299Gly), TLR4 (Thr399/399Ile), TLR9 (A2848/2848G) с возрастом манифестации БА проанализировано их распределение в группах больных с первыми клиническими проявлениями болезни в детском или зрелом возрасте (табл. 2), однако статистически значимые различия установлены только по гену внутриклеточного TLR9. У

больных с манифестацией БА в зрелом возрасте по сравнению с 1 группой достоверно повышена частота «мутантной» 2848G аллели ($\chi^2=5,52$; OR=6,67) и G2848/2848G генотипа ($\chi^2=4,46$; OR=8,68) гена TLR9, что позволяет рассматривать их как маркеры более поздних клинических проявлений БА (табл. 2).

Таблица 1

Распределение аллельных вариантов и генотипов TLR4 (Asp299Gly и Thr399Ile), TLR9 (A2848G) в группах доноров и больных с наследственными и ненаследственными формами бронхиальной астмы

Ген/n	Аллели/ генотипы	Частоты в группах			χ^2	OR (95% CI)
		больных БА		доноров		
		с наследственной формой	БЕЗ наследственной отягощенности			
TLR 4 – 299 (n=10 18 26)	Asp	1,000	0,917	0,885	2,52 ¹ / 0,24 ²	5,73 (0,31-106,5) ¹ / 1,43 (0,33-6,16) ²
	Gly	0,000	0,083	0,115		0,17 (0,01-3,25) ¹ / 0,70 (0,16-2,99) ²
	Asp/Asp	1,000	0,833	0,769	2,77 ¹ / 0,27 ²	6,66 (0,34-129,93) ¹ / 1,50 (0,32-6,99) ²
	Asp/Gly	0,000	0,167	0,231		0,15 (0,01-2,93) ¹ / 0,67 (0,14-3,11) ²
	Gly/Gly	0,000	0,000	0,000		2,52 (0,05-135,69) ¹ / 1,43 (0,03-75,50) ²
TLR 4 – 399 (n=11 17 27)	Thr	1,000	0,824	0,907	2,18 ¹ / 1,34 ²	5,00 (0,26-94,36) ¹ / 0,48 (0,13-1,70) ²
	Ile	0,000	0,176	0,093		0,20 (0,01-3,77) ¹ / 2,10 (0,59-7,51) ²
	Thr/Thr	1,000	0,647	0,815	2,35 ¹ / 1,57 ²	5,62 (0,29-110,80) ¹ / 0,42 (0,10-1,67) ²
	Thr/Ile	0,000	0,353	0,185		0,18 (0,01-3,51) ¹ / 2,40 (0,60-9,64) ²
	Ile/Ile	0,000	0,000	0,000		2,39 (0,04-127,97) ¹ / 1,57 (0,03-82,89) ²
TLR 9 – 2848 (n=9 16 23)	A	0,389	0,531	0,565	1,61 ¹ / 0,09 ²	0,49 (0,16-1,49) ¹ / 0,87 (0,35-2,16) ²
	G	0,611	0,469	0,435		2,04 (0,67-6,21) ¹ / 1,15 (0,46- 2,84) ²
	A/A	0,111	0,375	0,261	1,99 ¹ / 3,62 ² *	0,35 (0,04-3,45) ¹ / 1,70 (0,43-6,72) ²
	A/G	0,556	0,313	0,609		0,80 (0,17-3,82) ¹ / 0,29 (0,08-1,13) ²
	G/G	0,333	0,313	0,130		3,33 (0,53-21,03) ¹ / 3,03* (0,61-15,15) ²

Примечание: * – статистически значимые отличия по χ^2 (при $P<0,05$) и OR (95% CI) для доноров и больных БА с наследственной формой (χ^2)¹ и OR¹ (95% CI); доноров и больных БА без наследственной отягощенности (χ^2)² и OR² (95% CI); n – количество обследованных в соответствующих группах

Способность TLR к распознаванию вирусных и бактериальных паттернов предполагает необходимость анализа сочетания их аллельных вариантов и генотипов, обуславливающих предрасположенность или устойчивость к БА, что может иметь значение в процессах взаимодействия неспецифического и специфического иммунитета. Из возможных сочетаний исследованных SNP TLR4 и TLR 9 в обследованных группах на-

селения РА наиболее часто обнаруживаются две комбинации аллельных вариантов (Asp/Thr/G; Asp/Thr/A) и три генотипа (AspAsp/ThrThr/AA; AspAsp/ThrThr/AG; AspAsp/ThrThr/GG). По сочетанным аллельным вариантам у носителей AspAsp/ThrThr/GG генотипа повышается риск развития БА ($\chi^2=3,49$; OR=6,92).

Таблица 2

Частоты SNP и генотипов TLR4 (Asp299Gly и Thr399Ile), TLR9 (A2848G) в группах больных в зависимости от возраста манифестации БА: в детском (1) и в зрелом (2) возрасте

Ген/п	Аллели/ генотипы	Частоты аллелей			χ^2	OR (95% CI)
		боль- ные БА (1)	боль- ные БА (2)	до- норы		
TLR 4 – 299	Asp	0,900	0,974	0,885	1,08 ¹ / 0,02 ² / 2,43 ³	4,11 (0,23- 72,22) ¹ /1,17 (0,13-10,96) ² / 4,83 (0,56-41,88) ³
	Gly	0,100	0,026	0,115		0,24 (0,01-4,27) ¹ /0,85 (0,09-7,96) ² / 0,21 (0,02-1,80) ³
	Asp/Asp	0,800	0,947	0,769	1,13 ¹ / 0,02 ² / 2,65 ³	4,50 (0,23-88,25) ¹ /1,20 (0,11-12,88) ² / 5,40 (0,5949,26) ³
	Asp/Gly	0,200	0,053	0,231		0,22 (0,01-4,36) ¹ /0,83 (0,08-8,95) ² / 0,19 (0,02-1,69) ³
	Gly/Gly	0,000	0,000	0,000		0,28 (0,01-15,91) ¹ /4,82 (0,09-270,03) ² / 1,36 (0,03-71,53) ³
TLR 4 – 399	Thr	0,800	0,921	0,907	1,24 ¹ / 1,00 ² / 0,05 ³	2,92 (0,42-20,44) ¹ /0,41 (0,07-2,47) ² / 1,19 (0,27-5,31) ³
	Ile	0,200	0,079	0,093		0,34 (0,05-2,40) ¹ /2,45 (0,40-14,85) ² / 0,84 (0,19-3,75) ³
	Thr/Thr	0,600	0,842	0,815	1,41 ¹ / 1,14 ² / 0,06 ³	3,56 (0,40-31,23) ¹ /0,34 (0,04-2,61) ² / 1,21 (0,25-5,82) ³
	Thr/Ile	0,400	0,158	0,185		0,28 (0,03-2,47) ¹ /2,93 (0,38-22,46) ² / 0,83 (0,17-3,96) ³
	Ile/Ile	0,000	0,000	0,000		0,28 (0,01-15,91) ¹ /5,00 (0,09-280,04) ² / 1,41 (0,03-74,18) ³
TLR 9 – 2848	A	0,800	0,375	0,565	5,52 ^{1*} / 1,00 ² / 2,73 ³	0,15 (0,03-0,83) ¹ /0,41 (0,07-2,47) ² / 0,46 (0,18-1,16) ³
	G	0,200	0,625	0,435		6,67 (1,21-36,74) ^{1*} /2,45 (0,40-14,85) ² / 2,17 (0,86-5,45) ³
	A/A	0,600	0,188	0,261	4,46 ^{1*} / 1,14 ² / 4,69 ^{3*}	0,15 (0,02-,37) ¹ /0,34 (0,04-2,61) ² / 0,65 (0,14-3,12) ³
	A/G	0,400	0,375	0,609		0,90 (0,12-7,03) ¹ /2,93 (0,38-22,46) ² / 0,39 (0,10-1,43) ³
	G/G	0,000	0,438	0,130		8,68* (0,41-183,24) ¹ /5,0 (0,09-280,0) ² / 5,19* (1,08-24,79) ³

Примечание: * – статистически значимые отличия по χ^2 (при $P<0,05$) и OR (95% CI) для больных БА: (χ^2)¹ и OR¹ (95% CI) 1-ой и 2-ой групп; (χ^2)² и OR² (95% CI) у больных 1-ой группы и доноров; (χ^2)³ и OR³ (95% CI) для доноров и больных 2-ой группы

Выводы

1. С ненаследственной формой бронхиальной астмы у жителей Республики Адыгея ассоциирован G/G генотип внутриклеточного TLR9. Asp299/299Gly, Thr399/399Ile аллельные варианты гена мембранного TLR4, A2848/2848G полиморфизмы гена внутриклеточного TLR9 не ассоциированы с наследственными формами.

2. «Мутантная» 2848G аллель и гомозиготный патологический генотип внутриклеточного TLR9 (A2848/2848G) повышают риск развития хронических воспалительных заболеваний легких в зрелом возрасте.

3. Прогностически неблагоприятным фактором развития бронхиальной астмы для жителей Республики Адыгея является сочетанное носительство Asp299/299Asp/Thr399/399Thr/G2848/2848G.

Примечания:

1. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / под ред. А.Г. Чучалина. М.: Атмосфера, 2007. 104 с.
2. Association of TLR4-T399I Polymorphism with Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Smokers / M. Speletas [et al.] // *Clinical and Developmental Immunology*. 2009. No. 1. P. 1-6.
3. Chen S. Association between the TLR4+896A>G (Asp299Gly) polymorphism and asthma: a systematic review and meta-analysis // *J. Asthma*. 2012. No. 49. P. 999-1003.
4. Ensembl (2013). Available at. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population (accessed June 2013).
5. HuGENavigator (2013). Available at. URL: <http://www.hugenavigator.net/HuGENavigator/geneProspector> (accessed June 2013).
6. Полиморфные варианты генов CARD15 и TLR4 при atopической бронхиальной астме / О.Е. Воронько [и др.] // *Молекулярная биология*. 2011. № 45. С. 831-839.
7. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms and susceptibility to asthma and allergic rhinitis: a case-control analysis / Y.M. Hussein [et al.] // *Cell Immunol*. 2012. No. 274. P. 34-38.
8. Disparity of innate immunity-related gene effects on asthma and allergy on Karelia / G. Zhang [et al.] // *Pediatr Allergy Immunol*. 2011. No. 22. P. 621-630.
9. Association of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the TLR9 gene with childhood atopic asthma / X.B. Qian [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2011. No. 28. P. 185-189.
10. Epistatic effect of TLR4 and IL4 genes on the risk of asthma in females / K. Adjers [et al.] // *Int Arch Allergy Immunol*. 2005. No. 138. P. 251-256.

References:

1. Global strategy of treatment and prevention of bronchial asthma / ed. by A.G. Chuchalin. M.: Atmosfera, 2007. 104 pp.
2. Association of TLR4-T399I Polymorphism with Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Smokers / M. Speletas [et al.] // *Clinical and Developmental Immunology*. 2009. No. 1. P. 1-6.
3. Chen S. Association between the TLR4+896A>G (Asp299Gly) polymorphism and asthma: a systematic review and meta-analysis // *J. Asthma*. 2012. No. 49. P. 999-1003.
4. Ensembl (2013). Available at. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population (accessed June 2013).
5. HuGENavigator (2013). Available at. URL: <http://www.hugenavigator.net/HuGENavigator/geneProspector> (accessed June 2013).
6. Polymorphic versions of genes of CARD15 and TLR4 of atopic bronchial asthma / O.E. Voronko [etc.] // *Molecular biology*. 2011. No. 45. P. 831-839.
7. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms and susceptibility to asthma and allergic rhinitis: a case-control analysis / Y.M. Hussein [et al.] // *Cell Immunol*. 2012. No. 274. P. 34-38.
8. Disparity of innate immunity-related gene effects on asthma and allergy on Karelia / G. Zhang [et al.] // *Pediatr Allergy Immunol*. 2011. No. 22. P. 621-630.
9. Association of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the TLR9 gene with childhood atopic asthma / X.B. Qian [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2011. No. 28. P. 185-189.
10. Epistatic effect of TLR4 and IL4 genes on the risk of asthma in females / K. Adjers [et al.] // *Int Arch Allergy Immunol*. 2005. No. 138. P. 251-256.