

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ TLRs И АССОЦИИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА *DEFB1* У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

М. А. Зайцева¹✉, Б. Г. Брагвадзе¹, О. А. Свитич^{1,2}, Л. С. Намазова-Баранова³, Л. В. Ганковская¹

¹ Кафедра иммунологии, медико-биологический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Лаборатория молекулярной иммунологии, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Москва

³ Научный центр здоровья детей, Москва

Бронхиальная астма (БА) — одно из наиболее распространенных заболеваний органов дыхания. Активно исследуется роль элементов врожденного иммунитета в патогенезе бронхиальной астмы, в частности, противомикробных пептидов. К ним относятся β-дефенсины, предотвращающие вторжение патогенов в слизистую оболочку респираторного тракта, наиболее активным из которых является β-дефенсин-1 (human beta defensin-1, HBD-1), кодируемый геном *DEFB1*. В исследовании была изучена ассоциация трех однонуклеотидных полиморфизмов в 5'-нетранслируемой области гена — *rs11362*, *rs1799946* и *rs1200972* — с бронхиальной астмой у детей. Также оценивали уровень экспрессии генов toll-подобных рецепторов *TLR2*, *TLR4* и *TLR9*. В опытную группу включили 48 пациентов в возрасте 3–7 лет с БА и 70 здоровых детей. Генотип AA полиморфизма *rs11362* и генотип CC полиморфизма *rs1799946* достоверно ассоциированы с заболеванием, а генотип GG полиморфизма *rs1799946* и генотип AA полиморфизма *rs1200972* являются протективными. Генотип AA полиморфизма *rs11362* также ассоциирован с пониженной экспрессией, а генотип AG — с повышенной экспрессией гена β-дефенсина-1 *DEFB1*. У детей с БА выявили повышение уровня экспрессии гена *TLR2* в сравнении с контрольной группой в 19,5 раз, *TLR9* — в 9,5 раз, *TLR4* — в 8,3 раза.

Ключевые слова: бронхиальная астма, β-дефенсин-1, toll-подобные рецепторы, *DEFB1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, однонуклеотидный полиморфизм, полиморфный маркер

✉ **Для корреспонденции:** Зайцева Маргарита Алексеевна
143090, Московская область, г. Краснознаменск, ул. Связистов, д. 10, кв. 68; astice@list.ru

Статья получена: 14.06.2016 Статья принята в печать: 23.06.2016

ANALYSIS OF TLRs GENES EXPRESSION AND *DEFB1* POLYMORPHISMS ASSOCIATION IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA

Zaitseva MA¹✉, Bragvadze BG¹, Svitch OA^{1,2}, Namazova-Baranova LS³, Gankovskaya LV¹

¹ Department of Immunology, Biomedical Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Laboratory of Molecular Immunology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

³ Scientific Center of Children's Health, Moscow, Russia

Bronchial asthma (BA) is one of the most common respiratory system diseases. The role of innate immunity components in the pathogenesis of bronchial asthma is studied widely, with particular focus on the antimicrobial peptides. Those include beta defensins that prevent pathogen intrusion into the respiratory tract mucosa, the most active of such pathogens being β-defensin-1 (human beta defensin-1, HBD-1) encoded by the *DEFB1* gene. We studied the association of three single nucleotide polymorphisms in the 5'- untranslated region of the gene, namely, *rs11362*, *rs1799946* and *rs1200972*, with bronchial asthma in children. We also evaluated gene expression of toll-like receptors *TLR2*, *TLR4* and *TLR9*. The experimental group included 48 patients of 3 to 7 years of age with BA and 70 healthy children. The AA genotype of the *rs11362* polymorphism and the CC genotype of the *rs1799946* polymorphism were reliably associated with the disease, while the GG genotype of the *rs1799946* polymorphism and the AA genotype of the *rs1200972* polymorphism were found protective. Also, the AA genotype of the *rs11362* polymorphism was associated with the reduced expression of *DEFB1*, the human beta defensin-1 encoding gene, while the AG genotype was associated with its increased expression. In children with BA, *TLR2* expression increased 19.5 times in comparison with the controls; *TLR9* expression increased 9.5 times, while *TLR4* expression increased 8.3 times.

Keywords: bronchial asthma, human beta defensin-1, toll-like receptors, *DEFB1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, single nucleotide polymorphism, polymorphic marker

✉ **Correspondence should be addressed:** Margarita Zaitseva
ul. Svyazistov, d.10, kv. 68, Krasnoznamenensk, Moscow oblast, Russia, 143090; astice@list.ru

Received: 14.06.2016 Accepted: 23.06.2016

Бронхиальная астма (БА) — это хроническое воспалительное заболевание верхних дыхательных путей, которое сопровождается обструкцией бронхов и их гиперреактивностью и проявляется эпизодами затруднения дыхания, хрипов, кашля, приступами удушья. Относится к числу патологий с высоким темпом роста заболеваемости, особенно в экономически развитых странах. По данным Российского респираторного общества, на сегодняшний день количество больных БА в России приближается к 10 млн человек, при этом доля детей среди них составляет более 20 % [1].

Замечено, что больные БА тяжелее переносят заболевания, вызванные респираторными инфекциями, нежели здоровые люди [2, 3]. С острыми респираторными инфекциями верхних дыхательных путей связана высокая частота обострений БА: около 85 % обострений у детей и 50 % — у взрослых вызываются именно респираторными вирусами [2]. Возбудители повреждают мерцательный эпителий слизистой оболочки дыхательного тракта, тем самым увеличивая ее проницаемость для аллергенов и токсических веществ и усиливая бронхиальную гиперреактивность. Тяжелое обострение может угрожать жизни больного, причем оно может развиваться при БА любой степени [3].

Многие современные исследования посвящены углубленному изучению патогенеза БА, в частности, роли элементов врожденного иммунитета. Активно изучают новый класс эффекторных молекул — противомикробные пептиды, к которым относятся β -дефенсины. Противомикробные свойства последних обусловлены электростатическим взаимодействием между отрицательно заряженными поверхностными компонентами бактериальной мембраны, такими как липополисахариды грамотрицательных бактерий и тейхоевые и липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий, и положительно заряженной молекулой β -дефенсина. При критической концентрации β -дефенсинов на поверхности клетки-мишени в ее мембране образуются поры и происходит лизис клетки. Кроме того, β -дефенсины обладают иммунорегуляторной активностью: участвуют в хемотаксисе, индукции адаптивного иммунитета, созревании дендритных клеток и пр. [4].

Наиболее важную роль в защите слизистых оболочек респираторного тракта играет β -дефенсин-1 (human beta defensin-1, HBD-1), конститутивно синтезируемый эпителиальными клетками [5]. β -дефенсин-1 кодируется геном *DEFB1*, который расположен на коротком плече хромосомы 8 (8p23.1) в высокополиморфном кластере. Мутации в гене могут снижать его экспрессию, а недостаточная секреция β -дефенсинов вызывает ассоциированное прилипание и инвазию бактерий в слизистую и начало воспаления [6, 7].

Другой важный элемент врожденного иммунитета — toll-подобные рецепторы (toll-like receptors, TLRs) эпителиальных клеток слизистой оболочки дыхательных путей, которые распознают патоген-ассоциированные молекулярные структуры (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, передают сигнал внутрь клетки и вызывают повышение функциональной активности лейкоцитов, а также экспрессию генов провоспалительных цитокинов и интерферонов. Наиболее широкий спектр бактериальных и вирусных патогенов распознается TLR2, TLR4, TLR9, которые могут активировать врожденный иммунитет локально, на уровне слизистых оболочек дыхательных путей.

Целью работы являлась комплексная оценка показа-

телей врожденного иммунитета — уровней экспрессии генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *DEFB1*, а также изучение ассоциации некоторых однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP), локализованных в 5'-нетранслируемой области гена *DEFB1*, с бронхиальной астмой у детей. В качестве маркеров интереса выбрали три SNP: *rs1799946*, *rs1800972* и *rs11362*. Установлено, что они ассоциированы с ВИЧ-инфекцией, инфекциями, вызываемыми *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* и другими микроорганизмами, развитием сепсиса [8, 9], однако данные об их ассоциации с аллергическими заболеваниями отсутствуют.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие пациенты отделения восстановительного лечения детей с аллергическими заболеваниями и заболеваниями органов дыхания Научного центра здоровья детей (г. Москва): 48 детей в возрасте 3–7 лет с бронхиальной астмой. В контрольную группу включили 70 детей без заболеваний органов дыхания, инфекционно-воспалительных и аллергических заболеваний. В качестве клинического материала использовали соскобы со слизистой оболочки полости носа, взятые в период обострения БА на фоне острого респираторного заболевания.

Для исследования полиморфизмов гена *DEFB1* ДНК из клинического материала выделяли с использованием набора «АмплиПРАЙМ Рибо-сорб» («ИнтерЛабСервис», Россия) и ставили полимеразную цепную реакцию «в реальном времени» (ПЦР-РВ) с использованием набора «ПЦР-комплект» (в присутствии красителя SYBR Green I) («Синтол», Россия). Статистическую обработку данных проводили в MO Excel 2007 со статистическим пакетом Statistica 10.0 (StatSoft, США). Рассчитывали критерий согласия Пирсона и Odd Ratio (OR >1 — ассоциация генотипа с БА, OR <1 — протективный в отношении БА генотип) [10].

Уровень экспрессии генов *DEFB1*, *TLR2*, *TLR4* и *TLR9* исследовали относительно уровня экспрессии гена β -актина. РНК выделяли из клинического материала с использованием набора «АмплиПРАЙМ Рибо-сорб», проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора «ОТ-1» («Синтол») и ставили ПЦР-РВ с использованием набора «ПЦР-комплект» (в присутствии красителя SYBR Green I). При статистической обработке данных использовали критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Исследование было одобрено этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова. Родители подписали информированное согласие на участие детей в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Распределение частот генотипов полиморфных маркеров *rs1799946*, *rs1800972* и *rs11362* гена *DEFB1* показало, что с риском развития бронхиальной астмы у детей ассоциированы генотипы AA маркера *rs11362* и CC маркера *rs1799946*, а генотипы GG и AA маркеров *rs1799946* и *rs1200972* соответственно являются протективными (рис. 1). Характер распределения частот аллелей гена *DEFB1* в обеих группах был сходным.

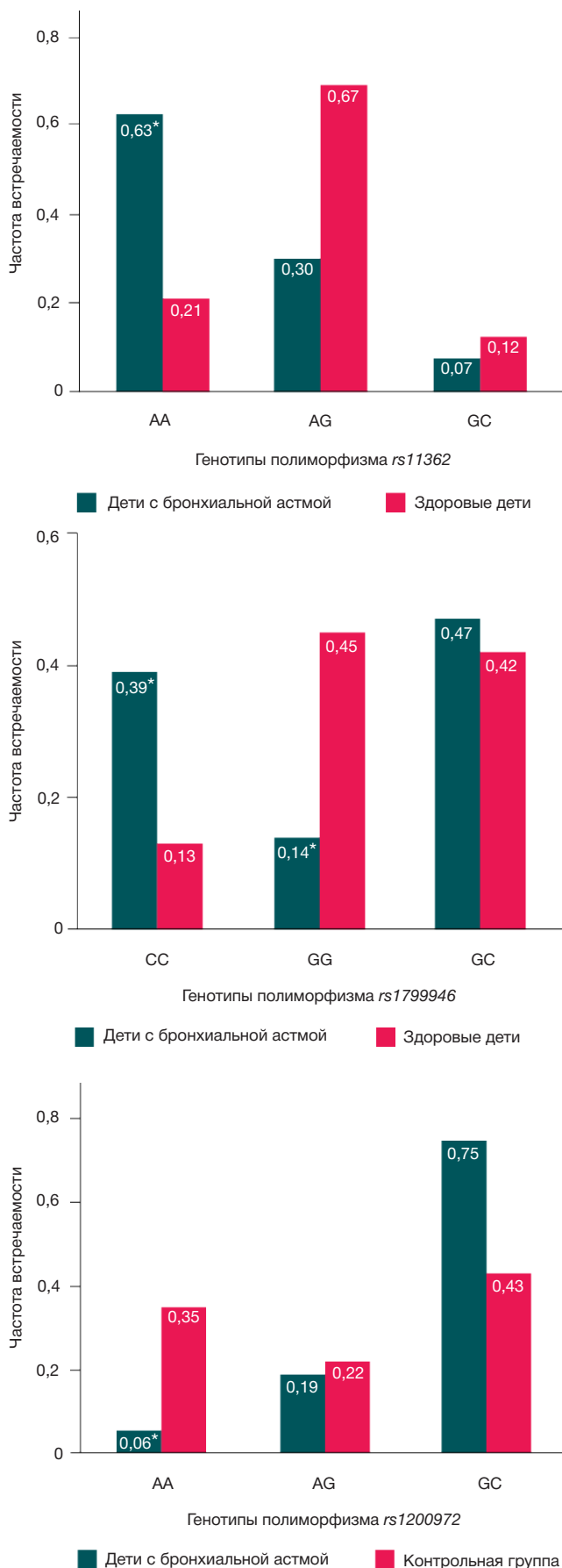


Рис. 1. Распределение частот генотипов однонуклеотидных полиморфизмов rs11362, rs1799946 и rs1200972 в гене DEFB1 у детей с бронхиальной астмой (* — $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой)

Уровень экспрессии гена *DEFB1* у больных детей был в 3,5 раза ниже, чем у здоровых (рис. 2). Однонуклеотидная замена в промоторной области гена может повлиять на эффективность его транскрипции гена и количество синтезируемого белка. Мы разделили пациентов опытной группы на три подгруппы в соответствии с уровнями экспрессии гена β -дефенсина-1: с низкими (выше уровня экспрессии гена β -актина менее чем в 10 тыс. раз), средними (выше уровня экспрессии гена β -актина в 10–30 тыс. раз) и высокими (выше уровня экспрессии гена β -актина более чем в 30 тыс. раз). Было установлено, что генотип AG маркера rs11362 ассоциирован с увеличением уровня экспрессии β -дефенсина-1 в эпителиальных клетках. Так, частота генотипа AG в группах пациентов с высоким и низким уровнями экспрессии гена *DEFB1* составила 0,67 и 0,30 соответственно. Генотип AA ассоциирован с пониженной экспрессией гена дефенсина. Другие генотипы выбранных маркеров не ассоциированы с изменением уровня экспрессии гена дефенсина в исследованной нами группе.

У больных бронхиальной астмой выявили повышение уровня экспрессии гена *TLR2* в сравнении с контрольной группой в 19,5 раз, *TLR9* — в 9,5 раз, *TLR4* — в 8,3 раза. Результаты представлены в таблице.

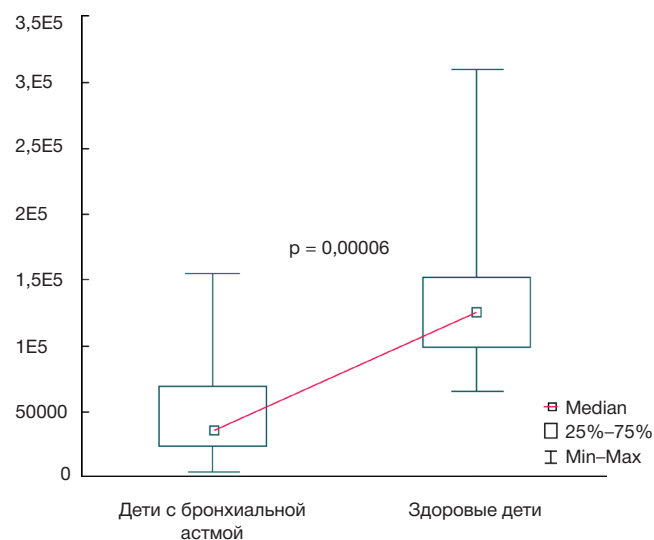


Рис. 2. Уровень экспрессии гена DEFB1 в эпителии слизистой носа у детей с бронхиальной астмой и здоровых детей (относительно уровня экспрессии гена β -актина)

Уровни экспрессии генов *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* и *DEFB1* в эпителии слизистой носа у детей с бронхиальной астмой и здоровых детей

Ген	Дети с бронхиальной астмой	Здоровые дети
<i>TLR2</i>	130 000 (27 000; 270 000)	6 500 (5 000; 7 000)
<i>TLR4</i>	150 (30; 450)	18 (17; 120)
<i>TLR9</i>	30 000 (5 000; 50 000)	3 300 (3 000; 4 500)
<i>DEFB1</i>	35 000 (25 000; 68 000)	125 000 (100 000; 150 000)

Примечание: данные представлены в виде медианы (25%; 75%) в копиях кДНК на 1 млн копий кДНК β -актина, $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты могут указывать на то, что развитие хронического воспаления слизистой бронхов у детей с бронхиальной астмой отчасти обуславливается мутациями в 5'-нетранслируемой области гена *DEFB1*. На основании полученных данных об уровнях экспрессии генов *DEFB1* и *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* была выдвинута гипотеза о роли β -дефенсина-1 в патогенезе БА. Противомикробные пептиды, продуцируемые эпителием слизистой оболочки респираторного тракта, предотвращают вторжение патогенов в слизистую. Однако если продукция противомикробных пептидов снижена, а бактериальная нагрузка увеличена, то патогены распознаются TLRs эпителиальных клеток, и запускается каскад провоспалительных реакций, в том числе индукция синтеза интерлейкинов (IL-1 β , IL-6, IL-12), интерферона α , интерферона β и хемокинов. Кроме того, через активацию эпителиальных TLRs индуцируется выработка тимусного стромального лимфопоэтина (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) и интерлейкина IL-33, которые взаимодействуют с дендритными клетками, увеличивают активность костимулирующих молекул CD40, CD80 и направляют дифференцировку клеток Th0 в Th2, а также напрямую взаимодействуют с тучными клетками, вызывая их дегрануляцию [11, 12]. Это приводит к развитию хронической воспалительной реакции (рис. 3).

ВЫВОДЫ

Генотип AA полиморфизма *rs11362* и генотип CC полиморфизма *rs1799946*, расположенных в 5'-нетранслируемой области гена *DEFB1*, достоверно ассоциированы с бронхиальной астмой у детей. Генотип GG полиморфизма *rs1799946* и генотип AA полиморфизма *rs120097* являются протективными. Генотип AA полиморфизма *rs11362* также ассоциирован с пониженной экспрессией, а генотип AG — с повышенной экспрессией гена β -дефенсина-1 *DEFB1*. Таким образом, некоторые мутации в гене *DEFB1* приводят к возникновению дисбаланса в системе врожденного иммунитета на уровне слизистой оболочки полости носа, который становится причиной частых обострений БА на фоне респираторных инфекций.

Литература

1. Чучалин А. Г., Оспельникова Т. П., Осипова Г. Л., Лизогуб Н. В., Гервазиева В. Б., Кривицкая В. З. и др. Роль респираторных инфекций в обострениях бронхиальной астмы. Пульмонология. 2007; (5): 32–4.
2. Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, et al. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. J Exp Med. 2005 Mar 21; 201 (6): 937–47.
3. Cirillo I, Marseglia G, Klersy C, Ciprandi G. Allergic patients have more numerous and prolonged respiratory infections than nonallergic subjects. Allergy. 2007 Sep. 62 (9): 1087–90.
4. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Мешкова Р. Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. с. 148–65.
5. Свитич О. А., Ганковская Л. В., Рахманова И. В., Зайцева И. А., Ганковский В. А. Ассоциация полиморфных маркеров, локализованных в 5'-нетранслируемой области гена β -дефенсина *DEFB1*, с гипертрофией аденоидных вегетаций. Вестн. РГМУ. 2012; (3): 59–62.
6. Noutsios GT, Floros J. Childhood asthma: causes, risks, and protective factors; a role of innate immunity. Swiss Med Wkly. 2014 Dec 24; 144: w14036.
7. Arslan F, Babakurban ST, Erbek SS, Sahin FI, Terzi YK. Chronic tonsillitis is not associated with beta defensin 1 gene polymorphisms in Turkish population. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2015 Apr; 79 (4): 557–60. doi: 10.1016/j.ijporl.2015.01.028. Epub 2015 Jan 30.
8. Milanese M, Segat L, Pontillo A, Arraes LC, de Lima Filho JL, Crovella S. *DEFB1* gene polymorphisms and increased risk of HIV-1 infection in Brazilian children. AIDS. 2006 Aug 1; 20 (12): 1673–5.
9. Ганковская О. А., Бахарева И. В., Ганковская Л. В., Зверев В. В. Ассоциация полиморфных маркеров G(-20)A, C(-44)G и G(-52)A гена *DEFB1* с развитием преждевременных родов и внутриутробным инфицированием плода. Рос. иммунол. журн. 2011; 5 (1): 26–33.
10. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.

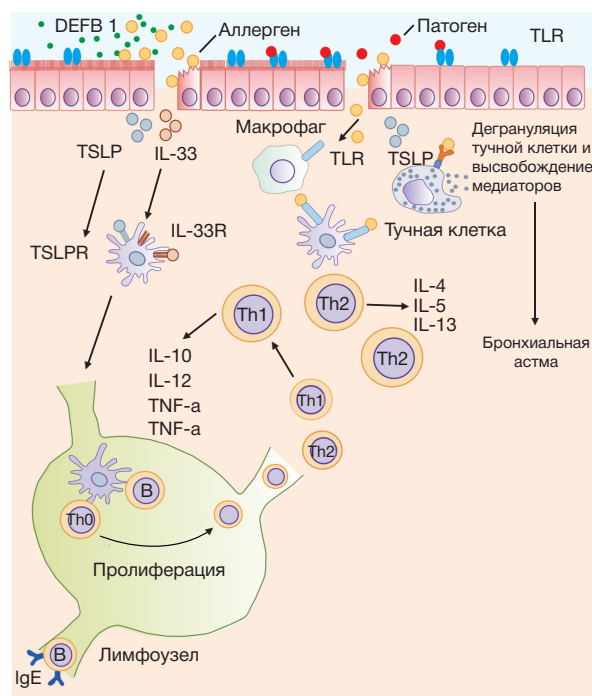


Рис. 3. Механизм развития хронической воспалительной реакции при бронхиальной астме

При первичном контакте слизистой с аллергеном нарушается эпителиальный барьер. Это приводит к продукции эпителиальными клетками таких цитокинов, как TSLP, IL-25 и IL-33. При повторном контакте с аллергеном в присутствии цитокинов индуцируется созревание дендритных клеток (ДК) и их миграция в лимфатические узлы, где ДК передают информацию об аллергене Т-хелперам Th0 с участием молекул главного комплекса гистосовместимости (MHC-II), инициируя их пролиферацию и дифференцировку в Th-2. Активированные алергенспецифичные Th-2 продуцируют широкий спектр цитокинов: IL-4 (усиление пролиферации В-лимфоцитов, ростовой и дифференцировочный фактор В-лимфоцитов, переключение изотипа В-клеток на синтез иммуноглобулинов IgE), IL-5 (стимуляция пролиферации эозинофилов и высвобождения ими основного белка), IL-9 (активация тучных клеток). Алергенспецифичные IgE-антитела связываются с высокоаффинными рецепторами (FcεR1) на тучных клетках и базофилах и с низкоаффинными рецепторами (FcεR2) на эозинофилах и макрофагах. При повторном поступлении аллергенов в организм происходит их связывание с молекулами IgE, расположенными на мембранах тучных клеток, что обуславливает дегрануляцию этих клеток. При повышенной бактериальной нагрузке не все патогены элиминируются противомикробными пептидами. Часть из них распознается TLRs эпителия респираторного тракта, что приводит к поддержанию воспалительного процесса в бронхах.

11. Spann KM, Baturcam E, Schagen J, Jones C, Straub CP, Preston FM, et al. Viral and host factors determine innate immune responses in airway epithelial cells from children with wheeze and

atopy. *Thorax*. 2014 Oct. 69 (10): 918–25.

12. Islam SA, Luster AD. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med*. 2012 May 4; 18 (5): 705–15.

References

1. Chuchalin AG, Ospel'nikova TP, Osipova GL, Lizogub NV, Gervazieva VB, Krivitskaya VZ, et al. Rol' respiratornykh infektsii v obostreniyakh bronkhial'noi astmy. *Pul'monologiya*. 2007; (5): 32–4. Russian.
2. Wark RA, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, et al. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med*. 2005 Mar 21; 201 (6): 937–47.
3. Cirillo I, Marseglia G, Klersy C, Ciprandi G. Allergic patients have more numerous and prolonged respiratory infections than nonallergic subjects. *Allergy*. 2007 Sep. 62 (9): 1087–90.
4. Koval'chuk LV, Gankovskaya LV, Meshkova RYa. *Klinicheskaya immunologiya i allergologiya s osnovami obshchei immunologii*. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. p. 148–65. Russian.
5. Svitich OA, Gankovskaya LV, Rakhmanova IV, Zaitseva IA, Gankovskii VA. Assotsiatsiya polimorfnykh markerov, lokalizovannykh v 5'-netransliruemoi oblasti gena β -defensina DEFB1, s gipertrofiei adenoidnykh vegetatsii. *Vestnik RGMU*. 2012; (3): 59–62. Russian.
6. Noutsios GT, Floros J. Childhood asthma: causes, risks, and protective factors; a role of innate immunity. *Swiss Med Wkly*. 2014 Dec 24; 144: w14036.
7. Arslan F, Babakurban ST, Erbek SS, Sahin FI, Terzi YK. Chronic tonsillitis is not associated with beta defensin 1 gene polymorphisms in Turkish population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2015 Apr; 79 (4): 557–60. doi: 10.1016/j.ijporl.2015.01.028. Epub 2015 Jan 30.
8. Milanese M, Segat L, Pontillo A, Arraes LC, de Lima Filho JL, Crovella S. DEFB1 gene polymorphisms and increased risk of HIV-1 infection in Brazilian children. *AIDS*. 2006 Aug 1; 20 (12): 1673–5.
9. Gankovskaya OA, Bakhareva IV, Gankovskaya LV, Zverev VV. Assotsiatsiya polimorfnykh markerov G(-20)A, C(-44)G i G(-52)A gena DEFB1 s razvitiem prezhdevremennykh rodov i vnutriutrobnym infitsirovaniem ploda. *Russ J Immunol*. 2011; 5 (1): 26–33. Russian.
10. Glantz S. [Primer of biostatistics]. Moscow: Praktika, 1999. 459 p. Russian.
11. Spann KM, Baturcam E, Schagen J, Jones C, Straub CP, Preston FM, et al. Viral and host factors determine innate immune responses in airway epithelial cells from children with wheeze and atopy. *Thorax*. 2014 Oct. 69 (10): 918–25.
12. Islam SA, Luster AD. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med*. 2012 May 4; 18 (5): 705–15.