

УДК 616.248-07-477.75+575.22

© Ю.А. Бисюк, В. А. Белоглазов, А. И. Дубовой, 2013.

## C159T ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА РЕЦЕПТОРА CD14 У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ПОПУЛЯЦИИ КРЫМА

Ю.А. Бисюк, В. А. Белоглазов, А. И. Дубовой

*Кафедра внутренней медицины № 2 (зав. кафедрой – проф. В. А. Белоглазов), Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского», г. Симферополь.*

### THE C159T POLYMORPHISM IN THE GENE OF CD14 RECEPTOR IN ADULT PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA IN THE CRIMEA POPULATION

Yu. A. Bisyuk, V. A. Beloglazov, A. I. Dubovoy

#### SUMMARY

The gene polymorphism of CD14 (C159T) receptor has been researched in 331 patients with asthma and 285 healthy individuals of Crimea. It was analyzed by the allele-specific polymerase chain reaction with electrophoretic detection. In the control group, the frequency of CC genotype was 34%, CT – 51%, TT – 15%, which did not differ significantly ( $P = 0.657$ ) from what was observed in patients with asthma (CC was 32%, CT – 51%, TT – 17%). The results have shown that the polymorphism of CD14 (C159T) receptor is not associated with the risk of asthma in the Crimea population.

### C159T ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНУ РЕЦЕПТОРА CD14 У ДОРΟΣЛИХ ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ В ПОПУЛЯЦІЇ КРИМУ

Ю. А. Бісюк, В. О. Білоглазов, А. І. Дубовий

#### РЕЗЮМЕ

Вивчено поліморфізм гену рецептора CD14 (C159T) у 331 хворих на БА і 285 практично здорових осіб Криму. Для аналізу поліморфізму гену CD14 (C159T) був використаний метод алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції з електрофоретичною детекцією. У контрольній групі частота генотипу CC складала 34%, СТ – 51%, ТТ – 15%, що достовірно не відрізнялося ( $P = 0,657$ ) від хворих на астму (CC – 32%, СТ – 51%, ТТ – 17%). Результати дослідження показали, що поліморфізм рецептора CD14 (C159T) не пов'язаний з ризиком розвитку бронхіальної астми в популяції Криму.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, эндотоксин, полиморфизм рецептора CD14 (C159T).

Сегодня насчитывается около 300 миллионов больных бронхиальной астмой (БА), и к 2025 г. этот показатель может составить 400 миллионов [GINA, 2012]. В Украине около 200 тысяч взрослых больных страдают бронхиальной астмой, ежегодно диагностируется около девяти тысяч новых случаев заболевания. По данным 2012 г., распространенность астмы составила 520 больных на 100 тысяч взрослого населения [МОЗ Украины, 2013].

Увеличение заболеваемости БА за последние десятилетия объясняется не только генетической детерминированностью, но и воздействием различных факторов окружающей среды. Одной из наиболее дискутируемой теорий, объясняющих увеличение аллергических заболеваний, является «гигиеническая»; она была впервые описана David P. Strachan в 1989 г. [1] По наблюдениям данного автора, количество больных с сенной лихорадкой и контактным дерматитом было значительно меньше у детей в больших семьях. Эти явления были объяснены повышенным контактом детей с микроорганизмами окружающей среды, что имеет важное значение в формировании иммунного ответа.

Последующие исследования в данной области объяснили «гигиеническую» теорию чрезмерным влиянием инфекционных агентов на модификацию иммунного ответа посредством активации Т-хелперов 1 типа и угнетением Т-хелперов 2. Другими словами, «стерильные» условия созревания иммунной системы у детей приводят к выживанию фетальных Т-хелперов 2 типа, которые вызывают повышение синтеза IgE [2].

Одним из наиболее сильных факторов, приводящих к активации Т-хелперов 1 типа, является эндотоксин (ЭТ) грамотрицательных бактерий. Эндотоксин или липополисахарид (ЛПС) при попадании в организм связывается со специфическим белком LBP (Lipopolysaccharide binding protein) с последующим присоединением к рецепторам CD14 и TLR-4 на поверхности моноцитов, макрофагов и гранулоцитов. Активация данных рецепторов приводит к синтезу провоспалительных цитокинов, в микроокружении которых наивные Т-хелперы трансформируются в Т-хелперы 1 типа [3].

По данным некоторых авторов [4], чрезмерная экспозиция эндотоксина обладает протективными

эффектами на развитие аллергии, другие авторы указывают на отсутствие такого эффекта [5], что, возможно, связано с полиморфизмом генов, кодирующих рецепторы к эндотоксину.

Ген, кодирующий CD14 рецептор, локализован в длинном плече 5 хромосомы в близости к локусу 5q31-q33, в котором находятся гены, ответственные за синтез IgE [6].

Наиболее часто изучаемым полиморфизмом гена рецептора CD14 является 159 позиция промоторного участка с замещением цитозина (C-cytosine) на тимин (T-Thymine) и присутствием в популяции гомозигот по цитозину и тимину (CC, TT) и гетерозиготы цитозин-тимин (CT).

Присутствие С аллеля в 159 позиции промоторного участка гена CD14 рецептора коррелирует с увеличением уровня IgE, при этом TT генотип не связан с атопией и сопровождается возрастанием концентрации растворимой формы CD14 рецептора (sCD14). [7]

Исследователи из Чехии [8], Кореи [9], Китая [10], Австралии [11] и Германии [12] установили, что полиморфизм C159T не связан с развитием БА, а популяционные исследования в Бразилии [13], Тунисе [14], Пакистане [15] и Польше [16] показали зависимость данного полиморфизма и бронхиальной астмы.

В популяции Крыма исследований по изучению полиморфизма гена рецептора CD14 (C159T) и его связи с пенитрацией астмы не проводилось.

В связи с этим, целью данного исследования стало изучение наличия ассоциации между полиморфизмом гена рецептора CD14 (C159T) и развитием бронхиальной астмы в популяции Крыма.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования полиморфизма гена рецептора CD14 (C159T) в популяции Крыма принимали участие только те пациенты и добровольцы, которые родились в данном регионе.

В исследования был включён 331 больной с БА. Диагноз и лечение бронхиальной астмы проводились в соответствии с критериями действующего приказа МЗ Украины № 128 от 19.03.2007 г.

Группу контроля составили 285 практически здоровых лиц Крыма. Все волонтеры исследовались на предмет аллергической патологии посредством изучения анамнеза и проведения кожных алерго-тестов. Для проведения кожных «прик» тестов использовали алергенны производства «Иммунолог», г. Винница.

Для анализа полиморфизма гена CD14 (C159T) 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», РФ)

согласно инструкции производителя. Из полученной крови после её перемешивания отбиралось 1000 мкл крови в чистые пробирки типа Eppendorf объёмом 1,5 мл. Затем проводилось центрифугирование крови при 2400 об/мин на центрифуге-вортексе (Микроспин FV-2400, Латвия) в течение 5 минут. Плазма удалялась так, чтоб кольцо лейкоцитов оставалось интактным. Образцы помещались в морозильную камеру при -18 °С для полной заморозки. После заморозки при комнатной температуре в каждую пробирку добавлялся реагент «ДНК-экспресс кровь» (производства «Литех», РФ) в количестве 550 мкл. После перемешивания на вортексе пробирки помещались в твердотельный термостат (Thermo Block TDB-120, Латвия) при 99 °С на 15 минут. Затем пробирки со смесью загружались в высокооборотную центрифугу (THERMO Fresco 17, США) и откручивались при 12000 об/мин в течение 15 секунд. Супернатант переносили в отдельные пробирки и использовали в качестве образца ДНК.

Постановка аллель-специфической ПЦР осуществлялась с помощью наборов «Мутация антигена дифференцировки моноцитов C-159T» («Литех», РФ) согласно инструкции производителя. Для приготовления рабочей смеси из расчёта на одну пробу в чистые пробирки типа «Eppendorf» объёмом 1,5 мл вносили 17,5 мкл разбавителя, 2,5 мкл реакционной смеси и 0,2 мкл Taq-полимеразы. Готовили две рабочие смеси – для аллеля 1 и аллеля 2. Затем в пробирки типа «Eppendorf» объёмом 0,2 мл вносили 20 мкл рабочей смеси из расчёта 2 пробирки (с аллелем 1 и 2) на каждый образец ДНК. Сверху добавляли 25 мкл минерального масла и под слой масла вносили 5 мкл ДНК, полученной на предыдущем этапе. После этого пробирки закрывали, центрифугировали 10 секунд при 2400 об./мин., помещали в программируемый термостат (Eppendorf Mastercycler Personal, Германия) и проводили амплификацию по следующей программе: прогрев амплификатора до 94 °С, загрузка в него образцов в режиме «ПАУЗА», 1 цикл при 94 °С 1 минута – начальная денатурация, 35 циклов при 94 °С 10 секунд – денатурация ДНК, 35 циклов при 64 °С 10 секунд – отжиг праймеров, 35 циклов при 72 °С 20 секунд – элонгация, 1 цикл при 72 °С 1 минута – финальная элонгация, охлаждение до 10 °С. Детекция продуктов амплификации осуществлялась после разделения методом горизонтального электрофореза с помощью набора «Комплект № 2 (3%) для электрофоретической детекции» («Литех», РФ). Готовые пластики геля 3% агарозы помещались в камеру для электрофореза и заливались ТАЕ буфером. Электрофорез проводился при напряжении 150 В по направлению от катода к аноду в течение 17 минут. После этого пластинка геля помещалась на стекло трансиллюминатора (Vilber Lourmat, Франция), где визуализировались полосы амплификации при дли-

не волны 312 нм. Фореграмма фиксировалась цифровой камерой Panasonic.

Все полученные результаты подвергнуты статистической обработке для параметрических и непараметрических критериев с использованием программы «MedStat» (серийный №MS0011) ДНПП ООО «Альфа», г. Донецк. При анализе проверки распределения на нормальность использовали Хи-квадрат и тест Колмогорова-Смирнова, сравнение центральных тенденций двух независимых выборок с использованием U-критерия Манна-Уитни и сравнение средних двух независимых выборок по критерию Стьюдента. Для установления распределения генотипов соответственно закону Харди-Вайнберга использовали точный тест Фишера и  $\chi^2$ . Для определения разницы в частоте генотипов и аллелей контроля и больных с бронхиальной астмой была использована логистическая регрессия с помощью on-line калькулятора (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Для всех пациентов и волонтеров получено добровольное письменное согласие на участие в на-

учном исследовании, на которое есть разрешение комиссии по биоэтике ГУ «КГМУ имени С.И. Георгиевского».

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Количественные переменные в исследуемых группах не отличались от нормального распределения. Для данных показателей использовались параметрические методы статистического анализа с представлением данных в виде среднего значения и среднеквадратического отклонения. Средний возраст больных с астмой ( $51,1 \pm 10,6$  лет) и волонтеров ( $50,7 \pm 10,2$  лет) достоверно не отличался ( $P=0,099$ ). Продолжительность заболевания составила  $18,71 \pm 11,68$  лет, с появлением первых эпизодов астмы в среднем после 30 лет ( $33,4 \pm 9,9$  лет). Количество женщин и мужчин среди больных с астмой и контроля достоверно не отличалось ( $\chi^2=0,021$ ,  $P=0,088$ ).

Различия в частоте генотипов и аллелей здоровых волонтеров и больных с бронхиальной астмой в популяции Крыма представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Частота распределение генотипов CD14 (C159T) рецептора у больных бронхиальной астмой и здоровых волонтеров**

Показатели	Контроль, n (%)	Астма, n (%)	ОШ, ДИ, $\chi^2$ , P
<b>Распределение генотипов</b>			
CC	97 (34%)	105 (32%)	$\chi^2= 0,839$ , $P=0,657$
CT	146 (51%)	169(51%)	
TT	42 (15%)	57 (17%)	
<b>Доминантная модель ([CC]&lt;-&gt;[CT+TT])</b>			
CC	97 (34%)	105 (32%)	ОШ=1,111, ДИ=[0,793-1,556] $\chi^2=0,37$ , $p=0,542$
CT+TT	188 (66%)	226 (68%)	
<b>Рецессивная модель ([CC+CT]&lt;-&gt;[TT])</b>			
CC+CT	243 (85%)	274 (83%)	ОШ=0,831, ДИ=[0,538-1,283] $\chi^2=0,70$ , $p=0,403$
TT	42 (15%)	57 (17%)	
<b>Разница частот аллелей</b>			
C	340 (60%)	379 (57%)	[C]<->[T] ОШ=1,104, ДИ=[0,879-1,386] $\chi^2=0,72$ , $p=0,395$
T	230 (40%)	283 (43%)	[T]<->[C] ОШ=0,906, ДИ=[0,722-1,137] $\chi^2=0,72$ , $p=0,395$

Примечание: ОШ – отношение шансов, ДИ – 95% доверительный интервал, P – достоверность различий.

В контрольной группе (Таблица 1) частота генотипа CC составила 34%, CT – 51%, TT – 15%, что достоверно не отличалось ( $\chi^2= 0,839$ ,  $P=0,657$ ) от больных с астмой (CC – 32%, CT – 51%, TT – 17%). Анализ сравнения частот распределения генотипов при использовании доминантной и рецессивной модели также не выявил достоверных отличий ( $p=0,542$  – доминантная модель,  $p=0,403$  – рецессивная модель). При сравнении частот аллелей C и T отношения шансов достоверно не отличались ( $p=0,395$ ) у

пациентов с астмой и контролем.

Таким образом, полученные результаты исследования показали, что полиморфизм рецептора CD14 (C159T) не связан с риском развития бронхиальной астмы в популяции Крыма.

В недавно проведенном мета-анализе также не было выявлено ассоциации между полиморфизмом CD14 (C159T) рецептора и бронхиальной астмой [17]. Однако, при стратификации пациентов с астмой на атопический и неатопический фенотип было

показано, что генотип ТТ на 33% и СТ на 20% меньше связан с развитием атопической астмой по сравнению с СС генотипом.

Очевидно, что для выяснения роли полиморфизма данного рецептора необходимо провести дополнительный анализ с учётом фенотипов и эндотипов бронхиальной астмы.

#### ВЫВОДЫ

У пациентов с бронхиальной астмой и здоровых лиц в популяции Крыма частота встречаемости аллелей цитозина и тимина в 159 позиции промоторного участка гена CD14 рецептора не отличается. Полиморфизм рецептора CD14 (C159T) не связан с риском развития бронхиальной астмы в популяции Крыма.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Strachan D. P. Hay fever, hygiene, and household size. / D. P. Strachan // *BMJ: British Medical Journal*. – 1989. – Vol. 299, No. 6710. – P. 1259-1260.
2. Leynaert B. Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood? / B. Leynaert, C. Neukirch, D. Jarvis [et al.] // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 2001. – Vol. 164, No. 10. – P. 1829-1834.
3. Celedon J. C. Exposure to dust mite allergen and endotoxin in early life and asthma and atopy in childhood. / J. C. Celedon, D. K. Milton, C. D. Ramsey [et al.] // *Journal of allergy and clinical immunology*. – 2007. – Vol. 120, No. 1. – P. 144-149.
4. Douwes J. Does environmental endotoxin exposure prevent asthma? / J. Douwes, N. Pearce, D. Heederik // *Thorax*. – 2002. – Vol. 57, No. 1. – P. 86-90.
5. Portengen L. Endotoxin exposure and atopic sensitization in adult pig farmers. / L. Portengen, L. Preller, M. Tielen [et al.] // *Journal of allergy and clinical immunology*. – 2005. – Vol. 115, No. 4. – P. 797-802.
6. Brass D. M. CD14 is an essential mediator of LPS-induced airway disease. / D. M. Brass, J. W. Hollingsworth, E. McElvania-Tekippe [et al.] // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2007. – Vol. 293, No. 1. – P. 77-83.
7. Baldini M. A polymorphism\* in the 5 flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. / M. Baldini, I. Carla Lohman, M. Halonen [et al.] // *American journal of respiratory cell and molecular biology*. – 1999. – Vol. 20, No. 5. – P. 976-983.
8. Buckova D. Two CD14 promoter polymorphisms and atopic phenotypes in Czech patients with IgE-mediated allergy. / D. Buckova, L. I. Holla, M. Schuller [et al.] // *Allergy*. – 2003. – Vol. 58, No. 10. – P. 1023-1026.
9. Hong S.-J. TNF- $\beta$  (?308 g/a) and CD14 (?159T/C) polymorphisms in the bronchial responsiveness of Korean children with asthma. / S.-J. Hong, H.-B. Kim, M.-J. Kang [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2007. – Vol. 119, No. 2. – P. 398-404.
10. Liang X. H. CD14 promoter polymorphisms have no functional significance and are not associated with atopic phenotypes. / X. H. Liang, W. Cheung, C. K. Heng [et al.] // *Pharmacogenetics and genomics*. – 2006. – Vol. 16, No. 4. – P. 229-236.
11. Kedda M. A. The CD14 C-159T polymorphism is not associated with asthma or asthma severity in an Australian adult population. / M. A. Kedda, F. Lose, D. Duffy [et al.] // *Thorax*. – 2005. – Vol. 60, No. 3. – P. 211-214.
12. Heinzmann A. Promoter polymorphisms of the CD14 gene are not associated with bronchial asthma in Caucasian children. / A. Heinzmann, H. Dietrich, S.-P. Jerkic [et al.] // *European journal of immunogenetics*. – 2003. – Vol. 30, No. 5. – P. 345-348.
13. Faria I. C. de Association of TGF- $\beta$ 1, CD14, IL-4, IL-4r and adam33 gene polymorphisms with asthma severity in children and adolescents. / I. C. de Faria, E. J. de Faria, A. A. Toro [et al.] // *Jornal de pediatria*. – 2008. – Vol. 84, No. 3. – P. 203-210.
14. Lachheb J. Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children / J. Lachheb, I. B. Dhifallah, H. Chelbi [et al.] // *Tissue Antigens*. – 2008. – Vol. 71, No. 5. – P. 417-425.
15. Micheal S. Promoter polymorphisms of the CD14 gene are associated with atopy in Pakistani adults. / S. Micheal, K. Minhas, M. Ishaque [et al.] // *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. – 2011. – Vol. 21, No. 5. – P. 394.
16. Zaborowski T. The effect of CD14 and TLR4 gene polymorphisms on the occurrence of atopic and non-atopic asthma. / T. Zaborowski, K. Wojas-Krawczyk, P. Krawczyk [et al.] // *Adv Clin Exp Med*. – 2011. – Vol. 20, No. 4. – P. 413-421.
17. Zhao L. Association of CD14-260 (-159) C>T and asthma: a systematic review and meta-analysis. / L. Zhao, M. B. Bracken // *BMC medical genetics*. – 2011. – Vol. 12, No. 1. – P. 93.