

А.С.Карунас¹, Ю.Ю.Федорова¹, Н.Н.Рамазанова², Е.С.Галимова², Г.Ф.Гималова¹, Л.Л.Гурьева², С.В.Левашева², А.Р.Бикташева², Л.А.Мухтарова², Ш.З.Загидуллин², Э.И.Эткина², Э.К.Хуснутдинова^{1,3}

Исследование роли полиморфных вариантов генов цитокинов в развитии бронхиальной астмы в Республике Башкортостан

1 – ФГБУ науки "Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН": 450054, Республика Башкортостан, г. Уфа, пр-т Октября, 71;

2 – ГБОУ ВПО "Башкирский государственный медицинский университет" Минздравсоцразвития России: 450000, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, 3;

3 – ГБОУ ВПО "Башкирский государственный университет", 450074, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32

A.S.Karunas, Yu.Yu.Fedorova, N.N.Ramazanova, E.S.Galimova, G.F.Gimalova, L.L.Guryeva, S.V.Levasheva, A.R.Biktasheva, L.A.Mukhtarova, Sh.Z.Zagidullin, E.I.Etkina, E.K.Khusnutdinova

Evaluation of a role of cytokine gene polymorphisms in development of bronchial asthma in the Republic of Bashkortostan

Summary

Asthma is one of the most common, severe and debilitating multifactorial diseases resulting from complex interaction between genes and environmental factors. The aim of the present work was to analyze the association between cytokine gene polymorphisms and development of asthma in population of the Republic of Bashkortostan. A total of 638 patients with asthma and 366 healthy individuals were recruited in our investigation. In summary, the study of cytokine gene polymorphisms and gene-gene interaction suggested an important role of TNFA, IL4, CCL11 and IL13 gene polymorphisms in the development of asthma in Bashkortostan population.

Key words: bronchial asthma, association, cytokine genes.

Резюме

Бронхиальная астма (БА) является одним из наиболее распространенных, тяжелых и инвалидизирующих многофакторных заболеваний, развивающихся при тесном взаимодействии генетических и средовых факторов риска. Целью настоящей работы явился анализ ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов с развитием бронхиальной астмы в Республике Башкортостан. Материалом для исследования служили образцы ДНК 638 неродственных индивидов, больных БА, и 366 практически здоровых индивидов контрольной группы. Проведенное исследование полиморфных вариантов генов цитокинов (IL4, IL4RA, IL1B, IL1RA, IL10, IL13, CCL11, TNFA) и межгенных взаимодействий показало, что полиморфные варианты генов цитокинов TNFA, IL4, CCL11 и IL13 вносят вклад в формирование генетической предрасположенности к БА в Республике Башкортостан.

Ключевые слова: бронхиальная астма, ассоциация, гены цитокинов.

Бронхиальная астма (БА) – это хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в котором принимают участие многие клетки и клеточные элементы. Хроническое воспаление обуславливает развитие бронхиальной гиперреактивности, которая приводит к повторяющимся эпизодам свистящих хрипов, одышки, чувства заложенности в груди и кашля, особенно по ночам или ранним утром [1]. БА является одним из наиболее распространенных тяжелых и инвалидизирующих многофакторных заболеваний, развивающихся при тесном взаимодействии генетических и средовых факторов риска. Многочисленные генетические исследования БА, проводимые в последнее 10-летие во всем мире, позволили идентифицировать более 150 генов, связанных с развитием БА и атопии в целом. Это гены цитокинов, гены главного комплекса гистосовместимости, гены медиаторов воспаления, гены β_2 -адренорецепторов, гены ферментов биотрансформации ксенобиотиков (ФБК), гены, распознающие консервативные струк-

туры микроорганизмов, гены, регулирующие барьерную функцию эпителия, гены, детерминирующие тканевый ответ на хроническое воспаление и др. [2, 3]. С помощью полногеномных подходов обнаружены новые гены предрасположенности к БА, раскрывающие неизвестные ранее стороны патогенеза этого комплексного заболевания [3, 4]. В то же время, полученные в различных исследованиях результаты противоречивы, молекулярно-генетические основы формирования БА в отдельных популяциях пока изучены недостаточно.

Целью настоящей работы явился анализ ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов с развитием БА в Республике Башкортостан.

Материалы и методы

В работе были использованы образцы ДНК 638 больных БА в возрасте от 1 до 67 лет, не являющихся родственниками. Обследованные являлись пациен-

тами детского отделения Клиники БГМУ, пульмонологического и аллергологического отделений городской клинической больницы № 21 г. Уфы. Диагноз БА устанавливался в соответствии с критериями GINA [1] и отечественными программными документами по диагностике, лечению и профилактике БА. В зависимости от формы заболевания выборка больных была разделена на 2 группы. Первую группу составили 445 пациентов с астмой с преобладанием аллергического компонента (аллергическая); 2-ю – 193 человека со смешанной астмой. У 211 больных наблюдалось легкое персистирующее, у 295 – среднетяжелое, у 132 – тяжелое течение БА. Состав больных по этнической принадлежности был следующим: русские – 225, татары – 139, башкиры – 72, метисы – 202 человека. В качестве контрольной исследована группа практически здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу с больными, не имеющих отягощенной наследственности по atopическим заболеваниям (среди них русских – 123 человека, татар – 91, башкир – 51, метисов – 101). ДНК была выделена из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [5]. Анализ полиморфных вариантов генов интерлейкина-4 (IL4) (-590C>T, rs2243250), альфа-цепи рецептора IL4 – IL4RA (p.Ile75Val, rs1805010), интерлейкина-10 (IL10) (-627C>A, rs1800872), интерлейкина-13 (IL13) (p.Arg144Gln, rs20541), фактора некроза опухоли альфа (TNFA) (-308G>A, rs1800629) и эотаксина (CCL11) (-384A>G, rs17809012) осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции синтеза ДНК и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов [6]. Математическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ *Microsoft Office Excel 2003, Statistica v. 6.0 for Windows*.

При попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля использовался критерий χ^2 (p) для таблиц сопряженности 2×2 . Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов (ОШ) [7]. Анализ межгенных взаимодействий проводился с помощью программы GMDR (*Generalized Multifactor-Dimensionality Reduction*) [8].

Результаты и обсуждение

Среди значительного количества генов-кандидатов БА особое место занимают гены цитокинов, играющие ключевую роль на всех стадиях реализации аллергических реакций [9]. Было проведено исследование полиморфных локусов 6 генов цитокиновой сети (IL4, IL4RA, IL10, IL13, CCL11, TNFA) у больных БА и индивидов контрольной группы с учетом их этнической принадлежности, формы и степени тяжести заболевания (таблица).

IL4 является критическим цитокином аллергического воспаления, обуславливающим дифференцировку CD4⁺-клеток в направлении Th2, пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов, выработку IgE. Однонуклеотидная замена -590C>T в гене IL4 создает дополнительный сайт связывания транскрипционных факторов, а аллель IL4*-590T стимулирует повышенную экспрессию гена. Проведенный сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфного локуса -590C>T гена IL4 в контрольных группах различной этнической принадлежности выявил наличие статистически значимых различий между русскими и башкирами, русскими и татарами, поэтому анализ ассоциации этого ДНК-локуса с БА выполнялся только в группах

Таблица
Распределение частот аллелей полиморфных вариантов генов цитокинов у больных БА и здоровых индивидов различной этнической принадлежности

Аллели	Контрольная группа				Больные БА			
	Русские	Татары	Башкиры	В целом	Русские	Татары	Башкиры	В целом
IL4 (rs2243250, -590C>T)								
C, n (%)	180 (76,27)	122 (67,03)	62 (60,78)	-	291 (66,74)	168 (65,12)	87 (62,14)	-
T, n (%)	56 (23,73)	60 (32,97)	40 (39,22)	-	145 (33,26)	90 (34,88)	53 (37,86)	-
IL4RA (rs1805010, p.Ile75Val)								
Ile, n (%)	148 (62,18)	107 (58,79)	52 (50,98)	409 (56,96)	260 (59,63)	146 (57,48)	71 (50,71)	684 (56,81)
Val, n (%)	90 (37,82)	75 (41,21)	50 (49,02)	309 (43,04)	176 (40,37)	108 (42,52)	69 (49,29)	520 (43,19)
IL10 (rs1800872, -627C>A)								
C, n (%)	187 (76,02)	129 (70,88)	63 (61,76)	-	327 (75,35)	186 (73,23)	101 (72,14)	-
A, n (%)	59 (23,98)	53 (29,12)	39 (38,24)	-	107 (24,65)	68 (26,77)	39 (27,86)	-
IL13 (rs20541, p.Arg144Gln)								
Arg, n (%)	171 (70,08)	137 (75,27)	65 (65,00)	517 (71,02)	304 (68,78)	183 (67,78)	91 (66,91)	834 (67,48)
Gln, n (%)	73 (29,92)	45 (24,73)	35 (35,00)	211 (28,98)	138 (31,22)	87 (32,22)	45 (33,09)	402 (32,52)
TNFA (rs1800629, -308G>A)								
G, n (%)	215 (90,34)	166 (91,21)	88 (86,27)	647 (89,86)	385 (88,30)	220 (85,27)	117 (83,57)	1 042 (86,26)
A, n (%)	23 (9,66)	16 (8,79)	14 (13,73)	73 (10,14)	51 (11,70)	38 (14,73)	23 (16,43)	166 (13,74)
CCL11 (rs17809012, -384A>G)								
A, n (%)	120 (50,42)	93 (51,10)	58 (58,00)	364 (50,70)	204 (51,52)	122 (46,56)	51 (44,74)	586 (50,26)
G, n (%)	118 (49,58)	89 (48,90)	42 (42,00)	354 (49,30)	192 (48,48)	140 (53,44)	63 (55,26)	580 (49,74)

определенной этнической принадлежности и не проводился в объединенной выборке. Обнаружены статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов данного полиморфного локуса между группами больных БА и индивидов контрольной группы русской этнической принадлежности. У больных БА частота встречаемости аллеля IL4*-590T была выше, чем в контрольной группе индивидов (33,26 % и 23,73 %, соответственно) ($p = 0,013$). Показатель ОШ для носителей аллеля IL4*-590T составил 1,6 (95%-ный доверительный интервал (ДИ) – 1,12–2,3). Гомозиготный генотип IL-4*-590T/T определялся у 11,47 % больных БА по сравнению с 2,54 % в контрольной группе ($p = 0,0088$; ОШ = 4,97 (95%-ный ДИ – 1,47–16,81)). В группе больных аллергической БА аллель IL4*-590T и генотип IL4*-590T/T встречались с более высокой частотой – 35,86 % ($p = 0,0026$; ОШ = 1,8 (95%-ный ДИ – 1,22–2,64)) и 13,79 % ($p = 0,0028$; ОШ = 6,13 (95%-ный ДИ – 1,78–21,19)) соответственно. Ассоциация аллеля IL4*-590T с риском развития БА ранее была выявлена у индивидов европейского, азиатского и африканского происхождения [3].

IL4 оказывает действие на клетки-мишени посредством связывания со специфическими рецепторами. Проведенный анализ полиморфного локуса р.Пе75Val гена альфа-цепи рецептора IL4 у больных БА и в контрольной группе башкир не выявил ассоциации данного локуса с развитием заболевания.

IL13 является одним из основных участников Th2-воспаления и ремоделирования при аллергических заболеваниях. Исследование полиморфного варианта р.Arg144Gln гена IL13 не выявило статистически значимых различий между больными БА и группой контроля в объединенных выборках. Обнаружена тенденция повышения частоты встречаемости аллеля IL13*144Gln в группе больных БА татарской этнической принадлежности (32,22 %) по сравнению с соответствующей группой контроля (24,73 %; $p = 0,086$). У больных аллергической БА частота аллеля IL13*144Gln (34,0 %) была статистически значимо выше, чем в контрольной группе ($p = 0,047$; ОШ = 1,57 (95%-ный ДИ – 1,0–2,45)). Гомозиготный по аллелю IL13*144Gln генотип у больных аллергической БА встречался с более высокой частотой, чем в контроле (12,0 % и 3,3 % соответственно) ($p = 0,049$; ОШ = 4,0 (1,09–14,67)). По данным литературы, различные полиморфные варианты гена IL13 ассоциированы с развитием БА в популяциях Европы и Азии [3, 10]. Наличие аллельного варианта IL13*144Gln характеризуется повышенной активностью фермента по сравнению с IL13*144Arg, более высокой концентрацией IL13 в плазме человека и, таким образом, может влиять на развитие аллергического воспаления.

IL10 является одним из основных цитокинов, играющих роль в предотвращении Th2-ответа на воздействие аллергенов. Установлено наличие статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного локуса -627C>A гена IL10 между контрольными группами

русских и башкир. Ассоциации этого ДНК-локуса с развитием БА не выявлено.

TNFA – полифункциональный цитокин, участвующий в реализации воспалительной реакции и иммунного ответа. Полиморфный вариант -308G>A гена TNFA влияет на связывание транскрипционных факторов с промотором и ассоциирован с повышенной экспрессией гена TNFA *in vitro*: присутствие аллеля А связано с повышенной продукцией цитокина по сравнению с аллелем G [11]. Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта -308G>A гена TNFA не выявил статистически значимых межэтнических различий между контрольными группами русских, татар и башкир ($p > 0,05$), в связи с этим рассматривались объединенные выборки больных и контроля. У больных БА обнаружено статистически значимое повышение частоты встречаемости аллеля TNFA*-308A (13,74 %) по сравнению с группой контроля (10,14 %) ($p = 0,02$; ОШ = 1,41 (95%-ный ДИ – 1,05–1,89)). При сравнении распределения частот аллелей полиморфного варианта -308G>A гена TNFA у больных с различной степенью тяжести заболевания были выявлены значимые отличия между больными с тяжелым течением БА и контрольной группой ($p = 0,0014$). У больных с тяжелой БА частота аллеля TNFA*-308A была значительно выше, чем в контрольной группе (17,92 % и 10,14 % соответственно) (ОШ = 1,93 (95%-ный ДИ – 1,29–2,91)). Генотип TNFA*-308A/A у больных тяжелой БА также встречался с более высокой частотой, чем в контрольной группе (8,33 % vs 1,39 %) ($p = 0,00015$; ОШ = 6,45 (95%-ный ДИ – 2,16–19,29)). Значительная ассоциация аллеля TNFA*-308A с БА и тяжестью ее течения отмечается во многих исследованиях у индивидов европейского и азиатского происхождения [2, 3].

Эотаксин – активный эозинофильный хемоаттрактант, влияющий на мобилизацию эозинофилов и Th2-лимфоцитов в процессе аллергического воспаления. Анализ полиморфного локуса -384A>G гена CCL11 показал наличие статистически значимых различий в распределении частот аллелей полиморфного варианта -384A>G гена CCL11 между больными БА и контрольной группой башкирской этнической принадлежности. Установлено, что в общей выборке больных БА аллель CCL11*-384G встречается чаще, чем в контрольной группе (55,26 % и 42,0 % соответственно) ($p = 0,053$; ОШ = 1,71; 95%-ный ДИ – 0,99–2,93). Частота гомозиготного по аллелю CCL11*-384G-генотипа у больных БА (31,58 %) была также выше, чем в контроле (22 %), но различия не достигли уровня статистической значимости. По данным H.S.Chang *et al.*, у гена, несущего аллель CCL11*-384G полиморфного варианта -384A>G гена CCL11, способность связывать транскрипционный фактор выше, чем у гена, имеющего аллель CCL11*-384A [12]. Ассоциация аллеля CCL11*-384G с БА ранее была выявлена у афроамериканцев и индусов [13, 14].

В целом проведенный нами анализ ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов с разви-

тием БА у индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности показал значимость полиморфных локусов генов IL4, IL13, TNFA и CCL11 в развитии заболевания, а также наличие межэтнических различий обнаруженных ассоциаций.

В основе возникновения многофакторной патологии лежат сложные взаимодействия генетических и средовых факторов, которые необходимо учитывать при прогнозировании риска развития заболевания и разработки профилактических мероприятий. Нами проведен анализ межгенных взаимодействий исследованных полиморфных локусов с помощью компьютерной программы GMDR, определяющей оптимальную модель ген-генного взаимодействия, позволяющую с наиболее высокой точностью предсказать наличие или отсутствие предрасположенности к заболеванию [8]. При исследовании межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов цитокинов определена оптимальная 3-локусная модель, ассоциированная с развитием БА: IL4(-590C>T) – IL13(p.Arg144Gln) – CCL11(-384A>G). Тестируемая сбалансированная точность данной модели составила 0,5604, воспроизводимость результата (CV Consistency) – 9/10 ($p = 0,0107$). Модель включает в себя полиморфные варианты 2 ключевых Th2-цитокинов (IL4, IL13), участвующих в обеспечении IgE-ответа и формировании аллергических реакций и эотаксина, влияющего на мобилизацию эозинофилов и Th2-лимфоцитов в процессе аллергического воспаления. Таким образом, проведенный анализ дал возможность установить ДНК-локусы генов цитокинов, взаимодействующие при формировании наследственной предрасположенности к БА в Республике Башкортостан (IL4, IL13, CCL11), что подтвердило полученные при анализе ассоциаций отдельных полиморфных вариантов генов результаты и показало наличие взаимосвязей между генами цитокиновой сети, которые в совокупности оказывают влияние на развитие БА.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование генов цитокинов и межгенных взаимодействий у больных БА и индивидов контрольной группы показало, что полиморфные варианты генов цитокинов TNFA, IL4, CCL11, IL13 вносят вклад в формирование генетической предрасположенности к БА в Республике Башкортостан. Развитие БА у русских ассоциировано с полиморфным вариантом -590C>T гена IL4, у татар – с полиморфным вариантом p.Arg144Gln гена IL13, у башкир – с полиморфным вариантом -384A>G гена CCL11. Маркерами повышенного риска развития и тяжелого течения БА в Республике Башкортостан являются аллель А и генотип А/А полиморфного локуса -308G>А гена TNFA.

Данная работа частично финансирована грантами Минобрнауки: госконтракт № П601 от 18.05.10, договор № 16.512.11.2032, РФФИ № 11-04-97063.

Литература

1. Чучалин А.Г. (ред.). Глобальная стратегия по лечению и профилактике бронхиальной астмы (GINA). Пересмотр 2006: Пер. с англ. М.: Атмосфера; 2007.
2. Holloway J.W., Yang I.A., Holgate S.T. Genetics of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125: 81–94.
3. Michel S., Liang L., Depner M. et al. Unifying candidate gene and GWAS Approaches in Asthma. *PLoS One* 2010; 5 (11): e13894.
4. Akhbari L., Sandford A.J. Genome-wide association studies for discovery of genes involved in asthma. *Respirology* 2011; 28: 1440–479.
5. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA. In: Walker J.M., ed. *Methods in molecular biology*. New York: Human Press; 1984; vol. 2: 31–34.
6. Федорова Ю.Ю. Анализ генов предрасположенности к развитию бронхиальной астмы в Республике Башкортостан: Дис. ... канд. биол. наук. Уфа; 2009.
7. Schlesselman J. Case-control studies. Design, conduct, analysis. New York, Oxford; Oxford University Press; 1982. 58–96.
8. Lou X.Y., Chen G.B., Yan L. et al. A generalized combinatorial approach for detecting gene-by-gene and gene-by-environment interactions with application to nicotine dependence. *Am. J. Hum. Genet.* 2007; 80: 1125–1135.
9. Barnes P.J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Invest.* 2008; 118 (11): 3546–3556.
10. Bottema R.W., Nolte I.M., Howard T.D. et al. Interleukin 13 and interleukin 4 receptor- α polymorphisms in rhinitis and asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2010; 153 (3): 259–267.
11. Wilson A.G., Symons J.A., McDowell T.L. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1997; 94: 3195–3199.
12. Chang H.S., Kim J.S., Lee J.H. et al. A single nucleotide polymorphism on the promoter of eotaxin1 associates with its mRNA expression and asthma phenotypes 1. *J. Immunol.* 2005; 174: 1525–1531.
13. Raby B., Steen K., Lazarus R. Eotaxin polymorphisms and serum total IgE levels in children with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117: 298–305.
14. Batra J., Rajpoot R., Ahluwalia J. et al. A hexanucleotide repeat upstream of eotaxin gene promoter is associated with asthma, serum total IgE and plasma eotaxin levels. *J. Med. Genet.* 2007; 44 (6): 397–403.

Информация об авторах

Карунас Александра Станиславовна – д. б. н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека ИБГ УНЦ РАН, доцент кафедры генетики и фундаментальной медицины БашГУ; тел.: (347) 235-60-88; e-mail: carunas@list.ru

Федорова Юлия Юрьевна – к. б. н., научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека ИБГ УНЦ РАН; тел.: (347) 235-60-88; e-mail: fedorova-y@yandex.ru

Рамазанова Наиля Назыфовна – к. б. н., ассистент кафедры детских болезней ГБОУ ВПО БГМУ; тел.: (347) 223-11-71; e-mail: nelya-77@mail.ru

Галимова Елена Станиславовна – к. б. н., доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней с курсом физиотерапии ГБОУ ВПО БГМУ; тел.: (347) 237-71-14; e-mail: galimovov@mail.ru

Гималова Галия Фуатовна – аспирант лаборатории молекулярной генетики человека ИБГ УНЦ РАН; тел.: (347) 235-60-88; e-mail: galiyagimalova@gmail.com

Гурьева Лариса Львовна – к. б. н., доцент кафедры детских болезней ГБОУ ВПО БГМУ; тел.: (347) 223-11-71; e-mail: pedkaf@rambler.ru

Левашева Светлана Владимировна – ассистент кафедры детских болезней ГБОУ ВПО БГМУ; тел.: (347) 223-11-71; e-mail: levashova79@mail.ru

Бикташева Альфия Римовна – к. б. н., доцент кафедры детских болезней ГБОУ ВПО БГМУ; тел.: (347) 223-11-71; e-mail: pedkaf@rambler.ru

Мухтарова Лилия Альфредовна – аспирант кафедры пропедевтики внутренних болезней с курсом физиотерапии ГБОУ ВПО БГМУ Росздора; тел.: (347) 237-71-14; e-mail: lilii-m9@mail.ru

Загидуллин Шамиль Зарифович – д. б. н., проф., зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней с курсом физиотерапии ГБОУ ВПО БГМУ; тел.: (347) 237-71-14; e-mail: zshamil@inbox.ru

Эткина Эсфирь Исааковна – д. б. н., проф., зав. кафедрой детских болезней ГБОУ ВПО БГМУ; тел.: (347) 223-11-71; e-mail: pedkaf@rambler.ru

Хуснутдинова Эльза Камилевна – д. б. н., проф., акад. АН РБ, зав. отделом геномики ИБГ УНЦ РАН, зав. кафедрой генетики и фундаментальной медицины БашГУ; тел.: (347) 235-60-88; e-mail: elzakh@mail.ru

Поступила 14.03.12

© Коллектив авторов, 2012

УДК 616.248-055.7(470.57)