

Л.М.Огородова¹, О.С.Федорова¹, Е.Ю.Брагина¹, М.Б.Фрейдin², М.И.Петровская¹

Генетические маркеры бронхиальной астмы у детей, больных атопическим дерматитом

1 — ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, г. Томск;

2 — ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, г. Томск

L.M.Ogorodova, O.S.Fedorova, E.Yu.Bragina, M.B.Freidin, M.I.Petrovskaya

Genetic markers of bronchial asthma in children with atopic dermatitis

Summary

The aim of the study was to evaluate the usefulness of the -703C/T polymorphism in IL-5 gene, Q551R polymorphism in IL-4RA gene, and GSTM1 and GSTT1 gene polymorphism as biological markers of bronchial asthma (BA) in children with atopic dermatitis (AD). We genotyped children with AD ($n = 72$; mean age, 9.4 ± 0.28 years), children with AD in combination with BA ($n = 68$; mean age, 7.5 ± 0.7 years) and control subjects ($n = 147$; mean age, 9.9 ± 0.42 years). We found the associations between BA and the -703C allele of the interleukin-5 (IL-5) gene ($OR = 1.73$, $p = 0.013$) and -703CC / 551RR genotype combination ($OR = 3.15$; $p = 0.015$) in children with AD; between the 551RR genotype of the IL-4RA gene and atopy ($p < 0.05$). -703CT / GSTT1 0/0 genotype combination was found rarer in children with BA than in controls ($OR = 0.15$; $p = 0.049$). Thus, -703C/T allele of the IL-5 gene and -703CC / 551RR genotype combination were associated with BA and could be used as valuable markers of the disease in children with AD, whereas the Q551R polymorphism in the IL-4RA gene was associated with predisposition to atopic disease and could be used for administration of preventive therapy of allergic disorder in early childhood. The -703CT / GSTT1 0/0 genotype combination can prevent BA occurrence in children with AD.

Резюме

Цель работы — установить значение полиморфизмов -703C/T гена IL-5, 551Q/R гена IL4RA, генов биотрансформации ксенобиотиков (GSTM1, GSTT1), а также комбинации изучаемых генотипов в формировании подверженности к бронхиальной астме (БА) у детей, страдающих атопическим дерматитом (АД). В исследовании использовались генотипирование по полиморфизмам -703C/T гена интерлейкина-5 (IL-5), 551Q/R гена IL4RA, глутатион S-трансфераз M1 (GSTM1) и GSTT1 в группах пациентов с АД ($n = 72$; средний возраст $9,4 \pm 0,28$ года), больных БА в сочетании с АД ($n = 68$; средний возраст $7,5 \pm 0,7$ года) и в контрольной выборке ($n = 147$; средний возраст $9,9 \pm 0,42$ года). Установлена рискованная значимость аллеля -703C гена IL-5 и комбинации генотипов -703CC / 551RR в отношении БА у детей с АД ($OR = 1,73$ при $p = 0,013$ и $OR = 3,15$ при $p = 0,015$ соответственно). Генотип 551RR гена IL4RA связан с подверженностью развитию аллергических заболеваний у детей ($p < 0,05$). Комбинация генотипов -703CT / GSTT1 0/0 реже встречалась у больных БА в сравнении с контролем ($OR = 0,15$; $p = 0,049$). Аллель -703C гена IL-5 и комбинации генотипов -703CC / 551RR генов IL-5 и IL4RA ассоциированы с развитием БА у больных АД, а генотип 551RR гена IL4RA — с подверженностью аллергической патологии в детском возрасте, что может иметь значение для обоснованного назначения мероприятий первичной профилактики. Сочетание генотипов -703CT / GSTT1 0/0 имеет протективное значение в развитии БА.

Проблема бронхиальной астмы (БА) существенно отражается на экономике государства и ресурсах здравоохранения, достигая мирового масштаба [1, 2]. В настоящее время в мире насчитывается до 155 млн пациентов, на лечение и социальное обеспечение которых ежегодно затрачивается до 15 миллиардов долларов [3]. Сложившаяся ситуация требует неотложных мероприятий по идентификации молекулярно-генетических механизмов БА и разработке высокоэффективных инновационных методов первичной профилактики заболевания в группах риска. Так, на сегодняшний день проведены сотни исследований, позволивших установить ассоциацию полиморфизма генов с различными фенотипами БА, при этом для 64 генов показана связь с клиническими проявлениями астмы как минимум в одном исследовании [4].

Важнейшими участниками воспаления при БА являются провоспалительные цитокины IL-4 и IL-5,

биологические эффекты которых связаны с регуляцией синтеза иммуноглобулина E (IgE) и поддержанием эозинофильного воспаления в респираторном тракте. В работах отечественных и зарубежных авторов имеются указания на наличие ассоциаций полиморфизма генов данных медиаторов с астмой и атопией [5–7]. В совместном исследовании НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН и Сибирского государственного медицинского университета было установлено, что аллель -703C гена IL-5 ассоциирован с формированием специфической сенсибилизации, а полиморфные варианты гена IL4RA — с гиперпродукцией IgE при БА [8, 9].

Особое значение в становлении подверженности БА отводится полиморфизму генов глутатион-S-трансфераз M1 (GSTM1) и GSTT1, ферментов второй фазы биотрансформации, облегчающих экскрецию молекул ксенобиотиков и эндогенных

медиаторов воспалительных реакций. Вариабельность данного семейства ферментов, обусловленная генным полиморфизмом, идентифицирует среди индивидов "быстрых" и "медленных" метаболизеров, что может играть определенную роль в формировании клинических фенотипов болезни [10, 11]. Показано, что "нулевые" генотипы генов GSTT1 и GSTM1 как в отдельности, так и в комбинации друг с другом являются факторами генетической предрасположенности к БА [12]. Кроме того, выявлена связь клинических особенностей течения заболевания с полиморфизмом генов GSTT1 и GSTM1, а также модифицирующая роль курения в развитии БА [13].

Цель настоящего исследования — установить значение полиморфизмов -703C/T гена IL-5, 551Q/R гена IL4RA, генов биотрансформации ксенобиотиков (GSTM1, GSTT1), а также комбинации изучаемых генотипов в формировании подверженности БА у детей, страдающих атопическим дерматитом (АД).

Материалы и методы

Исследование имело дизайн "случай—контроль" и осуществлялось на базе областного Центра клинической иммунологии и аллергологии (Областная детская больница, г. Томск) и НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН. Протокол исследования утвержден на заседании локального этического комитета. Под наблюдением находились пациенты с АД ($n = 72$; средний возраст $9,4 \pm 0,28$ года) и больные БА в сочетании с АД ($n = 68$; средний возраст $7,5 \pm 0,7$ года). В группу больных АД вошли 39,1 % мальчиков и 60,9 % девочек, среди пациентов с сочетанной патологией это соотношение составило 56,3 и 43,7 % соответственно. В контрольную выборку были включены практически здоровые дети ($n = 147$; средний возраст $9,9 \pm 0,42$ года; 48,7 % мальчиков и 51,3 % девочек). Пациенты подвергались комплексному клинико-функциональному обследованию.

Диагнозы АД и БА устанавливались на основании критериев, изложенных в национальных согласительных документах [2, 14].

Молекулярно-генетический анализ включал исследование полиморфизмов -703C/T гена IL-5, 551Q/R гена IL4RA, GSTM1 и GSTT1. Для генотипирования индивидов по указанным полиморфизмам использовали образцы тотальной ДНК, выделенной из цельной венозной крови по стандартной неэнзиматической методике [15]. Генотипирование осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции, используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе. Продукты рестрикции фракционировали 20–30 мин в 3%-ном агарозном геле при напряжении 120 В. Фрагменты ДНК окрашивали бромистым этидием и визуализировали в ультрафиолетовом свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе *UV-VIS Imager-II* (США).

Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи пакета программ *Statistica 6.0 for Windows*. Данные представлены в виде $X \pm SE$, где X — среднее арифметическое, SE — ошибка среднего. Сравнение изучаемых групп по распространенности генотипов и частоте аллелей проводили с помощью двустороннего точного критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Распределение генотипов по полиморфным вариантам -703C/T гена IL-5, 551Q/R гена IL4RA, GSTM1 и GSTT1 у здоровых лиц в исследованной популяции соответствовали ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга. Полученные частоты полиморфизма генов цитокинов и генов системы метаболизма, изучаемых в настоящей работе, близки к значениям таковых в других европеоидных популяциях. При

Таблица 1
Распределение генотипов и частоты аллелей в исследуемых группах по маркерам -703C/T гена IL5 и 551Q/R гена IL4RA

Полиморфизмы	Генотипы	АД, % ($n = 72$)	БА + АД, % ($n = 68$)	Контроль, % ($n = 147$)
-703C/T IL5	С/С	18,1	27,9	14,3
	С/Т	38,8	36,8	38,1
	Т/Т	43,0	35,3	47,6
	p^*	0,716	0,046	
	-703C	0,375	0,463	0,333
	p^{**}	0,451	0,013	
Q551R IL4RA	Q/Q	68,1	62,7	67,6
	Q/R	15,3	23,9	28,9
	R/R	16,7	13,4	3,5
	p^*	0,001	0,033	
	551R	0,283	0,254	0,180
	p^{**}	0,155	0,104	

Примечание: * — достигнутый уровень значимости при сравнении распределения генотипов с показателями группы контроля (двусторонний точный тест Фишера); ** — достигнутый уровень значимости при сравнении частоты аллелей с показателями группы контроля (двусторонний точный тест Фишера).

исследовании распространенности генотипов по маркеру -703С/Т гена IL-5 обнаружено преобладание гомозигот -703СС среди больных АД и БА в сравнении с группой контроля (табл. 1). Различия в распространенности генотипов между контрольной группой и выборкой пациентов с АД не получены. Анализ частот встречаемости аллелей в изучаемых группах позволил выявить преобладание носителей аллеля -703С среди пациентов, страдающих БА и АД, в сравнении со здоровыми лицами ($OR = 1,73$; $p = 0,013$). При сравнении частот аллелей у пациентов с АД и с сочетанной патологией различие не являлось статистически значимым. Частоты аллелей в выборке больных АД практически не отличались от таковых у здоровых лиц. Таким образом, носительство аллеля -703С гена IL-5 является фактором риска формирования БА, но не АД. Этот генетический фактор можно рассматривать как дополнительный биологический маркер развития БА у пациентов с аллергическим поражением кожи.

В процессе исследования установлено сцепление полиморфизма 551Q/R гена IL4RA с аллергическими заболеваниями, поскольку распределение генотипов в группах больных АД и пациентов с сочетанной патологией было схожим и достоверно отличалось от такового у детей группы контроля ($OR = 1,61$; $p < 0,05$), как показано в табл. 1. Среди больных аллергическими заболеваниями было относительно больше обладателей генотипа 551RR ($p < 0,05$).

У представителей контрольной выборки (жителей г. Томска) частота "нулевого" генотипа для генов GSTT1 и GSTM1 составила 21,8 и 36,1 % соответственно. Распределение генотипов в группах детей с аллергическими заболеваниями и здоровых лиц не имело статистических различий (табл. 2). Однако исследование распределения частоты генотипов по полу в группе больных БА позволило выявить преобладание носителей делеции гена GSTM1 среди девочек ($p = 0,05$), что позволяет рассматривать данный генный маркер как фактор подверженности БА у лиц женского пола. Для носителей делеции гена GSTM1, повлекшей за собой утрату активности соответствующего фермента, существует вероятность дисбаланса процессов детоксикации экзогенных и эндогенных веществ, что повышает риск развития заболевания.

Эта ассоциация может быть следствием множественности биологических функций GST и участия в метаболизме эндогенных медиаторов воспаления (простагландинов, лейкотриена C4), нейромедиаторов. В настоящее время ведется дискуссия по поводу взаимосвязи ферментов метаболизма с регуляторным цитокиновым звеном. Предполагается, что образование реактивных метаболитов в ходе реакций 1-й фазы биотрансформации ксенобиотиков и их дальнейшее ковалентное связывание с макромолекулами клетки могут привести к возникновению аутоантигенов, вызывающих клеточный или гуморальный иммунный ответ [13].

Следующим этапом явилась оценка ассоциации различных комбинаций изучаемых генотипов с риском развития БА у детей, страдающих АД. Было обнаружено значительное различие в частотах -703СС/551RR в группе больных с БА и АД и в контрольной выборке, что указывает на рисковую значимость данного сочетания генотипов в развитии БА у детей с АД (19,4 и 7,1 % соответственно; $OR = 3,15$; $p = 0,015$). Статистические различия в частоте остальных возможных комбинаций генотипов по маркерам -703С/Т гена IL-5, 551Q/R гена IL4RA в исследуемых выборках не обнаружены.

Принимая во внимание, что в ходе настоящего исследования выявлена связь аллеля -703С гена IL-5 с подверженностью БА, проводили изучение возможного взаимовлияния генов в различных комбинациях генотипов данного маркера, а также GSTT1 и GSTM1. Так, комбинация генотипов -703СТ / GSTT1 0/0 встречалась статистически значимо реже у больных БА в сравнении со здоровыми детьми ($OR = 0,15$; $p = 0,049$). Следует отметить, что ранее в наших исследованиях была установлена ассоциация "нулевого генотипа" GSTT1 с легким течением БА, а данный маркер позиционировался как фактор, определяющий фенотип легкой степени тяжести заболевания [16]. Вероятно, данная комбинация генотипов оказывает протективное значение в отношении развития БА.

Заключение

Установлена ассоциация аллеля -703С полиморфизма -703С/Т гена IL-5 и сочетания генотипов -703СС /551RR с высоким риском развития БА у

Таблица 2
Распределение генотипов генов GSTM1 и GSTT1 в исследуемых группах

Полиморфизмы	Генотипы	АД, % (n = 72)	БА + АД, % (n = 68)	Контроль, % (n = 147)
GSTM1	GSTM1 0/0	22 (30,6 %)	25 (36,8 %)	53 (36,1 %)
	GSTM1 +	50 (69,4 %)	43 (63,2 %)	94 (63,9 %)
	p^*	0,450	1,000	
GSTT1	GSTT1 0/0	23 (31,9 %)	15 (22,1 %)	32 (21,8 %)
	GSTT1 +	49 (68,1 %)	53 (77,9 %)	115 (78,2 %)
	p^*	0,135	1,000	

Примечание: * — достигнутый уровень значимости при сравнении с показателями группы контроля (двусторонний точный тест Фишера).

больных АД. Показано, что генотип 551RR гена IL4RA связан с атопией, что указывает на его предиктивную роль в ранней диагностике аллергических заболеваний у детей, в то время как для комбинации -703СТ / GSTT1 0/0 выявлено протективное значение в отношении развития БА. В целом в рамках данной работы получена приоритетная информация о биологических (молекулярно-генетических) предикторах БА. Подобные исследования, относящиеся к предиктивной медицине, могут дополнять клиническую информацию и быть полезными для более обоснованного включения пациентов в группы риска по развитию астмы, что особенно важно при долговременных стратегиях первичной профилактики, связанных с использованием лекарственных средств [17].

Концепция своевременной и эффективной первичной профилактики астмы и аллергии в настоящее время окончательно не сформулирована. Приоритетную позицию сегодня занимает превентивная фармакотерапия. Перспективность и социально-экономическая значимость этого направления не вызывают сомнения. Однако этот метод профилактики подразумевает использование лекарственных препаратов и, следовательно, предъявляет повышенные требования к показаниям и противопоказаниям к его применению. Полученные в данном исследовании результаты демонстрируют, что более широкое внедрение молекулярно-генетических предикторов астмы и расширение службы медико-генетического консультирования детей открывают перспективы для обоснованного отбора пациентов в группы риска, вследствие чего повышается безопасность и эффективность первичной профилактики БА у детей.

Литература

1. Чучалин А.Г. (ред.). Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы. М.: Атмосфера; 2002.
2. Национальная программа "Бронхиальная астма у детей. Диагностика, лечение и профилактика". М.; 2004.
3. Prevention of allergy and asthma. Interim report. Allergy Clin. Immunol. Int. J. 2000; 12 (6): 288–301.
4. Cookson W.O.C., Moffatt M.F. Genetics of asthma and allergic disease. Hum. Mol. Genet. 2000; 9 (16): 2359–2364.
5. Oiso N., Fukai K., Ishii M. IL-4 receptor alpha chain polymorphism Gln551Arg is associated with adult atopic dermatitis in Japan. Br. J. Dermatol. 2000; 142: 1003–1006.
6. Izuhara K., Yanagihara Y., Hamasaki N. et al. Atopy and the human IL-4 receptor alpha chain. J. Allergy Clin. Immunol. 2000; 106: 65–71.
7. Mordvinov V.A., Sanderson C.J. Regulation of IL-5 expression. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 2001; 49 (5): 345–351.
8. Freidin M.B., Kobyakova O.S., Ogorodova L.M., Puzyrev V.P. Association of polymorphisms in the human IL4 and IL5 genes with atopic bronchial asthma and severity of the disease. Comp. Funct. Genom. 2003; 4: 346–350.
9. Огородова Л.М., Федорова О.С., Брагина Е.Ю., Фрейддин М.Б. Значение генетических предикторов для первичной профилактики бронхиальной астмы у детей с атопическим дерматитом. Педиатрия 2005; 6: 4–6.
10. Fryer A.A., Bianco A., Hepple M. et al. Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; 161: 1437–1442.
11. Tamer L., Calikoglu M., Ates N.A. et al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma. Respirology 2004; 9 (4): 493–498.
12. Иващенко Т.Э., Сиделева О.Г., Петрова М.А. и др. Генетические факторы предрасположенности к бронхиальной астме. Генетика 2001; 37 (1): 107–111.
13. Вавилин В.А., Макарова С.И., Ляхович В.В. и др. Ассоциация полиморфных ферментов биотрансформации ксенобиотиков с предрасположенностью к бронхиальной астме у детей с наследственной отягощенностью и без таковой. Генетика 2002; 38 (4): 539–545.
14. Атопический дерматит у детей: диагностика, лечение и профилактика: науч.-практ. программа. М.: Союз педиатров России, международный фонд охраны здоровья матери и ребенка; 2000.
15. Lahiri D.K., Bye S., Nunberg J.I. et al. A non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods used. J. Biochem. Biophys. Methods 1992; 25 (4): 193–205.
16. Брагина Е.Ю., Фрейддин М.Б., Тен И.А., Огородова Л.М. Полиморфизм генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков GSTT1, GSTM1, CYP2E1 и CYP2C19 у больных бронхиальной астмой. Бюл. СО РАМН 2005; 3 (117): 128–132.
17. ETAC. Early Treatment of the Atopic Child. The complete results. Brussel: The UCB Institute of Allergy; 2001.

Поступила 05.04.07

© Коллектив авторов, 2007

УДК 616.248-053.2-06:616.5-002-056.3