

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Н.А. Соловьева, Х.А. Куртанов, Н.И. Павлова, Е.Ю. Сизых, У.Н. Михайлова

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В РАЗВИТИИ АСТМЫ В ЯКУТСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

DOI 10.25789/УМЖ.2018.61.01

УДК 616.248; 575

Целью настоящей работы явилось исследование полиморфных локусов генов интерлейкинов *IL4* (C589T, G/C3'UTR), *IL4R* (Q551R, I50V), *IL5* (C703T), *IL5RA* (G80A), *IL9* (T113M) у больных астмой и в контрольной группе индивидов. В результате проведенного анализа нами показано, что маркерами повышенного риска развития астмы у детей-якутов являются С аллель и генотип CC (G/C 3'UTR) гена *IL4*, аллель T и генотип TT (C589T) гена *IL4*, аллель R (Q551R) гена *IL4RA*, аллель I (I50V) гена *IL4RA*, аллель M (T113M) гена *IL9*. Таким образом, в данном исследовании впервые показана ассоциация полиморфных вариантов генов *IL4*, *IL4RA*, *IL9* с развитием астмы в якутской популяции.

**Ключевые слова:** астма, анализ ассоциаций, гены, якуты.

The purpose of this study was to investigate the polymorphic loci of interleukins genes *IL4* (C589T, G/C3'UTR), *IL4R* (Q551R, I50V), *IL5* (C703T), *IL5RA* (G80A), *IL9* (T113M) in patients with asthma and in the control group of individuals. As a result of the analysis, we showed that the markers of an increased risk of developing asthma in the children-Yakuts are the C allele and the CC genotype (G/C 3'UTR) of the *IL4* gene, the T allele and the genotype TT (C589T) of the *IL4* gene, the allele of the R (Q551R) gene *IL4RA*, allele I (I50V) of *IL4RA* gene, allele M (T113M) of *IL9* gene. Thus, this study for the first time shows the association of polymorphic variants of *IL4*, *IL4RA*, *IL9* genes with the development of asthma in the Yakut population.

**Keywords:** asthma, association analysis, genes, Yakut population.

**Введение.** Сравнительные эпидемиологические исследования последних лет постоянно подтверждают высокую распространенность бронхиальной астмы (БА) во всем мире, сопровождающуюся широкой вариабельностью [9], что связано не только с проблемами в диагностике, но и со структурой подверженности данному заболеванию в различных популяциях. Принимая во внимание, что решающая роль в развитии воспаления при БА принадлежит цитокиновой системе, а именно ИЛ4, ИЛ5, ИЛ9, являющимися инициаторами каскада реакций, приводящих к выбросу медиаторов и миграции клеток в очаг атопического воспаления [2, 10], наиболее активные исследования ведутся в области изучения генов интерлейкинов *IL4*, *IL5*, *IL9* и их рецепторов *IL4RA*, *IL5RA*, осуществляющих трансмиссию сигналов этих лигандов в клетки-мишени [3, 5, 14]. Во многих работах по картированию генов-кандидатов БА показано тесное сцепление заболевания с локусом, расположенным на хромосоме 5q31 – 33 [6, 7, 8, 13]. Несмотря на видимые успехи по изуче-

нию молекулярных механизмов БА, воспроизводимые результаты получены лишь для половины из них. Все большее число публикаций указывает на значение этнической специфики в детерминации аллергопатологии, высказываются предположения, что данная специфика может лежать в основе межпопуляционной вариабельности заболеваемости БА [4], а это предполагает необходимость дальнейшего изучения генов интерлейкинов как предикторов БА с учетом этнической принадлежности.

Выявление биологических предикторов подверженности БА позволяет обоснованно формировать группы риска для реализации в них мероприятий по профилактике развития данного заболевания. Использование молекулярных предикторов, ассоциированных с клиническими, а также лабораторно-функциональными по-

казателями БА, позволяет проводить терапию с учетом этнических и генетических особенностей пациентов.

В нашем исследовании мы проанализировали ассоциацию однонуклеотидных полиморфизмов генов *IL4* (C589T, G/C3'UTR), *IL4R* (Q551R, I50V), *IL5* (C703T), *IL5RA* (G80A), *IL9* (T113M) с бронхиальной астмой в якутской популяции.

**Материалы и методы исследования.** Работа состояла из одномоментного открытого исследования в группах, сформированных по принципу «случай-контроль». В исследование включены 150 пациентов, страдающих БА (гр. 1, 2), и 289 чел. условно здоровых (гр. 3, 4). Для исключения влияния тяжести БА на различия в структуре генетической подверженности проведен ad hoc-анализ, для чего из гр. 1 сформирована гр. 5, соответствующая по тяжести БА гр. 2 (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительная характеристика групп исследования

Основные группы (больные БА), n(%)	Группы контроля (условно здоровые), n(%)	Группа дополнительного статистического анализа (ad hoc), n(%)
<p>Гр. 1 Якуты, n = 103 Средний возраст 9,9±0,2 лет Мальчики, n = 67 (65) Девочки, n = 36 (35)</p>	<p>Гр. 3 Якуты, n = 223 Средний возраст 10,1±2,0 лет Мальчики, n = 135 (60,5) Девочки, n = 88 (39,5)</p>	<p>Гр. 5 Якуты, n = 47 Средний возраст 9,8±1,6 лет Мальчики, n = 30 (63,8) Девочки, n = 17 (36, 2)</p>
<p>Гр. 2 Русские, n = 47 Средний возраст 9,21±0,4 лет Мальчики, n = 30 (63,8) Девочки, n = 17 (36, 2)</p>	<p>Гр. 4 Русские, n = 66 Средний возраст 21,2±2,0 лет Юноши, n = 40 (60,6) Девушки, n = 24 (39,4)</p>	

ЯНЦ КМП: СОЛОВЬЕВА Наталья Алексеевна – к.м.н., вед.н.с.,-руковод.лаб., sonata608@yandex.ru, КУРТАНОВ Харитон Алексеевич – к.м.н., гл.н.с.-руковод. отдела, ПАВЛОВА Надежда Ивановна – к.б.н., вед.н.с.-руковод.лаб., СИЗЫХ Елена Юрьевна – м.н.с., врач высшей квалиф. категории, зав. поликлиникой Больницы ЯНЦ КМП, МИХАЙЛОВА Ульяна Никитична – м.н.с., врач-ординатор Больницы ЯНЦ КМП.

В гр. 1 включены пациенты пульмонологического отделения Педиатрического центра РБ №1-НЦМ (г.Якутск), в гр. 2 – пациенты, рандомизированные из базы данных ДИСПАН Областной детской больницы (г. Томск), в возрасте 4-15 лет, имеющие уровень общего *IGE* в сыворотке крови  $\geq 100$  МЕ/мл, с подтвержденным диагнозом легкой, среднетяжелой, тяжелой БА на протяжении 12 мес. до момента включения в исследование. Диагноз верифицировался на основании следующих критериев: наличие анамнеза, характерного для БА, типичных клинических симптомов заболевания (одышка, кашель, душье), данных функции внешнего дыхания (ФВД) (доказанная обратимость бронхообструкции), атопии (атопический анамнез, положительные кожные аллергопробы (КАП), уровень общего *IGE*  $> 100$  МЕ/мл). Степень тяжести заболевания устанавливалась в соответствии с классификацией, все больные получали базисную терапию заболевания с использованием ингаляционных глюкокортикостероидов в соответствии с документом GINA 2010 [11]. В гр. 3 и 4 включены условно здоровые дети, проживающие в г. Якутске и г.Томске соответственно, не имеющие аллергических заболеваний, с уровнем общего *IGE* в сыворотке крови  $< 100$  МЕ/мл.

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом при Якутском научном центре комплексных медицинских проблем. Родители (опекуны) всех включенных в исследование детей подписали информированное согласие на участие в нём.

Клиническое обследование проводили на базе пульмонологического отделения ПЦ РБ №1-НЦМ (г. Якутск) и Детского центра клинической иммунологии и аллергологии (г. Томск). Всем участникам исследования проведены аллергологическое обследование с применением метода скарификационных кожных проб с экстрактами бытовых, эпидермальных, пыльцевых аллергенов, определение содержания общего *IGE* в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа, а также оценка содержания эозинофилов в назальном секрете по методике Л.А. Матвеевой [1], оценка ФВД по стандартной методике (анализ кривой поток-объем и показателей спирометрии) на аппарате MasterScope («Erih JaeGer GmbH», Германия), молекулярно-генетический анализ 7 полиморфизмов 5 генов интерлейкинов (*C589T*, *G/C3'UTR* гена *IL4*, *Q551R*, *I50V* гена *IL4RA*, *C703T*

гена *IL5*, *G80A* гена *IL5RA*, *T113M* гена *IL9*). Для генотипирования использовали образцы геномной ДНК, выделенной из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции [2]. Генотипирование осуществляли путем анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) продуктов амплификации полимеразной цепной реакции (ПЦР) специфических участков генома [5].

Статистическую обработку проводили при помощи пакета программ «Statistica for Windows 13.0». Данные представлены в виде  $\bar{X} \pm x$ , где  $\bar{X}$  – среднее арифметическое,  $x$  – ошибка среднего. Для оценки различия средних в попарно не связанных выборках применяли U-критерий Манна–Уитни, разницу значений считали значимой при  $p < 0,05$ . Распределение генотипов по исследованным полиморфизмам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга (РХВ) с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частоты аллелей в различных группах использовали критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность. Для оценки вероятности развития события использован метод отношения шансов с использованием программного продукта «Statcalc».

**Результаты и обсуждение.** По результатам *ad hoc*-анализа выявлено, что манифестация БА у детей-якутов возникла позже, чем у русских (табл.2). Частотаотягощенной наследственности значимо не различалась и встречалась в 30–40% случаев. Повышенные показатели общего *IGE* в сыворотке крови отмечались как у якутов, так и у русских больных, но анализ его уровня показал значимые различия. Так, для якутов средний уровень *IGE* в сыворотке крови составил  $523 \pm 40,36$  МЕ/мл, тогда как для русских он был в 2 раза ниже.

Показатели  $ОФВ_1$  были в пределах нормы как у якутов с БА, так и у русских, что связано с применением

базисной терапии и свидетельствует о контролируемом и частично контролируемом течении заболевания. При сравнении уровня в пределах двух популяций выявлено, что для якутов характерен более низкий уровень  $ОФВ_1$ . Сравнительный анализ уровня эозинофилов между якутами и русскими показал, что у русских больных он был в 2 раза выше, чем у якутов. Анализ частоты БА, сочетающейся с atopическим дерматитом, аллергическим ринитом и аллергическим конъюнктивитом, не показал различий между якутами и русскими. Сопоставимые результаты получены при анализе триггеров развития симптомов БА. Так, у якутов преобладала сенсibilизация бытовыми аллергенами (93,6%), среди русских больных она встречалась реже ( $p = 0,001$ ). В числе триггеров для русских больных значимыми были эпидермальные аллергены (53,2%), сенсibilизация пыльцевыми аллергенами также чаще встречалась среди русских ( $p = 0,04$ ).

Анализ исследуемых генов интерлейкинов у якутов (гр.1) позволил установить ассоциацию БА и ее клинико-функциональных проявлений со всеми полиморфными вариантами генов. Вероятность формирования БА в 3 раза выше у носителей генотипа *TT* полиморфизма *C589T* гена *IL4* ( $OR = 2,81$ ;  $CI:95\% 1,69 - 4,68$ ), в 2 раза выше у носителей аллелей *T* полиморфизма *C589T* гена *IL4* ( $OR = 1,97$ ;  $CI:95\% 1,35 - 2,87$ ) и *M* полиморфизма *T113M* гена *IL9* ( $OR = 1,92$ ;  $CI:95\% 1,23 - 2,98$ ), а также генотипа *CC* полиморфизма *G/C 3'UTR* гена *IL4* ( $OR = 2,28$ ;  $CI:95\% 1,38 - 3,79$ ), в полтора раза выше у носителей аллелей *C* полиморфизма *G/C 3'UTR* гена *IL4* ( $OR = 1,62$ ;  $CI:95\% 1,1 - 2,39$ ), *R* полиморфизма *Q551R* гена рецептора *IL4RA* ( $OR=1,66$ ;  $CI:95\% 1,15 - 2,4$ ) и *I* полиморфизма *I50V* гена рецептора *IL4RA* ( $OR = 1,61$ ;  $CI:95\% 1,14 - 2,28$ ). С тяжелой БА ассоциированы генотипы *CC*

Таблица 2

Сравнительная клинико-лабораторная и функциональная характеристика групп дополнительного статистического (*ad hoc*) анализа

Исследуемый параметр	Группа 5, n = 47	Группа 2, n = 47	p
Возраст, лет	$9,87 \pm 0,23$	$9,21 \pm 0,39$	0,161
Возраст манифестации, лет	$6,16 \pm 0,1$	$3,93 \pm 0,3$	0,001
*Отягощенная наследственность, %	29,8	38,3	0,386
<i>IGE</i> , МЕ/мл	$523 \pm 40,36$	$243 \pm 35,19$	0,001
$ОФВ_1$ , % к должной	$99,5 \pm 1,86$	$125 \pm 6,95$	0,002
Эозинофилы носового секрета, %	$1,14 \pm 0,06$	$2,8 \pm 0,37$	0,001

Примечание. Для оценки различия в попарно не связанных выборках применяли U-критерий Манна–Уитни, \* – для оценки различия использовали двусторонний точный критерий Фишера.

полиморфизма *G/C 3'UTR* ( $p = 0,001$ ) гена *IL4*, *GG* ( $p = 0,012$ ) полиморфизма *G80A* гена *IL5RA* и *MM* ( $p = 0,019$ ) полиморфизма *T113M* гена *IL9*. Более высокий уровень общего *IGE* отмечался у больных с генотипами *CC* ( $p = 0,001$ ) полиморфизма *G/C 3'UTR* гена *IL4*, *II* ( $p = 0,015$ ) полиморфизма *I50V* гена рецептора *IL4RA* и *MM* ( $p = 0,013$ ) полиморфизма *T113M* гена *IL9*. Более низкие показатели  $ОФВ_1$  зарегистрированы у носителей генотипов *TT* ( $p = 0,002$ ) полиморфизма *C703T* гена *IL5*, *QR* ( $p = 0,03$ ) полиморфизма *Q551R* гена рецептора *IL4RA* и *MM* ( $p = 0,04$ ) полиморфизма *T113M* гена *IL9*. Анализ распределения аллелей и генотипов исследуемых генов интерлейкинов в гр. 5 и 2 выявил значимые различия для полиморфных вариантов *C589T* и *G/C 3'UTR* гена *IL4*, *Q551R* гена *IL4RA* и *G80A* гена *IL5RA*. Так, в группе якутов с БА преобладали носители аллеля *T* полиморфизма *C589T* ( $p=0,01$ ), аллеля *C* полиморфизма *G/C 3'UTR* гена *IL4* ( $p=0,03$ ) и аллеля *A* полиморфизма гена *IL5RA* ( $p=0,01$ ). Аллель *Q* полиморфизма *Q551R* гена *IL4RA* преобладал как у якутов, так и у русских с БА, но с разной частотой ( $p=0,04$ ).

**Заключение.** Установлено, что БА у детей-якутов характеризуется более тяжелым течением, поздней манифестацией, более низкими показателями количества эозинофилов носового секрета и  $ОФВ_1$ , более высоким уровнем общего *IGE* в сыворотке крови, что обусловлено клинико-функциональным эффектом аллелей, преобладающих в данной популяции. Так, с более высоким уровнем общего *IGE* в сыворотке крови ассоциирован генотип *CC* (*G/C 3'UTR*) гена *IL4*, генотип *II* (*I50V*) гена *IL4RA* и генотип *MM* (*T113M*) гена *IL9*. С более низким показателем  $ОФВ_1$  ассоциирован генотип *TT* (*C703T*) гена *IL5*, генотип *MM* (*T113M*) гена *IL9* и ге-

нотип *QR* (*Q551R*) гена *IL4RA*. Генетическими маркерами повышенной вероятности развития тяжелой БА у якутов является генотип *CC* (*G/C 3'UTR*) гена *IL4*, генотип *GG* (*G80A*) гена *IL5RA* и генотип *MM* (*T113M*) гена *IL9*.

Таким образом, нами впервые у детей в якутской популяции определена генетическая структура подверженности БА, маркерами повышенной вероятности формирования астмы являются генотип *CC* и аллель *C* (*G/C 3'UTR*) гена *IL4*, генотип *TT* и аллель *T* (*C589T*) гена *IL4*, аллель *R* (*Q551R*) гена *IL4RA*, аллель *I* (*I50V*) гена *IL4RA*, аллель *M* (*T113M*) гена *IL9*.

## Литература

1. Матвеева Л.А. Местная защита респираторного тракта у детей. – 2-е изд. / Л.А. Матвеева. – Томск: изд-во Томского ун-та, 1993. – 275 с.
2. Матвеева Л.А. Local protection of the respiratory tract in children. – 2 reissue / L.A. Matveeva. – Tomsk: publishing house of Tomsk University, 1993. – 275 p.
3. Намазова Л.С. Роль цитокинов в патогенезе аллергических реакций / Л.С. Намазова // Аллергические болезни у детей / под ред. М.Я. Студеникина, И.И. Балаболкина. – М.: Медицина, 1998. – С. 70-78.
4. Namazova L.S. The role of cytokines in the pathogenesis of allergic reactions / L.S. Namazova // Allergic diseases in children / ed. by M.Ya Studenikina E.I., Balabolkin. – M: Medicine, 1998. – P. 70-78.
5. Некоторые молекулярно-генетические аспекты этиопатогенеза атопической бронхиальной астмы / В.С. Баранов, Т.Э. Иващенко, О.В. Лаврова [и др.] // Мед. генетика. – 2008. – № 10. – С. 3-13.
6. Some molecular genetic aspects of pathogenesis of atopic bronchial asthma / V.S. Baranov, T.E. Ivashchenko, O.V. Lavrova [et al.] // Med. genetics. – 2008. – No. 10. – P. 3-13.
7. Пузырев В.П. Генетическое разнообразие народонаселения и болезни человека / В.П. Пузырев, М.Б. Фрейдin, А.Н. Кучер. – Томск: Печатная мануфактура, 2007. – С. 86-94.
8. Puzirev V.P. Genetic diversity of the population and diseases of man / V.P. Puzirev, M.B. Freidin, A.N. Kucher. – Tomsk: Printing manufactory, 2007. – P. 86-94.
9. Фрейдin М.Б. Генетика атопии: современное состояние / М.Б. Фрейдin, Е.Ю. Брагина, Л.М. Огородова // Вестник ВОГиС. – 2006. – Т. 10, № 3. – С. 492-503.
10. Freidin M.B. The genetics of atopy: current status / M.B. Freidin E.Y. Bragina, L.M. Ogorodova // Bulletin of VOGIS. – 2006. – Vol. 10, No. 3. – P. 492-503.
11. Cytokines: co-ordinators of immune and inflammatory responses / K.I. Arai, F. Lee, A. Miyajima [et al.] // Ann. Rev. Biochem. – 1990. – Vol. 59. – P. 783-802.
12. Evidence for a locus regulating total serum *IGE* levels mapping to chromosome 5 / D.A. Meyers, D.S. Postma, C.I.M. Panhuysen [et al.] // Genomics. – 1994. – Vol. 23, № 2. – P. 464-470.
13. Genetic susceptibility to asthma: bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy / D.S. Postma, E.R. Bleeker, P.J. Amelung [et al.] // New Eng. J. Med. – 1995. – Vol.333. – P. 894-900.
14. Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) / C.K. Lai, R. Beasley, J. Crane [et al.] // Thorax. – 2009. – Vol. 64, № 6. – P. 476-483.
15. Hamelmann E. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness requires *IL5* but not *IGE* or B-lymphocytes / E. Hamelmann, K. Takeda // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 21. – P.480-489.
16. Masoli M. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report / M. Masoli, D. Fabian, S. Holt, R. Beasley // Allergy. – 2004. – Vol. 59, № 9. – P.469-478.
17. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA / C.C. Mathew // Methods in Molecular Biology / ed. by J.M. Walker. – N.-Y. : Human Press, 1984. – Vol. 2. – P. 31-34.
18. Positionally cloned genes and age-specific effects in asthma and atopy: an international population-based cohort study (ECRHS) / F. Castro-Giner, R. de Cid, A. Gonzalez [et al.] // Thorax. – 2010. – Vol. 65, №2. – P. 124-131.
19. Sandford A.J. Candidate genetic polymorphisms for asthma in Chinese schoolchildren from Hong Kong / A.J. Sandford, H.W. Chan, G.W. Wong // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2004. – Vol. 5, № 5. – P. 519-527.

