

И.В. Салтыкова, М.Б. Фрейдин, Е.Ю. Брагина, Л.М. Огородова,
В.П. Пузырев

ВОВЛЕЧЕННОСТЬ ГЕНОВ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ ЦИТОКИНОВ В ПАТОГЕНЕЗ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И ОПИСТОРХОЗА

УДК 575.191:616-002.5:616.981.49

Цель исследования. Анализ связи полиморфизма генов сигнальных молекул цитокинов с бронхиальной астмой и описторхозом.

Материалы и методы. Методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов генотипированы однонуклеотидные замены шести генов: *TBX21*, *STAT2*, *STAT4*, *SOCS7*, *PIAS4*, *PIAS3* у больных бронхиальной астмой (БА), описторхозом и их сочетанием.

Результаты. Показана ассоциация полиморфного варианта rs12756687 гена *PIAS3* с функцией внешнего дыхания у больных БА; установлена связь полиморфизма rs2066807 гена *STAT4* с БА, сочетающейся с описторхозом; продемонстрирована ассоциация полиморфизма rs3890580 гена *SOCS7* с уровнем IgE у больных описторхозом, но не у больных БА.

Заключение. Полученные данные могут стать основой для более углубленного изучения предрасположенности к гельминтной инвазии и модифицирующего влияния описторхоза на течение БА.

Ключевые слова: бронхиальная астма, описторхоз, полиморфизм, JAK-STAT-система.

Aim. Analysis of relationship between the gene polymorphisms of cytokine signal molecules with bronchial asthma and opisthorchiasis.

Materials and methods. Polymorphisms of *TBX21*, *STAT2*, *STAT4*, *SOCS7*, *PIAS4*, *PIAS3* were analysed by PCR-RELF genotyping in the patients with bronchial asthma (BA), opisthorchiasis and their combination.

Results. Association between the polymorphism rs12756687 *PIAS3* with function of lung among the patients with BA was shown, evidence of association was observed between the polymorphism rs2066807 *STAT4* and BA combined with opisthorchiasis, association of the polymorphism rs3890580 *SOCS7* with IgE level of the patients with opisthorchiasis but not with BA.

Conclusion. These data can serve a basis for further study of susceptibility to helminth infection and modifying effect of opisthorchiasis on BA course.

Keywords: asthma, opisthorchiasis, polymorphism, JAK-STAT-system.

Введение

Вопрос о «взаимоотношении» аллергических заболеваний и гельминтозов активно обсуждается в научной литературе. Гельминтозы и аллергические заболевания протекают со сходными клиническими проявлениями: повышение концентрации общего IgE в крови пациентов, эозинофилия и поляризация иммунного ответа по Th2-типу, характеризуются сходным цитокиновым профилем [6].

Бронхиальная астма (БА) является мультифакторным заболеванием, в развитии которого существенную роль играет наследственная компонента и факторы окружающей среды. Несмотря на то, что информация о вкладе различных генов в патогенез заболевания достаточно противоречива, существует ряд маркеров, роль которых доказана в развитии БА и атопии во многих работах с использованием разных дизайнов исследования. К ним относятся гены *IL-4*, *IL-13*, *IL-10*, *TNFA*, *IL4RA* и гены *HLA*. Параллельно накапливается все больше информации

о генетической предрасположенности к инфекционным заболеваниям. В частности, получены доказательства важности генетической составляющей в развитии гельминтозов [8]. Выявлены локусы и гены предрасположенности к аскаридозу, шистосомозу, филяриозу. Результаты этих исследований позволяют предположить наличие общих генетических основ реализации клинических фенотипов при аллергических заболеваниях и гельминтозах. Так, выявлены локусы предрасположенности к аскаридозу 13q32–q34 [5], шистосомозу 5q31–q33, которые являются общим и для аллергических заболеваний.

В контексте изучения общих генов предрасположенности аллергических заболеваний и гельминтозов интересными для исследования представляются гены молекул внутриклеточной цепи передачи сигнала в связи с их вовлеченностью в ключевые реакции иммунитета. В Сибирском регионе распространенным гельминтозом является описторхоз, вызываемый *Opisthorchis felinus* [1]. Роль генетических факторов в развитии описторхоза не ясна, поэтому описторхоз является привлекательным в качестве модели гельминтоза. Дизайн исследования предполагал формирование группы изолированной БА, больных описторхозом и группы больных с сочетанием этих заболеваний.

Материал и методы исследования

Обследовано 86 больных БА (23 мужчины, 63 женщины, средний возраст составил 38,0±12,1 лет), 104 боль-

ных описторхозом (25 мужчины, 79 женщин, средний возраст – 37,0±13,1 лет), 49 больных БА на фоне описторхоза (8 мужчин, 41 женщина, средний возраст – 43,0±12,3 лет) и 120 здоровых индивидов (21 мужчина, 103 женщины, средний возраст – 32,0±11,25 лет). Все обследованные – русские в возрасте от 18 до 60 лет, проживающие на территории г. Томска. У всех пациентов проведено исследование функции внешнего дыхания; оценивали показатели FEV1%, PEF1%, FVC%, проведены кожные аллергопробы, определен уровень IgE. Диагноз БА ставили согласно международным стандартам GINA (2006). Критериями включения были: положительные аллергопробы с одним и более аэроаллергенами, документированные сведения об обратимости обструкции более чем на 15% при проведении пробы с метахолином. Наличие подтвержденной ранее атопии (отягощенный семейный атопический анамнез, уровень IgE сыворотки >100 МЕ/мл).

Критерием включения в исследование больных описторхозом было обнаружение яиц описторхисов в фекалиях и/или дуоденальном содержимом. Также для диагностики описторхоза была использована ПЦР-тест – система, разработанная на базе Сибирского государственного медицинского университета. У больных описторхозом оценивали следующие клинические признаки: наличие лихорадки, диспепсического, интоксикационного, болевого синдромов, уровень общего IgE.

САЛТЫКОВА Ирина Владимировна – врач-биохимик, аспирант Сибирского гос. мед. ун-та, Ira.saltikova@mail.ru; **ФРЕЙДИН Максим Борисович** – к.б.н., с.н.с. НИИ МГ СО РАМН, факс: 8(3822) 51-37-44; **БРАГИНА Елена Юрьевна** – к.б.н., н.с. НИИ МГ СО РАМН, e-mail: bragina@ssmu.ru; **ОГОРДОВА Людмила Михайловна** – д.м.н., проф., ректор СибГМУ; **ПУЗЫРЕВ Валерий Павлович** – д.м.н., директор НИИ МГ СО РАМН.

Таблица 1

Локализация исследуемых генов, типы полиморфизмов, структура и температура отжига праймеров

Ген, локализация	Полиморфизм	Структура праймеров	Температура отжига праймеров
<i>STAT2</i> 12q13.2	rs2066807 экзон20	3'-GAGGGATTTCAGTTCAGAGCCA-5' 3'-GCTTTGTGAGTCGGAGCC-5'	64°C
<i>STAT4</i> 2q32.2-q32.3	rs7572482 интрон1	3'-CTGAGTCTTTTCGGAGAGCTGAA-5' 3'-CCACCAGCTCACAGACGGT-5'	60°C
<i>PIAS3</i> 1q21	rs12756687 интрон1	3'-TGAACCTGACCTGAAAACC-5' 3'-CCTCCTGGGAACAGGATAGG-5'	64°C
<i>PIAS4</i> 19p13.3	rs3760903 интрон1	3'-GGCTGCAGTTTACATACCCC-5' 3'-CAGAAGCCAGGTGTCTCTCGA-5'	64°C
<i>SOCS7</i> 17q12	rs3890580 интрон9	3'-GATCCAGGCATTTGCCCAT-5' 3'-CCATTGTGCAGTATCAGGG-5'	60°C
<i>TBX21</i> 17q21.32	rs11652969 интрон1	3'-TGCCTGTAGTCAAGGAGAGAAT-5' 3'-TGAAGAACTGACGCTCCG-5'	64°C

Лица, включенные в группу с сочетанием обоих заболеваний, удовлетворяли выше описанным критериям включения и имели диагноз БА на фоне описторхоза. Для формирования контрольной группы у здоровых индивидов исключали описторхоз и наличие аллергических заболеваний на момент обследования и в анамнезе.

ДНК выделяли из мононуклеаров периферической крови методом фе-

нол-хлороформной экстракции. Исследованы однонуклеотидные замены шести генов: *TBX21*, *STAT2*, *STAT4*, *SOCS7*, *PIAS4*, *PIAS3*. Генотипирование осуществляли с помощью ПДРФ-анализа. Дизайн праймеров осуществлялся с помощью программы Primer3, с использованием последовательностей генов базы данных Национального центра биотехнологической информации NCBI (табл.1). Амплификат под-

Таблица 2

Частота аллелей и генотипов у здоровых лиц и у больных бронхиальной астмой и описторхозом, %

Ген/поли-морфизм	Группа	Генотипы			p	Ал-лель	p
<i>SOCS7</i> rs3890580	БА	A/A	A/T	T/T		A	
		72,09	25,58	2,33	0,497	84,88	0,327
	Опи	82,83	15,15	2,02	0,476	90,40	0,692
	БА+Опи	80,95	19,05	0,00	0,800	90,48	0,817
	Контроль	78,38	20,72	0,90		88,74	
<i>TBX21</i> rs11652969	БА	A/A	A/G	G/G		A	
		10,47	47,67	41,86	0,892	34,30	0,977
	Опи	17,71	46,88	35,42	0,431	41,15	0,230
	БА+Опи	6,98	55,81	37,21	0,409	34,88	0,904
	Контроль	12,39	45,13	42,48		34,96	
<i>PIAS4</i> rs3760903	БА	A/A	A/G	G/G		A	
		31,40	50,00	18,60	0,526	56,40	0,328
	Опи	34,02	47,42	18,56	0,314	57,73	0,197
	БА+Опи	30,23	51,16	18,60	0,726	55,81	0,519
	Контроль	24,55	52,73	22,73		50,91	
<i>PIAS3</i> rs12756687	БА	C/C	C/G	G/G		C	
		20,24	36,90	42,86	0,147	38,69	0,215
	Опи	14,14	48,48	37,37	0,396	38,38	0,215
	БА+Опи	17,78	37,78	44,44	0,435	36,67	0,526
	Контроль	10,43	43,48	46,09		32,17	
<i>STAT2</i> rs2066807	БА	C/C	C/G	G/G		C	
		82,14	17,86	0,00	0,238	91,07	0,446
	Опи	84,04	14,89	1,06	0,649	91,49	0,518
	БА+Опи	91,11	4,44	4,44	0,226	93,33	0,898
	Контроль	88,54	10,42	1,04		93,75	
<i>STAT4</i> rs7572482	БА	A/A	A/G	G/G		A	
		7,06	43,53	49,41	0,560	28,82	0,698
	Опи	3,06	45,92	51,02	0,067	26,02	0,292
	БА+Опи	2,27	59,09	38,64	0,040	31,82	0,985
	Контроль	11,40	39,47	49,12		31,14	

Примечание. p- достигнутый уровень значимости различий между генотипами и аллелями (по точному тесту Фишера).

ваниями и качественными признаками использовали точный тест Фишера. Для анализа количественных признаков данные проверяли на нормальность распределения по критерию Колмогорова-Смирнова. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Для оценки статистической значимости различий показателей, не подчиняющихся закону нормального распределения, использовали непараметрические критерии Манна-Уитни (U-тест) и Краскела-Уоллиса.

Результаты и обсуждение

Для исследуемых полиморфных вариантов генов *PIAS3*, *PIAS4*, *SOCS7*, *TBX21* частоты генотипов соответствовали ожидаемым при РХВ во всех анализируемых группах. Отклонение от РХВ в группе больных БА на фоне описторхоза показано для *STAT2* за счет избытка гомозигот rs2066807 G/G, также в этой группе частоты генотипов для *STAT4* не соответствовали ожидаемым при РХВ в связи с избытком гетерозигот. В других группах для полиморфизмов *STAT2* и *STAT4* отклонения от РХВ не наблюдали.

Частоты генотипов и аллелей в анализируемых группах представлены в табл.2.

TBX21 является критическим транскрипционным фактором для продукции IFN-γ и может играть существенную роль в Th1/Th2 балансе. Показана связь варианта -7947 гена *TBX21* с БА у европеоидов [10]. В то же время в финской популяции 15 проанализированных однонуклеотидных замен *TBX21* не ассоциированы с БА и повышенным уровнем IgE [4]. Нами также не обнаружено связи rs11652969 *TBX21* с БА и описторхозом.

Гены семейства *STAT*, белковые продукты которых могут участвовать в развитии эозинофилии и повышении уровня IgE, вероятно, могут вносить существенный вклад в развитие предрасположенности к аллергическим заболеваниям. Сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции *STAT* связаны с эндотелийной экспрессией, транскрипцией и регуляцией цитокинов, включая интерлейкины, синтазу оксида азота, p21 и интерфероны. После рецепторно-лигандного взаимодействия транскрипционные факторы *STAT* фосфорилируются и в ядре осуществляют взаимодействие с сайтами транскрипции специфических генов,

активируя их экспрессию. У детей тайваньской популяции, страдающих БА, выявлены различия частот генотипов и аллелей rs2066807 *STAT2* по сравнению со здоровыми индивидами, но не ассоциация полиморфизма с параметрами функции внешнего дыхания FEV1, FEV1/FVC. Это указывает на связь маркера с возможной предрасположенностью БА, но не с тяжестью заболевания [9]. В нашем исследовании для rs2066807 *STAT2* не показано связи с БА и описторхозом, также не выявлены ассоциации с клиническими признаками ни в одной из исследуемых групп.

Ген *STAT4* предложен как ген-кандидат предрасположенности БА по результатам полногеномного исследования. Исследования, проведенные для полиморфизма 90089T/C в 11 интроне гена *STAT4*, показали ассоциацию с БА у китайцев [7], также этот полиморфный вариант связан с повышенным уровнем специфического IgE у корейцев, больных БА [3]. Однако при исследовании больных БА в Финляндии не выявлено связи заболевания с анализируемым полиморфизмом [2].

В исследованной популяции г. Томска установлены различия частот генотипов rs2066807 *STAT4* между больными БА на фоне описторхоза и здоровыми индивидами ($p=0,04$) за счет преобладания в контрольной группе генотипа A/A (11,4%) по сравнению с больными с сочетанием БА и описторхоза (2,27%). Полиморфный вариант *STAT4* в исследуемой группе связан не только с интегральным фенотипом БА, но и с клинически важным признаком: гетерозиготный генотип G/A ассоциирован с низкими значениями FEV1% ($p=0,03$). Анализируемый полиморфный вариант не ассоциирован с клиническими признаками описторхоза и БА в других группах. Ассоциация с полиморфным вариантом *STAT4*, полученная только в группе больных БА на фоне описторхоза доказывает модифицирующее влияние описторхоза на клиническое течение БА.

Накапливается все больше информации о роли генов семейства *STAT* в предрасположенности мультифакторным заболеваниям, в частности БА. Однако гораздо меньше исследований, посвященных анализу вклада суп-

рессоров цитокиновой сигнализации SOCS и PIAS. Эти белки играют роль ингибиторов активированных молекул *STAT*, действующими по механизму обратной связи, показано их участие в дифференцировке и развитии Т-клеток. Их рассматривают как новые возможные мишени для терапии аллергических заболеваний.

В результате проведенного исследования показана ассоциация rs12756687 *PIAS3* с показателем внешнего дыхания FEV1% у больных изолированной БА ($p=0,0217$), также этот полиморфный вариант связан с FVC% у больных БА на фоне описторхоза ($p=0,0205$). В обоих случаях генотип C/C связан с более высокими значениями показателей внешнего дыхания, что является благоприятным прогностическим признаком в отношении БА. Полиморфный вариант гена *PIAS3* не ассоциирован с другими клиническими признаками БА и описторхоза. Роль *PIAS-4* в развитии иммунозависимых заболеваний не изучена. В результате проведенного исследования не показано связи rs3760903 гена *PIAS4* с БА, описторхозом и клиническими признаками анализируемых заболеваний.

Ген *SOCS7* rs3890580 ассоциирован с уровнем IgE у больных описторхозом – генотип T/T связан с более низкими значениями признака. У больных БА этой ассоциации не выявлено. Уровень общего IgE является важным количественным показателем, исследуемым при анализе предрасположенности к гельминтной инвазии, он коррелирует с интенсивностью инвазии. Сложно предположить механизм связи *SOCS7* с продукцией IgE, поскольку не совсем понятна роль каждого из ингибиторов транскрипционных факторов *STAT* в реализации иммунного ответа. Однако полученные данные позволяют предполагать различные механизмы повышения уровня IgE при БА и описторхозе.

Заключение

Проведенное исследование показало ассоциацию полиморфного варианта rs12756687 гена *PIAS3* с функцией внешнего дыхания у больных БА независимо от факта описторхозной инвазии; установлена связь полиморфизма rs2066807 гена *STAT4* с БА на фоне

описторхоза; продемонстрирована ассоциация полиморфизма rs3890580 гена *SOCS7* с уровнем IgE у больных описторхозом, но не у больных БА.

Исследование выполнено при поддержке гранта № 02.512.11.2162 от «01» августа 2007 г в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы». Выражаем благодарность Васильевой М.В., Черевко Н.А., Огородовой Л.М. за помощь в сборе биологического материала.

Исследование выполнено при поддержке гранта № 02.512.11.2162 от «01» августа 2007 г в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы». Выражаем благодарность Васильевой М.В., Черевко Н.А., Огородовой Л.М. за помощь в сборе биологического материала.

Литература

1. Евдокимова Т.А. Влияние хронической описторхозной инвазии на клиническое течение и иммунный ответ при atopической бронхиальной астме у детей / Т.А. Евдокимова, Л.М. Огородова // Педиатрия. – 2005. – №6. – С. 12-17.
2. Association analysis of common variants of *STAT6*, *GATA3*, and *STAT4* to asthma and high serum IgE phenotypes / M. Pykalainen [et al.] // J Allergy Clin Immunol. – 2005. – V. 115. – P. 80-7.
3. Association analysis of signal transducer and activator of transcription 4 (*STAT4*) polymorphisms with asthma / B. L. Park [et al.] // J Hum Genet. – 2005. – 50. – P. 133-8.
4. Association study of 15 novel single-nucleotide polymorphisms of the T-bet locus among Finnish asthma families / E. Ylikoski [et al.] // Clin Exp Allergy. – 2004. – V. 34. – P. 1049-55.
5. Genes on chromosomes 1 and 13 have significant effects on *Ascaris* infection / S. Williams-Blangero [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2002. – V. 99. – P. 5533-5538.
6. Genetic haplotypes of Th-2 immune signalling link allergy to enhanced protection to parasitic worms / M. Moller [et al.] // Hum Mol Genet. – 2007. – V. 16. – P. 1828-36.
7. Polymorphisms of *STAT-6*, *STAT-4* and IFN-gamma genes and the risk of asthma in Chinese population / Y. Li [et al.] // Respir Med. – 2007. – V. 101. – P. 1977-81.
8. Quinnell R.J. Genetics of susceptibility to human helminth infection // Int J Parasitol. – 2003. – V. 33. – P. 1219-31.
9. *STAT2* related genotypes and allele but not *TLR4* and *CD40* gene polymorphisms are associated with higher susceptibility for asthma / H. Yao-Yuan [et al.] // Int. J. Biol. Sci. – 2009. – V. 5. – P. 74-81.
10. T-bet polymorphisms are associated with asthma and airway hyperresponsiveness / B.A. Raby [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. – 2006. – V. 173. – P. 64-70.