

ЖАННА АЛЕКСАНДРОВНА МИРОНОВА

кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной терапии им. академика М. В. Черноруцкого, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова
zhanmir@mail.ru

АЛЛЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ R130Q ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА 13, C590T ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА 4, C3435T ГЕНА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ – МАРКЕРЫ РАЗВИТИЯ РИСКА И СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

В патогенез бронхиальной астмы вовлечены различные функционально взаимосвязанные гены. Комплексное тестирование генов интерлейкина 4 и 13, отвечающих за иммунный ответ, гена множественной лекарственной устойчивости, ассоциированного с транспортом лекарственных препаратов, позволяет выявить маркерные профили для оценки степени тяжести и диагностики различных фенотипов астмы.

Ключевые слова: бронхиальная астма, полиморфизм, ген, интерлейкин 4, интерлейкин 13

Согласно современным представлениям о генетической предрасположенности к бронхиальной астме (БА), для развития этого заболевания необходимо сочетание аллельных вариантов генов, формирующих неблагоприятный наследственный фон, реализующийся под действием факторов внешней среды. Генная сеть БА достаточно сложная и содержит много генов-кандидатов. На сегодняшний день известно более 150 генов, функция белковых продуктов которых тесно связана с развитием астмы и атопией (гены цитокинов и их рецепторы, гены главного комплекса гистосовместимости, гены медиаторов воспаления и их рецепторов, гены бета2-адренорецепторов, глюкокортикоидного рецептора, мускаринового рецептора, гены биотрансформации ксенобиотиков).

Генетический скрининг позволил обнаружить на 10 различных хромосомах 15 локусов, ассоциированных с БА. Подтверждено сцепление БА с локусами, в которых локализованы гены-кандидаты данного заболевания (5q31.1-33, 6p12-21.2, 11q12-13, 12q14-24.1, 13q12-22, 14q11-12, 16p12.1-11.2 и Xq28/Yq12 и другие). Несмотря на явные успехи в этой области, до полного понимания механизмов взаимодействия генетических и средовых факторов в детерминации астмы все еще далеко.

Большинство пациентов с астмой имеют специфический паттерн воспаления в дыхательных путях, который характеризуется дегрануляцией тучных клеток, инфильтрацией эозинофилов и увеличением количества активированных клеток Т-хелперов 2-го типа (Th2). Th2 синтезируют интерлейкин (IL) 4 и IL13, которые воздействуют на В-клетки, приводя к продукции иммуноглобулина Е (IgE), IL5 влияет на активность эозинофилов, IL9 регулирует пролиферацию и дифференцировку тучных клеток [20]. С точки

зрения генетики интересным фактом оказалось то, что гены наиболее важных в развитии астмы интерлейкинов IL4, -5, -9, -13 расположены тандемно в одном кластере на хромосоме 5q31-33. Поэтому гены IL, картированные в регионе 5q31-33, становятся привлекательным объектом по поиску наследственных факторов предрасположенности к астме. Полиморфизм генов IL4 и IL13 и их рецепторов вносит вклад в комплексную регуляцию атопии.

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА IL13 ПРИ АСТМЕ

Одним из кандидатов на роль главного индуктора аллергии является IL13, обладающий сходной биологической активностью с IL4.

Первые аллельные варианты были открыты в двух интронах (G543C в первом интроне и T1922C – в третьем), а также в кодирующей части (A2043G и A2579C в транслируемом и 3'-нетранслируемом регионе четвертого экзона соответственно) гена IL13 [17]. Позднее полиморфные варианты были определены в промоторном участке C1055T гена IL13 [15].

В японской и европейских популяциях была выявлена ассоциация полиморфизма A2043G (Arg130Gln) гена IL13 с атопической бронхиальной астмой и увеличенным уровнем сывороточного IgE [8]. В китайской популяции была выявлена ассоциация между аллельными вариантами Arg130Gln гена IL13 с уровнем общего IgE, но не с развитием и не с тяжестью БА [12]. В исследовании С. А. Мазуриной с соавторами [3] у больных атопической БА частота аллеля Arg130 гена IL13 составляла 51 и 21 % у здоровых неродственных русских жителей Москвы соответственно. Уровень IgE был повышен у больных гомозигот по аллелю Arg и гетерозигот гена IL13

[3]. В японской и британской популяциях была выявлена ассоциация между аллельными вариантами Gln110Arg гена IL13 и астмой, но при этом не было выявлено связи данного полиморфизма с уровнем общего IgE [10].

Функциональный полиморфизм гена IL13 связан с заменой аргинина (Arg) на глутамин (Gln) в положении 110 и ассоциирован со снижением аффинности связывания IL13 с рецепторной субъединицей IL13R α 2, выполняющей роль рецептора-ловушки, а также со снижением блокирования биологической активности IL13. Эта замена никак не влияла на связывание IL13 с субъединицей IL13R α 1 и на передачу сигнала от клеточного рецептора. Больные БА, гомозиготы по аллелю глутамина, имели повышенные уровни IL13 в плазме крови, видимо, вследствие нарушения связывания IL13 мембранными растворимыми IL13R α 2 рецепторами и его удаления из циркуляции.

Установлено, что в британской популяции полиморфизм A1398G IL13R α 1 на хромосоме Xq13 ассоциирован с высоким уровнем IgE. Эти данные сопоставимы с данными об аллельных вариантах гена рецептора IL4 (L4R α) у японцев и немцев.

Таким образом, определенные аллельные варианты гена IL13 могут содействовать развитию астмы с высоким уровнем IgE и БА у различных представителей многих этнических групп [9].

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА IL4

Интерлейкин 4 является важнейшим цитокином воспаления, в том числе обусловленного развитием аллергического IgE-ответа. Вследствие центральной роли IL4 в развитии и поддержании воспаления при БА анализ генетической регуляции активности этого цитокина имеет большое значение для понимания механизмов развития астмы и БА. На сегодняшний день данные о полиморфных вариантах гена IL4 противоречивы и не дают однозначного ответа на вопрос об их патогенетической роли. E. G. Burchard с соавторами обнаружили, что полиморфизм в промоторной области C589T гена IL4 усиливает его транскрипцию [6].

В американской и японской популяциях было выявлено, что функциональный полиморфизм C590T гена IL4, связанный с более высокой продукцией IL4, был ассоциирован с повышением сывороточного уровня IgE и с клиническими проявлениями БА. Однако французскими исследованиями подобной ассоциации не было выявлено. При исследовании австралийской популяции показана ассоциация данного полиморфизма с увеличением специфического IgE к клещам домашней пыли, но не с увеличением общего IgE [1].

Также исследовалась связь между вышеуказанным полиморфизмом гена IL4 и стероидорезистентной бронхиальной астмой (СРБА).

Показано, что повышенная экспрессия аллеля 590T гена IL4 была констатирована в группе больных СРБА по сравнению с пациентами с гормоночувствительной БА [18].

Полиморфизм в области 3'-UTR гена IL4, находящийся в сильном неравновесии по сцеплению с транзицией -589C/T, может иметь прогностическое значение в отношении степени тяжести atopической БА [7]. Установлено, что полиморфные варианты генов IL4, IL5, IL9, IL4R α , IL5 вносят небольшой (до 5–10 %), но статистически значимый вклад в изменчивость количественных, патогенетически и клинически значимых для БА признаков: показатели легочной функции, уровни иммуноглобулинов, бронхиальная гиперреактивность [7].

При обследовании 200 больных БА, проживающих в северо-западном регионе России, отмечено статистически достоверное увеличение частоты T-аллеля IL4 по сравнению с контрольной группой (29,8 и 18,1 % соответственно). Вместе с тем распределение генотипов по гену IL4 у больных БА достоверно отличалось от такового в контрольной группе. Так, частота генотипа 590C/T гена IL4 была достоверно повышена у больных БА (51,1 %) по сравнению с контрольной группой (27,5 %) (OR = 2,74; CI: 1,27–5,92). Интересно, что распределение генотипов по гену IL4 у больных БА в зависимости от пола отличалось высокой достоверностью ($p < 0,01$), тогда как в контрольной выборке такой зависимости не было отмечено. Установлено, что среди больных БА мужского пола достоверно чаще встречались гетерозиготы гена IL4 (81,8 %), чем среди женщин с БА (41,7 %) и мужчин контрольной группы (28,2 %). Согласно коэффициенту соотношения шансов, риск развития аллергической БА у мужчин при наличии генотипа -590C/T IL4 увеличивался более чем в 11 раз (OR = 11,5; CI: 2,57–5,87) [1]. Следует отметить, что сочетание двух редких аллельных вариантов генов IL4 (-590T) и IL4R α (-576R) достоверно чаще встречалось в группе больных БА по сравнению с контрольной группой здоровых людей. Риск развития atopической БА при этом возрастает более чем в 3 раза [2]. Другой полиморфизм гена IL4 3'-UTR 717 G/G ассоциирован с тяжелым течением БА у якутов [4].

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА IL4R α ПРИ АСТМЕ

Свое действие IL13 и IL4 осуществляют посредством взаимодействия с рецепторами на поверхности клеток. Важным является тот факт, что рецепторы обоих цитокинов обладают общей α -цепью (IL4R α), которая участвует в передаче сигнала внутрь клетки, тем самым реализует функции этих цитокинов.

Вариант Ile50Val гена рецептора α IL4 (IL4R α) ассоциирован с бронхиальной астмой и повы-

шенным уровнем общего IgE, а также со специфическим IgE к аллергенам клеща домашней пыли [14]. В японской популяции была отмечена тесная связь между полиморфизмом Ile50Val гена IL4Rα и уровнем IgE [5]. Вариант замены аминокислоты аргинина на глутамин в положении 551 гена IL4Rα был обнаружен в популяции британцев при изучении пациентов с экземой и гипер-IgE синдромом [13]. Противоположные данные были обнаружены в популяции немцев. Так, у носителей Arg551Gln гена IL4Rα был выявлен низкий уровень IgE [11].

РОЛЬ ТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ

Транспортные белки играют важную роль в регуляции абсорбции, распределения и экскреции различных веществ, в том числе цитокинов. Одним из членов семейства транспортных белков Р-гликопротеин-170 (PGP-170) кодируется геном человека ABCB1, именуемый также MDR1 (ген множественной лекарственной устойчивости). Продукт гена PGP-170 – АТФ-зависимый транспортный белок – представляет собой специальную помпу для выведения из клетки различных липофильных соединений (стероидных гормонов, цитокинов, продуктов метаболизма клетки) против градиента концентрации [19]. Установлено, что полиморфизм в 26-й экзоне С3435Т гена MDR1 коррелирует с функционированием и уровнем экспрессии PGP-170. В ряде исследований показано, что высвобождение цитокинов – интерферона-гамма, IL2, IL4 – и фактор некроза опухоли альфа из мононуклеаров периферической крови достоверно меньше у носителей 3435ТТ, чем у лиц с генотипом СТ гена MDR1 [16].

На кафедре госпитальной терапии им. академика М. В. Черноруцкого (заведующий кафедрой – доктор медицинских наук, профессор В. И. Трофимов) совместно с отделом молекулярно-генетических технологий НИЦ ГО ВПО СПбГМУ им. академика И. П. Павлова (заведующий лабораторией – член-корреспондент РАН, профессор М. В. Дубина) проводится работа по изучению генетических аспектов терапевтической резистентности у больных БА.

Цель исследования – оценить частоту встречаемости вариантов С3435Т гена MDR1, R130Q гена IL13, С590Т гена IL4 у больных БА в зависимости от степени тяжести заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-лабораторное обследование больных осуществлялось на базе клиники госпитальной терапии ГОУ ВПО СПбГМУ им. академика И. П. Павлова Росздрава.

Обследовано 105 астматиков, из них 57 (54,29 %) пациентов с гормонозависимой БА и 48 (45,71 %) больных БА средней степени тяжести. Все пациенты не состояли в кровном родстве.

Обследованная популяция была представлена жителями Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Диагноз устанавливался согласно международной классификации болезней 10-го пересмотра с учетом рекомендаций Европейского респираторного общества и Российского руководства по диагностике, лечению и профилактике БА. Для постановки диагноза БА применялись общеклинические и лабораторные методы обследования, включая цитологическое исследование мокроты и исследование функции внешнего дыхания.

Группу контроля составили 103 человека. Критерии отбора в контрольную группу были следующие: 1) возраст от 20 до 75 лет, 2) отсутствие курения в анамнезе, 3) отсутствие хронической бронхолегочной и аутоиммунной патологии, а также онкопатологии, 4) отсутствие аллергических заболеваний в анамнезе, 5) неотягощенная наследственность в отношении аллергических заболеваний.

Молекулярно-генетические методы исследования: геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции; для идентификации аллельных вариантов исследуемых генов использовали амплификацию соответствующих фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом.

Статистический анализ полученных данных выполняли с использованием пакета статистической программы Statistica 7.0. Средние величины представлены как $M \pm m$, где M – среднее, m – стандартная ошибка среднего. Сравнение частот аллелей и генотипов оценивалось при помощи критерия χ^2 и точного метода Фишера (Fisher exact test). Для оценки достоверности различий между средними использовался непараметрический тест Манна – Уитни (Mann – Whitney U test). При $p < 0,05$ различия между сравниваемыми показателями считались достоверными, при $p < 0,1$ различия расценивались как тенденция.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было выявлено, что аллель 3435С гена MDR1 чаще встречался в группе больных тяжелой БА (0,57), $\chi^2 = 21,34$ ($p = 0,0001$) и БА средней степени тяжести (0,48), $\chi^2 = 8,68$ ($p = 0,003$) по сравнению с группой контроля (0,31). Частота встречаемости генотипа СС гена MDR1 была больше у больных БА средней (29,17 %) и тяжелой степени тяжести (29,82 %) по сравнению с группой контроля (8,74 %), $\chi^2 = 11,99$ ($p = 0,005$) и $\chi^2 = 10,58$ ($p = 0,001$) соответственно.

Генотип RR гена IL13 встречался у 42,86 % больных тяжелой БА, в группе контроля – 65,69 %, $\chi^2 = 7,71$, $p = 0,005$. Вместе с тем в груп-

пе контроля агрессивный генотип QQ гена IL13 встречался реже (3,92 %), чем в группе больных тяжелой БА (8,93 %). При генотипировании было выявлено, что частота встречаемости гетерозигот гена IL13 была чаще среди больных тяжелой БА (48,21 %), чем в группе контроля (30,39 %). Важно отметить, что сочетание генотипов CC гена MDR1 и RQ гена IL13 встречалось у 14,29 % больных тяжелой БА, а в группе контроля у 1,96 %, $\chi^2 = 9,26$ ($p = 0,004$). Согласно коэффициенту соотношения шансов, носительство данных генотипов повышало в 8,3 раза риск развития тяжелой БА ($OR = 8,33$; $CI_{95} \% 2,39-28,99$). Мы не получили достоверного различия в распределении генотипов гена IL4. По данным литературы, аллель 590T гена IL4 и аллель QQ гена IL13 являются агрессивными и вносят свой вклад в вариабельность цитокинового профиля; соответственно, они ассоциированы с более тяжелым течением БА. Тем не менее, по нашим данным, благоприятное сочетание генотипов TT гена MDR1 + CC гена IL4 + RR гена IL13 реже встречалось у больных БА (1,92 %) по сравнению с группой контроля – 14,56 %, $\chi^2 = 10,97$ ($p = 0,001$).

В результате наших исследований выявлено, что в развитии такого сложного заболевания, как БА, большую роль играют не столько отдельные аллели генов, сколько их сочетание, или «генетические ансамбли». Нами впервые показано, что сочетание генотипа CC гена MDR1 и RQ гена IL13 повышает риск развития тяжелой БА. Наличие ассоциации генотипов TT гена MDR1 + CC гена IL4 + RR гена IL13 снижает риск развития тяжелой гормонозависимой БА и связано с более благоприятным течением заболевания. Частота встречаемости данных ассоциаций, вероятно, может быть неодинакова в популяциях, обуславливая тем самым различия у разных народов. Поэтому перспективным направлением исследований генетических основ БА является изучение вклада конкретных сочетаний аллелей в подверженность болезни.

Генетические маркеры в скором будущем позволят проводить скрининг для выявления различных фенотипов БА, включая неконтролируемую БА, что будет способствовать усовершенствованию и оптимизации подходов прогнозирования заболевания, степени его тяжести и разработке персонализированной терапии БА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В. С. Баранова. СПб., 2009. 528 с.
2. Келембет Н. А., Гембицкая Т. Е., Иващенко Т. Э., Лаврова О. В. Ассоциация полиморфизма генов IL4 и IL4Ra с развитием аллергической бронхиальной астмы // *Болезни органов дыхания*. 2008. № 1. С. 36–41.
3. Мазурина С. А., Казначеев В. А., Воронько О. А. Выявление полиморфизма Arg130Gln в гене IL13 и Ile50Val в гене α -цепи рецептора IL4 при atopической бронхиальной астме // *Медицинская иммунология*. 2007. Т. 8. № 2–3.
4. Соловьева Н. А., Максимова Н. Р., Николаева Л. Е. и др. Полиморфизм генов кандидатов atopической бронхиальной астмы в якутской популяции // *Генетика народонаселения и патология*. Вып. 8. Томск, 2007. С. 122–123.
5. Arima K. Upregulation of IL13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002. Vol. 109. P. 980–987.
6. Burchard E. G., Silverman E. K., Rosenwasser L. J. et al. Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV(1) in asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999. Vol. 160. P. 919–922.
7. Freidin M. V., Kobyakova O. S., Ogorodova L. M., Puyrev V. P. Association of polymorphisms in the human IL4 and IL5 genes with atopical bronchial asthma and severity of the disease // *Comparative Func. Genom.* 2003. Vol. 4. P. 346–350.
8. Graves P. E., Kabesch M., Halonen M. et al. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000. № 105. P. 506–513.
9. Heinzmann A., Mao X.-Q., Akaiwa M. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atop // *Hum. Mol. Genet.* 2000. Vol. 9(4). P. 549–559.
10. Kruse S., Forster J., Kuehr J., Deichmann K. A. Characterization of the membrane-bound and a soluble form of human IL-4 receptor α produced by alternative splicing // *Int. Immunol.* 1999. Vol. 11. P. 1965–1970.
11. Leung T. F., Tang L. S., Chan I. H. et al. A polymorphism in the coding region of interleukin-13 gene is associated with atop but not asthma in Chinese children // *Clinical and Experimental Allergy*. 2001. Vol. 31. P. 1515–1521.
12. Mitsuyasu H., Izuhara K., Mao X.-Q. et al. Ile50Val variants or IL4Ra upregulates IgE synthesis and associates with atopical asthma // *Nature Genet.* 1998. Vol. 19. P. 119–120.
13. Mitsuyasu H., Yanagihara Y., Mao X.-Q. et al. Dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor α -chain in IgE synthesis // *J. Immunol.* 1999. Vol. 162. P. 1227–1231.
14. Noguchi E., Shibasaki M., Arinami T. et al. Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese // *Clin. Exp. Allergy*. 1998. Vol. 28. P. 449–453.
15. Pawlik A., Baskiewicz-Masiuk M., Machalinski B. et al. Involvement of C3435T and G2677T multidrug resistance gene polymorphisms in release of cytokines from peripheral blood mononuclear cells treated with methotrexate and dexamethasone // *Eur. J. Pharmacol.* 2005. Dec. 28. № 528(1–3). P. 27–36.
16. Rosenwasser U., Klemm D. J., Dresback J. K. et al. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atop // *Clin. Exp. Allergy*. 1995. Vol. 25. P. 74–78.
17. Rosenwasser L., Klemm J. D., Klemm J. M. et al. Association of asthmatic steroid intensivity with an IL-4 gene promoter polymorphism // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001. Vol. 107. P. 235.
18. Howard T. D., Whittaker P. A., Zaiman A. L. et al. Identification and association of polymorphisms in the interleukin-13 gene with asthma and atop in a Dutch population // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001. Vol. 25 (3). P. 377–384.
19. Ueda K., Okamura N., Hirari M. et al. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone and dexamethasone, but not progesterone // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267(34). P. 24248–24252.
20. Wills-Karp M., Chiaramonte M. Interleukin-13 in asthma // *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2003. Med. 9(1). P. 21–27.