

УДК 616-056.43:577.22

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-13 И СИСТЕМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГОПАТОЛОГИЕЙ

Д.В. Бахаев¹, А.М. Стенкова¹, Ю.В. Иванова², О.В. Щеголева², Е.В. Просекова², В.А. Рассказов¹, М.П. Исаева¹¹Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159),²Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)**Ключевые слова:** генетический полиморфизм, интерлейкин-13, глутатион-S-трансферазы, аллергические заболевания.

Представлены результаты генотипирования интерлейкина-13 в отношении трех полиморфных локусов (-1512A>C, -1112C>T и +2044G>A), а также исследования нуль-полиморфизма генов *M1* и *T1* глутатион-S-трансфераз (GST) у детей Владивостока с аллергическими заболеваниями (73 человека) и без аллергопатологии (27 человек). В ходе исследования не установлено связи «нулевых» генотипов *GSTM1* и *GSTT1* с развитием аллергических заболеваний. Обнаружено значимое преобладание гетерозиготного носительства варианта -1112C/T среди больных (58% против 22,2% в контроле). В группе детей с клиническими проявлениями аллергических заболеваний достоверно чаще встречались гетерозиготные состояния одновременно по 2–3 полиморфным локусам (48,4% против 18,5% в контроле). Генотипирование интерлейкина-13 по трем полиморфным локусам может быть рекомендовано к использованию как дополнительный критерий групп риска реализации аллергических заболеваний.

Аллергические заболевания по распространенности, склонности к хронизации и социально-экономическому ущербу помещены в группу глобальных проблем здравоохранения [4]. В основе развития аллергических заболеваний, таких как атопическая бронхиальная астма, атопический дерматит и аллергический ринит, лежит иммуноглобулин-Е-зависимое аллергическое воспаление. Исходя из сложнаследуемой (мультифакториальной) природы этой группы заболеваний, определяемой комплексным взаимодействием генетических и средовых факторов, важной задачей становится выяснение «неблагоприятных» сочетаний полиморфных вариантов генов, которые с высокой долей вероятности могут привести к развитию аллергопатологии.

Центральную роль в аллергическом воспалении играет секретлируемый Т-хелперами 2-го типа интерлейкин-13 (IL-13), ключевыми свойствами которого являются переключение В-лимфоцитов на синтез иммуноглобулина Е, индукция бронхиальной гиперреактивности и гиперсекреции слизи, активация эозинофилов и привлечение их в очаг воспаления [1, 5, 7, 14]. Очевидно, что полиморфизм гена IL-13 (*Arg130Gln*) определяет разнообразие его фенотипических проявлений. К настоящему времени в этом гене идентифицирован ряд мутаций, наиболее общими из которых являются две в промоторном участке (-1512A>C и -1112C>T) и одна в кодирующей части (+2044G>A). Показано, что мутации в промоторной части гена вызывают

увеличение транскрипции IL-13, а миссенс-мутация +2044A (замена *Arg130* на *Gln*) приводит к появлению функционально-активного варианта цитокина и увеличению уровня сывороточного иммуноглобулина Е [8, 9, 13]. При сочетании мутаций по локусам -1112T/T и +2044A/A наблюдается синергичный эффект в виде гиперэкспрессии высокоактивного варианта IL-13 [13]. К генам, предрасполагающим к развитию аллергических заболеваний, т.е. способным влиять на увеличение аллергенной нагрузки в условиях, например, сниженной активности биотрансформации ксенобиотиков и медиаторов воспаления, относят гены глутатион-S-трансфераз (GST). Для них характерен высокий полиморфизм, при котором белковый продукт может отсутствовать или различаться по уровню ферментативной активности [3, 6]. Полиморфизм по «нулевым» аллелям, описанный для генов *GSTM1* и *GSTT1*, наиболее интенсивно изучается при различных патологиях, в том числе атопической бронхиальной астме и атопическом дерматите, при этом литературные данные об ассоциации «нулевых» типов этих генов с риском развития аллергопатологии противоречивы [2, 10–12].

Целью настоящего исследования явился анализ полиморфизма гена IL-13 в отношении трех полиморфных локусов (-1512A>C, -1112C>T и +2044G>A), а также нуль-полиморфизма генов *GSTM1* и *GSTT1* у детей с аллергопатологией.

Материал и методы. Обследованы 73 ребенка с атопической бронхиальной астмой, аллергическим ринитом и атопическим дерматитом в возрасте 3–15 лет. В качестве контроля послужила группа сверстников (27 человек) без каких-либо признаков аллергопатологии и с неотягощенным наследственным анамнезом. Материалом для получения ДНК служили лейкоциты периферической крови или эпителиальные клетки слизистой оболочки щеки. ДНК выделяли с использованием набора Genomics DNA Purification Kit (Fermentas, Евросоюз). Генотипирование ДНК-полиморфизмов гена IL-13 проводили методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, используя структуры праймеров, температурный режим и условия анализа, описанные в работе P.E. Graves et al. [8]. Детекцию полиморфных маркеров I/D генов *GSTM1* и *GSTT1* выполняли с использованием наборов ГосНИИгенетики (Москва). Содержание общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови определяли с использованием тест-системы фирмы «ВекторБест» (Новосибирск). Статистическую обработку материала

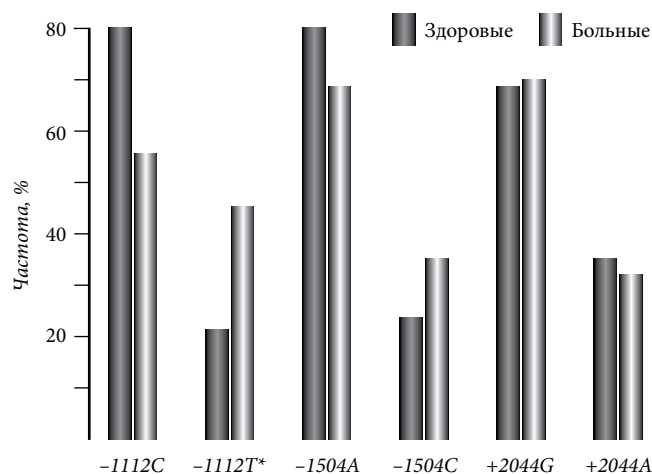


Рис. 1. Распределение аллелей гена IL-13 у здоровых детей и детей с аллергическими заболеваниями (* – разница статистически значима).

проводили в программе Statistica 6. При сравнении частот генотипов применяли стандартный критерий χ^2 Пирсона. При условии, когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали критерий χ^2 с поправкой Йейтса. Отношение шансов подсчитывали по методу Woolf с 95 %-ным доверительным интервалом.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Число генов-кандидатов предрасположенности к аллергическим заболеваниям достаточно велико, тем не менее, исходя из особенностей развития данной патологии, первостепенными для исследований являются гены, ответственные за гипериндукцию синтеза иммуноглобулина Е – одного из основных маркеров аллергопатологии. По нашим данным, частота встречаемости аллеля +2044G (*Arg130*) составила 67,4 % в группе детей с аллергопатологией и 66,1 % среди здоровых лиц, а частота встречаемости минорного аллеля +2044A (*Gln130*) – 32,6 и 33,9 % соответственно. В группе здоровых частота встречаемости нормальных аллелей -1112C и -1504A была одинаковой и составила 78 % (доля минорных аллелей – 22 %). Однако в группе с аллергическими заболеваниями наблюдалось преобладание минорных аллелей -1112T и -1504C, но статистически значимым было только увеличение частоты встречаемости аллеля -1112T (рис. 1, табл.).

Анализ распределений генотипов зафиксировал неравномерность для всех трех полиморфных локусов гена IL-13 (табл.). Статистический анализ распределений генотипов не дал достоверно значимых различий, за исключением -1112C/T: гетерозиготное носительство этого варианта наблюдалось среди больных в 2 раза чаще (58 % против 22,2 % в контроле). Следует отметить, что распределение генотипов -1504A>C в группе контроля было близким к распределению полиморфных вариантов в европейской популяции (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1881457), тогда как распределение генотипов по полиморфному локусу -1112C>T соответствовало этнически смешанной популяции (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1800925).

Таблица
Распределение генотипов IL-13 и GST у здоровых детей и детей с аллергическими заболеваниями, %

Генотип	Здоровые			Больные		
	норма	гетерозигота	мутация	норма	гетерозигота	мутация
IL-13-1504A>C	59,3	37,0	3,7	41,9	48,4	9,7
IL-13-1112C>T	66,7	22,2	11,1	25,8	58,0	16,1
IL-13+2044G>A	50,0	32,1	17,9	50,7	33,3	16,1
GSTM1	42,0	–	58,0	46,1	–	52,9
GSTT1	88,0	–	12,0	83,8	–	16,2

Примечание. Норма: A/A – для IL-13-1504, C/C – для IL-13-1112, G/G – для IL-13+2044, 0/+ или +/+ – для GSTM1 и GSTT1; мутация: C/C – для IL-13-1504, T/T – для IL-13-1112, A/A – для IL-13+2044, 0/0 или 0/0 – для GSTM1 и GSTT1; гетерозигота: A/C – для IL-13-1504, C/T – для IL-13-1112, G/A – для IL-13+2044.

Интересными являются данные, полученные по распределению генотипов по локусу +2044G>A: частота их регистрации у аллергиков и здоровых детей была практически одинаковой и в обеих группах наблюдался довольно высокий процент гомозигот (табл.). Аналогично высокая частота гомозигот A/A (17,4 %) характерна для испанской популяции (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=20541). Полученные результаты отличаются от ранее опубликованных [8, 9] и могут свидетельствовать об отсутствии решающей роли данной мутации в развитии аллергических заболеваний у детей во Владивостоке. Ранее в японской и британской популяциях была выявлена ассоциация полиморфизма +2044A (*Gln130*) с атопической бронхиальной астмой, но не с увеличением уровня сывороточного иммуноглобулина Е [9].

При сравнении распределения генотипов GSTM1 и GSTT1 в группе контроля было обнаружено их соответствие литературным данным [11]. В распределении этих «нулевых» генотипов, а также их комбинаций в исследуемой и контрольной группах значимых различий обнаружено не было. Частоты «нулевых» генотипов GSTM1 и GSTT1 составили 52,9 и 16,2 % у больных против 58 и 12 % у здоровых соответственно. Мы проанализировали также нуль-полиморфизм GSTM1 и GSTT1 в группах детей с бронхиальной астмой (21 человек) и с бронхиальной астмой в сочетании с аллергическим ринитом (31 человек) как наиболее многочисленных. Распределение относительных частот «нулевых» генотипов у детей с аллергическими заболеваниями мало отличалось от распределения в группе контроля: GSTM1 0/0 при бронхиальной астме встретился в 48 %, при бронхиальной астме в сочетании с аллергическим ринитом – в 55 %, в контрольной группе – в 58 % случаев. GSTT1 0/0 в группе зарегистрирован при бронхиальной астме в 14 %, при бронхиальной астме в сочетании с аллергическим ринитом – в 16 %, в контрольной группе – в 12 % случаев. Сочетание «нулевых» генотипов также было неинформативным (8 % случаев у здоровых против 5 и 6 % случаев

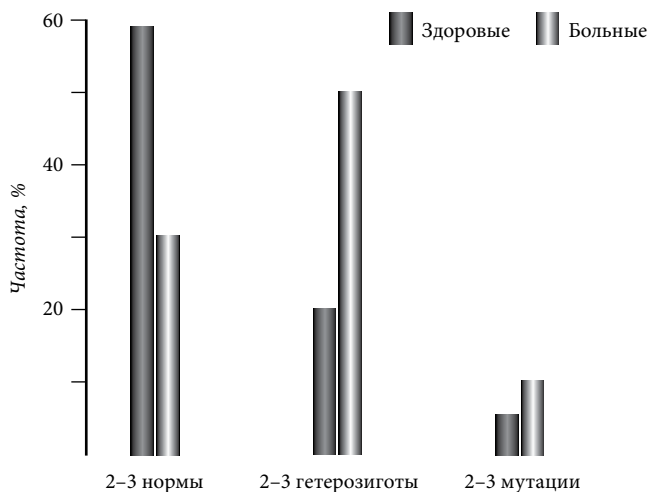


Рис. 2. Частота одновременного носительства генотипов IL-13 у здоровых детей и у детей с аллергическими заболеваниями.

в группах больных). Полученные данные показывают, что влияние полиморфных вариантов *GSTM1* и *GSTT1* на атопию в рамках изучаемой выборки было незначимым, что также согласуется с результатами других исследований [2, 12].

Нами также были проанализированы случаи одновременного носительства нормальных и минорных аллелей IL-13 (рис. 2). В группе детей с аллергопатологией достоверно чаще встречались гетерозиготные состояния одновременно по 2–3 полиморфным локусам (48,4% против 18,5% в контроле; отношение шансов – 4,1). У детей без аллергопатологии достоверно чаще наблюдалось одновременное носительство нормальных аллелей по разным локусам (55,6% против 29%). Одновременное носительство 2–3 мутаций гена IL-13 было достаточно редким явлением, чаще наблюдаемым в группе больных (9,7%), чем здоровых (3,7%). Важно отметить, что +2044G/A и –1112C/T проявляют высокую аддитивность, в результате чего наблюдается и гиперэкспрессия, и сверхактивность IL-13 [13].

Анализ полиморфизма генов IL-13 и глутатион-S-трансфераз показал перспективность исследования ассоциаций генотипов только для IL-13. Мы полагаем, что генотипирование здесь по трем полиморфным локусам информативно как критерий выделения групп риска реализации аллергических заболеваний у детей. В перспективе желательно расширение объемов выборок, а также включение других генов-кандидатов атопии для дальнейших исследований в этом направлении.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-98547_р_восток_а.

Литература

1. Казначеев В.А., Гервазиев Ю.В. Роль полиморфизма генов цитокинов и их рецепторов в развитии атопической бронхиальной астмы // *Астма*. 2004. Т. 5, № 1. С. 73–84.
2. Фрейдин М.Б., Брагина Е.Ю., Огородова Л.М., Пузырев В.П. Полиморфизм генов глутатионтрансфераз $\theta 1$ и $\mu 1$ (*GSTT1* и *GSTM1*) у больных атопической бронхиальной астмой в Западно-Сибирском регионе // *Молекулярная биология*. 2002. Т. 36, № 4. С. 630–634.

3. Фрейдин М.Б., Брагина Е.Ю., Огородова Л.М., Пузырев В.П. Генетика атопии: современное состояние // *Вестник ВОГиС*. 2006. Т. 10, № 3. С. 492–503.
4. Хаитов Р.М., Ильина Н.И., Латышева Т.В. Рациональная фармакотерапия аллергических заболеваний. М.: Литтерра, 2007. 504 с.
5. Cameron L., Webster R.B., Stempel J.M. et al. Th2-selective enhancement of human IL-13 transcription by IL-13–1112C>T, a polymorphism associated with allergic inflammation // *J. Immunol*. 2006. Vol. 177. P. 8633–8642.
6. Eaton D.L. Concise Review of the Glutathione S-Transferases and their Significance to Toxicology // *Toxicological sciences*. 1999. Vol. 49. P. 154–164.
7. Georas S.N., Gue J., Fanis U.D., Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease // *European respiratory journal*. 2005. Vol. 26. P. 933–947.
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. Vol. 105. P. 506–513.
9. Heinzmann A., Mao X.Q., Akaiwa M. et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy // *Hum Mol Genet*. 2000. Vol. 9. P. 549–559.
10. Islam T., Berhane K., McConnell R. et al. Glutathione-S-transferase (GST) P1, *GSTM1*, exercise, ozone and asthma incidence in school children // *Thorax*. 2009. Vol. 64. P. 197–202.
11. Minelli C., Granell R., Newson R. et al. Glutathione-S-transferase genes and asthma phenotypes: a Human Genome Epidemiology (HuGE) systematic review and meta-analysis including unpublished data // *Int. J. Epidemiol*. 2010. Vol. 39. P. 539–562.
12. Vavilin V.A., Safronova O.G., Lyapunova A.A. et al. Interaction of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* genotypes in determination of predisposition to atopic dermatitis // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2003. Vol. 136. P. 388–391.
13. Vladic F.D., Brazille S.M., Stern D. et al. IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation // *J. Clin. Invest*. 2005. Vol. 115. P. 747–754.
14. Wills-Karp M., Luyimbazi J., Xu X. et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma // *Science*. 1998. Vol. 282. P. 2258–2261.

Поступила в редакцию 27.05.2011.

POLYMORPHISM OF INTERLEUKIN-13 GENES AND XENOBIOTIC DETOXIFICATION SYSTEMS IN CHILDREN WITH ALLERGIC PATHOLOGY

D.B. Bakhaev¹, A.M. Stenkova¹, Yu.V. Ivanova², O.V. Schegoleva², E.V. Prosekova², V.A. Rasskazov¹, M.P. Isaeva¹

¹Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Prospekt, Vladivostok, 690022), ²Vladivostok State Medical University (2, Ostryakova Prospekt, Vladivostok, 690950)

Summary – The paper provides results of interleukin-13 genotyping with respect to three polymorphous locuses (–1512A>C, –1112C>T and +2044G>A) as well as studies on zero-polymorphism of genes M1 and T1 glutathione-S-transferase in children living in Vladivostok diagnosed with allergic diseases (73 patients) and allergic pathology-free (27 patients). As reported, there are no incidences that the “zero” genotypes *GSTM1* and *GSTT1* cause allergic diseases. There has been considerable prevalence of heterozygous carrier state of 1112C/T among the patients (58% against 22.2% in control). The heterozygous states were reliably more often observed simultaneously by 2 or 3 polymorphous locuses (48.4% against 18.5% in control) in children with clinical manifestations of the allergic diseases. The interleukin-13 genotyping by three polymorphous locuses can be recommended for applying as additional criterion of risk groups for the allergic diseases.

Key words: genetic polymorphism, interleukin-13, glutathione-S-transferase, allergic diseases.