

# Анализ полиморфизма генов регуляции иммунного ответа у больных атопической бронхиальной астмой

Епанешникова В.Б.\* , Смольникова М.В., Смирнова С.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», Красноярск; \* vika.epaneshnikova.94@mail.ru

**Актуальность.** Поиск ассоциации функциональных полиморфизмов генов цитокинов как потенциальных маркеров заболевания, оказывающих влияние на иммунный ответ и воспалительный процесс, является актуальной задачей в изучении иммуногенетических факторов атопической бронхиальной астмы (АБА). **Цель.** Провести анализ ассоциации полиморфизмов *IL5* (rs2069812), *IL12B* (rs3212227), *TGFB1* (rs1800469), *IFNG* (rs2069705) с АБА в зависимости от степени контроля над заболеванием. **Методы.** Для генотипирования использовался ПЦР-ПДРФ-анализ. **Результаты.** Различия между больными АБА и популяционной выборкой по частоте аллелей и генотипов *IL5*, *IL12B*, *TGFB1*, *IFNG* статистически не значимы. Распределение частот вариантов генов соответствует европеоидному типу. **Выводы.** В результате исследования ассоциации полиморфизмов *IL5*, *IL12B*, *TGFB1*, *IFNG* с АБА и уровнем контроля над заболеванием не найдены.

**Ключевые слова:** атопическая бронхиальная астма, полиморфизм, *IL5*, *IL12B*, *TGFB1*, *IFNG*

## Analysis of polymorphisms of genes regulating the immune response in patients with atopic asthma

Epaneshnikova V.B.\* , Smolnikova M.V., Smirnova S.V.

«Scientific Research Institute of medical problems of the North», Krasnoyarsk; \* vika.epaneshnikova.94@mail.ru

**Topicality.** The search for the associations of functionally polymorphisms of gene cytokines as potential markers of the disease, which influence both immune response and inflammatory process, is an actual aim of studying immune genetic factors of atopic bronchial asthma (ABA). **Aim.** To study the associations of polymorphisms of *IL5* (rs2069812), *IL12B* (rs3212227), *TGFB1* (rs1800469), *IFNG* (rs2069705) with ABA in depends from the stage of the disease control. **Methods.** For genotyping we have used PCR-PLRF-analysis. **Results.** No statistically significant difference was found in the distribution of the *IL5*, *IL12B*, *TGFB1*, *IFNG* polymorphisms between ABA patients and controls in this case-control study. The distribution of the frequencies of gene variants corresponded to the Europeans. **Conclusions.** As a result of our research we didn't find any associations between polymorphisms of *IL5*, *IL12B*, *TGFB1*, *IFNG* genes and ABA including the level of the disease control.

**Key words:** atopic asthma, polymorphism, *IL5*, *IL12B*, *TGFB1*, *IFNG*

### Введение

Атопическая бронхиальная астма (АБА) — многофакторное заболевание дыхательных путей, характеризующееся обратимыми приступами удушья, при котором генно-средовые взаимодействия играют решающую роль в возникновении заболевания, его прогрессировании и ответе на терапию. В большинстве случаев первые признаки формирования атопии проявляются в детском возрасте.

При АБА возникает дисбаланс между Th1- и Th2-клетками с активацией основных цитокинов, контролирующего аллергическое (атопическое) воспаление. В большинстве случаев развитие АБА связывают с активностью Th2-лимфоцитов [1]. Исследования генов Th1-профиля, участвующих в иммунном ответе против определенных аллергенов и являющихся антагонистами Th2-иммунного ответа, в отношении развития АБА немногочисленны.

Поскольку спектр генов подверженности АБА не может считаться полным, анализ наследственных детерми-

нант атопии является развивающимся направлением иммуногенетики [2]. Установление маркеров развития заболевания позволит разработать персонализированные методы диагностики, профилактики и терапии.

**Цель.** Провести анализ ассоциации полиморфизмов *IL5* (rs2069812), *IL12B* (rs3212227), *TGFB1* (rs1800469), *IFNG* (rs2069705) с АБА в зависимости от степени контроля над заболеванием.

### Материалы и методы

Исследования одобрены этическим комитетом НИИ МПС (протокол №4 от 18.04.16 г.). Право на проведение обследования юридически закреплялось информированным согласием.

Сформированы группы: (1) — среднетяжелой АБА с контролируемым течением заболевания (КАБА, n = 59, 12,5 ± 1,6 года); (2) — тяжелой/среднетяжелой

АБА с неконтролируемым течением (НАБА,  $n = 51$ ,  $13,1 \pm 2,77$  года). Диагноз, степень тяжести, уровень контроля над течением заболевания устанавливались в соответствии с рекомендациями GINA (2008). Контрольная группа (3) — практически здоровые дети ( $n = 33$ ,  $13,56 \pm 2,54$  года), а также люди из популяционной выборки без аллергии и АБА в анамнезе ( $n = 105$ ,  $38,31 \pm 5,36$  года). Перед объединением проведен сравнительный анализ частоты аллелей в контрольных группах разного возраста, статистически значимых отличий не выявлено. Общим критерием включения в исследование являлось европеоидное происхождение (3 поколения).

В работе использовались молекулярно-генетические методы: выделение ДНК, рестрикционный анализ продуктов амплификации. Распределение генотипов по полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди—Вайнберга (РХВ) по критерию  $\chi^2$  и точному тесту Фишера. Об ассоциации аллелей и генотипов с заболеванием судили по величине отношения шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ).

## Результаты

Сравнения частот аллелей и генотипов проводилось как между общей группой больных АБА и контролем, так и между группами больных, выделенными с учетом степени контроля над заболеванием (КАБА и НАБА), и между каждой из групп с контрольной выборкой (таблица). Распределение частот генотипов и аллелей исследованных полиморфизмов соответствуют равновесию Харди—Вайнберга.

В результате анализа частоты генотипов полиморфизма гена *IL5* установлено, что в выборке больных АБА преобладают генотип СТ (52,7%) и аллель С (66,4%);  $p > 0,05$ .

Аллельный вариант А и генотип АА полиморфизма гена *IL12B* чаще встречались во всех исследованных выборках. Хотя статистически значимой вовлеченности в степень контроля АБА у аллельного варианта А не выявлено, однако его частота в группе больных КАБА составил 83,1% в сравнении с контрольной выборкой (77,5%).

Анализ частоты аллелей и генотипов гена *TGFB1* показал большую распространенность аллельного вариан-

Таблица

Частоты генотипов и аллелей полиморфизмов, %

Генотип/ аллель	АБА ( $n = 110$ )	Группы			ОШ (95% ДИ)	p
		(1), ( $n = 59$ )	(2), ( $n = 51$ )	(3), ( $n = 138$ )		
<i>IL5</i> (rs2069812)						
C/C	40,0 (44)	39,0 (23)	41,2 (21)	45,7 (63)	ОШ <sub>1,3</sub> = 1,11 (0,70-1,76) ОШ <sub>2,3</sub> = 1,17 (0,72-1,90) ОШ <sub>АБА,3</sub> = 1,14 (0,78-1,66)	p <sub>1,3</sub> = 0,66 p <sub>2,3</sub> = 0,51 p <sub>АБА,3</sub> = 0,5
C/T	52,7 (58)	55,9 (33)	49,0 (25)	47,1 (65)		
T/T	7,3 (8)	5,1 (3)	9,8 (5)	7,2 (10)		
C	66,4 (146)	66,9 (79)	65,7 (67)	65,7 (191)		
T	33,6 (74)	33,1 (39)	34,3 (35)	34,3 (85)		
<i>IL12B</i> (rs3212227)						
A/A	68,2 (75)	71,2 (42)	64,7 (33)	59,4 (82)	ОШ <sub>1,3</sub> = 0,70 (0,40-1,23) ОШ <sub>2,3</sub> = 0,95 (0,55-1,65) ОШ <sub>АБА,3</sub> = 0,81 (0,52-1,26)	p <sub>1,3</sub> = 0,22 p <sub>2,3</sub> = 0,85 p <sub>АБА,3</sub> = 0,36
A/C	25,4 (28)	23,7 (14)	27,5 (14)	36,2 (50)		
C/C	6,4 (7)	5,1 (3)	7,8 (4)	4,4 (6)		
A	80,9 (178)	83,1 (98)	78,4 (80)	77,5 (214)		
C	19,1 (42)	16,9 (20)	21,6 (22)	22,5 (62)		
<i>TGFB1</i> (rs1800469)						
C/C	47,3 (52)	44,1 (26)	51,0 (26)	43,5 (60)	ОШ <sub>1,3</sub> = 0,88 (0,55-1,41) ОШ <sub>2,3</sub> = 0,95 (0,58-1,55) ОШ <sub>АБА,3</sub> = 0,91 (0,62-1,34)	p <sub>1,3</sub> = 0,59 p <sub>2,3</sub> = 0,83 p <sub>АБА,3</sub> = 0,64
C/T	46,4 (51)	54,2 (32)	37,2 (19)	50,0 (69)		
T/T	6,3 (7)	1,7 (1)	11,8 (6)	6,5 (9)		
C	70,4 (155)	71,2 (84)	69,6 (71)	68,5 (189)		
T	29,6 (65)	28,8 (34)	30,4 (31)	31,5 (87)		
<i>IFNG</i> (rs2069705)						
C/C	33,6 (36)	35,6 (21)	29,4 (15)	26,8 (37)	ОШ <sub>1,3</sub> = 0,72 (0,47-1,12) ОШ <sub>2,3</sub> = 1,01 (0,64-1,59) ОШ <sub>АБА,3</sub> = 0,84 (0,59-1,21)	p <sub>1,3</sub> = 0,14 p <sub>2,3</sub> = 0,97 p <sub>АБА,3</sub> = 0,35
C/T	46,4 (52)	49,2 (29)	45,1 (23)	50,7 (70)		
T/T	20,0 (22)	15,2 (9)	25,5 (13)	22,5 (31)		
C	56,4 (124)	60,2 (71)	52,0 (53)	52,2 (144)		
T	43,6 (96)	39,8 (47)	48,0 (49)	47,8 (132)		

та С-509 в общей выборке больных АБА (70,4%) и контрольной (68,5%);  $p > 0,05$ .

Показано преобладание во всех исследованных выборках генотипа СТ полиморфизма rs2069705 гена *IFNG*, частота среди больных НАБА/КАБА составила 49,2/45,1% соответственно, и 50,7% в контрольной выборке ( $p > 0,05$ ).

### Обсуждение

Клинические фенотипы АБА имеют свои отличительные генетические особенности [1, 3]. Полиморфизм в промоторных регионах генов влияет на уровень экспрессии мРНК и уровень соответствующего цитокина (так называемый «функциональный полиморфизм»), тем самым определяя индивидуальный иммунный ответ, что в конечном итоге сказывается на характере течения и контролировании АБА. Изученные в работе функциональные полиморфизмы *IL5*, *IL12B*, *TGFB1*, *IFNG* представляют интерес, поскольку продукты этих генов играют важную роль в иммунопатогенезе АБА.

IL-5 является главным ростовым и дифференцировочным фактором эозинофилов — активаторов аллергического воспаления, при котором происходит активация Th2-лимфоцитов. Аллельный вариант С-703 (rs2069812) ассоциирован с повышенной продукцией IL-5. Ранее была показана связь аллеля С с развитием АБА [3].

IL-12 эффективно ингибирует аллергическое воспаление дыхательных путей при АБА. Концентрация IL-12 в сыворотке при астме снижена, с увеличением длительности заболевания, концентрация становится ниже. Полиморфизм гена *IL12B* влияет на легочную функцию и тяжесть АБА [4]. Полиморфизм (rs3212227) влияет на уровень экспрессии — аллельный вариант С ассоциирован со сниженной продукцией IL-12B.

TGF- $\beta$ 1 является ключевым цитокином, регулирующим активность воспаления при АБА. Аллельный вариант Т-509 (rs1800469) ассоциирован с повышенной экспрессией гена. Показана ассоциация этого полиморфизма с неконтролируемой астмой, аллельный вариант Т-509 способствует более тяжелому течению бронхиальной астмы [5].

Данные исследований ассоциации полиморфизмов в гене *IFNG* с астмой имеют противоречивые результаты, тем не менее, вклад данного цитокина в патогенез АБА очевиден. Уровень концентрации IFN- $\gamma$  в сыво-

ротке крови, конденсате выдыхаемого воздуха повышен и коррелирует с тяжестью АБА. Аллельный вариант Т (rs2069705) ассоциирован с повышенным уровнем экспрессии гена [6].

Вклад функциональных полиморфизмов генов цитокинов в фенотипические различия АБА в разных популяциях противоречив, поэтому выявление генетических маркеров контролируемой и неконтролируемой бронхиальной астмы должны проводиться на материале отдельных популяций с численностью выборок, достаточной для получения значимых результатов.

### Выводы

Полученные в ходе исследования данные дают картину о распределении вариантов генов цитокинов *IL5*, *IL12B*, *TGFB1* и *IFNG* у детей больных АБА и в популяционной выборке жителей г.Красноярска. Показатели частот генотипов изученных полиморфизмов имеют характерное для европеоидной расы распределение. Получен ряд статистически незначимых различий между исследуемыми группами с контролируемым и неконтролируемым течением АБА.

### Информация о конфликте интересов

*Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.*

### Список литературы

1. March ME, Sleiman PM, Hakonarson H. The genetics of asthma and allergic disorders. *Discov. Med.* 2011;11(56):35-45.
2. Коненков ВИ, Авдошина ВВ, Ракова ИА и др. Комплексная оценка уровня CopA-индуцированной продукции цитокинов в культуре мононуклеарных клеток периферической крови здоровых лиц. *Медицинская иммунология.* 2006;8(4):517-522.
3. Фрейдин МБ, Пузырев ВП, Огородова ЛМ. Полиморфизм генов интерлейкинов и их рецепторов: популяционная распространенность и связь с atopической бронхиальной астмой. *Генетика.* 2002;38(12):1-9.
4. Бабушкина НП, Брагина ЕЮ, Буйкин СВ и др. Ассоциации полиморфных вариантов генов подверженности бронхиальной астме. *Медицинская генетика.* 2015;14(5):28-36.
5. Pulleyn LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. TGFbeta1 allele association with asthma severity. *Hum Genet.* 2001 Dec;109(6):623-627.
6. Wang D, Zhong X, Huang D et al. Functional polymorphisms of interferon-gamma affect pneumonia-induced sepsis. *PLoS One.* 2014 Jan 24;9(1):e87049.