

УДК 61: 575.- 616.23/.25.- 616.5; 616.97

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА СИНТРОПНЫХ ГЕНОВ МУЛЬТИФАКТОРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Е.Я. Гречанина^{1,2,3}, А.И.Безродная^{1,2}, Э.М.Ходош³,
И.А. Моштак⁴

Украинский институт клинической генетики ХНМУ, Харьков¹,
Харьковский специализированный медико-генетический центр,
Харьков ¹,
Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина,
Харьков²,
Харьковская медицинская академия последипломного
образования, Харьков ³
Институт дерматологи и венерологи НАМН Украины, Харьков⁴

Была исследована распространенность полиморфных вариантов 4 генов: IL4 C-589T, IL17A G-197A, IL17F His-161 Arg, CYP1A1 Ile462Val среди пробандов с атопическими патологиями - бронхиальной астмой и атопическим дерматитом и аутоиммунной патологией – псориазом (ПС). Установлена достоверно высокая 27% частота аллеля T-589 гена IL4 для пробандов с ПС. У 100% пробандов полиморфизм 462 Val Val гена CYP1A1 отсутствует.

Ключевые слова: гены, синтропия, цитокины, Тн-клетки, атопия, аутоиммунные заболевания.

Развитие общих биохимических и физиологических нарушений для многих мультифакториальных заболеваний (МФЗ) обусловлено наличием в геноме большого количества синтропных генов [1,2,5,6]. Доказана ассоциация аллельных вариантов генов интерлейкинов и генов ферментов детоксикации ксенобиотиков (ФДК) с патологическими состояниями атопии и аутоаллергии [7,9-11,14,17,18].

Однако однозначной модели иммунопатогенеза как атопических, так и аутоиммунных заболеваний, пока не существует. Данное исследование является фрагментом научной темы "Обґрунтувати принципи трьохрівневої профілактики спадкової патології на підставі молекулярно-генетичних досліджень» - № 0111U001390.

Постановка проблемы: Иммунологические нарушения при атопических заболеваниях выражаются в изменении соотношения популяций Тн1- /Тн2- в сторону Тн2, при аутоиммунных – наоборот, соответственно с продуцируемыми цитокинами первого, либо второго типа, которые имеют антагонистическое воздействие на Т-клетки «конкурирующей» субпопуляции. Некоторыми авторами [13]

подчеркивается роль смешанного Th1 x Th2 ответа в деструктивных процессах, обусловленных как клеточно-опосредованной, так и антителозависимой цитотоксичностью. Более поздние исследования описывают третью линию эффекторных клеток - Th17-клетки, которые антагонистически воздействуют своими цитокинами на Th1 и Th2 клеточные линии, экспрессируя цитокины семейства IL-17. Наиболее хорошо изученные - это IL-17A, IL17F [8,15]. Биотрансформация ксенобиотиков и эндогенных веществ, осуществляемая ферментами системы цитохрома P-450, является мощным механизмом защиты организма от внешних химических факторов и регуляции метаболических реакций. Члены семейства CYP1 отличаются широкой субстратной специфичностью и изозимным спектром, формирующимся, в частности, благодаря полиморфизму кодирующих их генов. Гены ферментов биотрансформации рассматривают как кандидаты для атопии и аутоиммунных патологий, поскольку они участвуют в метаболизме медиаторов воспаления лейкотриенов и простагландинов, а также в регуляции механизмов оксидативного стресса [12].

Целью данного исследования является изучение генотипа и частоты аллелей IL4 C-589T, IL17A G-197A, IL17F His-161 Arg, CYP1A1 Ile462Val у пробандов с атопией - бронхиальной астмой (БА), атопическим дерматитом (АД) и псориазом (ПС) - аутоиммунной патологией.

Методика исследования. Проведение молекулярно-генетических исследований осуществлялось на базе Украинского Института клинической генетики. Анализировался полиморфизм генов IL4 (C-589T), IL17A (G-197A), IL17F (His-161 Arg), CYP1A1 (Ile462Val) с помощью тест-систем ООО НТП «Литех» у 160 пациентов. Группу для исследования сформировали 40 человек с БА, 40 человек с АД, 40 – с ПС. Контролем служили 40 практически здоровых пациентов (КГ). Материалом для исследования были образцы периферической крови. Для исследования использованы тест-системы НПФ «Литех» (г. Москва). SNP детектировали в 3% агарозном геле. Разницу долей оценивали с помощью угловой трансформации ϕ . Сравнение рядов распределения проведено с помощью критерия χ^2 на уровне значимости 0,05. Ожидаемую гетерозиготность полиморфизма генов IL4, IL17A, IL17F, цитохрома P450 CYP1A1 рассчитывали по опубликованным методикам [3]. Относительное отклонение ожидаемой гетерозиготности от наблюдаемой (D) рассчитывали по формуле: $D=(h_{obs}-h_{exp})/h_{exp}$, где h_{obs} и h_{exp} – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно.

Результаты исследований и их обсуждение. В таблице 1 приведены результаты анализа распределения генотипов 589 CC, 589 CT, 589 TT гена IL4. Из полученных данных видно, что у представителей с разными нозологиями встречаются все возможные генотипы [21]. Нами установлено, что генотип 589 CC встречается среди представителей с БА в 1,37 раз чаще чем среди представителей с АД, и 1,25 раза чаще чем среди представителей с ПС.

Наибольшее количество представителей (40%) с генотипом 589 СТ наблюдается в группе больных с диагнозом ПС. Данный генотип встречается в 1,3 раза меньше среди представителей с БА. Но достоверно не отличается от частоты среди представителей с АД ($p>0,05$). Генотип 589 ТТ чаще всего встречается у пробандов с АД, в 3 раза чаще чем среди пробандов с БА ($p<0,05$) и почти в 2 раза – чем среди пробандов с ПС ($p<0,05$). Вместе с тем частота мутантного аллеля значимо не отличалась от контроля ($p>0,05$).

Таблица 1

Анализ полиморфного локуса C-589T гена IL4

Патология	Частота аллеля		h_{obs}	h_{exp}	D	Генотип, n (%)		
	C	T				CC	CT	TT
БА	0,80	0,20	0,30	0,32	-0,0625	26(65)	12 (30)	2 (5)
АД	0,66	0,34	0,38	0,44	-0,1363	19 (47)	15 (38)	6 (15)
ПС	0,73	0,27	0,40	0,39	0,0256	21(52)	16 (40)	3 (8)
КГ	0,67	0,33	0,36	0,42	-0,1428	23 (57)	14 (35)	3 (8)

Примечание: n – число пар, h_{obs} и h_{exp} – ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность соответственно, D - относительное отклонение ожидаемой гетерозиготности от наблюдаемой.

В таблице 2 – результаты анализа распределения генотипов 462 Ile Ile, 462 Ile Val, 462 Val Val гена CYP1A1. Из приведенных данных видно, что у представителей с разными нозологиями не встречается генотип 462 Val Val. Нами установлено, что генотип 462 Ile Val встречается среди представителей с АД и ПС в 2 раза чаще, чем среди представителей с БА ($p<0,05$). А также показатели частот генотипов 462 Ile Val и 462 Ile Ile одинаковые среди пробандов с АД и ПС. Данный факт может свидетельствовать про сходность течения патологических состояний при дерматологических болезнях (АД и ПС) и их общей особенности - «меньшего» вреда от токсичности внутренней среды организма, по сравнению с респираторной патологией БА. Одним из объяснений данной гипотезы может служить факт того, что гени ферментов биотрансформации ксенобиотиков (ФБК), а имеено CYP1A1 берет участие в метаболизме лекарств, то цитохром P450 отвечает за побочные эффекты медикаментозной терапии [14].

Таблица 2

Анализ полиморфного локуса Ile-462Val гена CYP1A1

Патология	Частота аллеля		h_{obs}	h_{exp}	D	Генотип, n (%)		
	Ile	Val				Ile Ile	Ile Val	Val Val
БА	0,98	0,02	0,05	0,04	0,25	38 (95)	2 (5)	0 (0)
АД	0,95	0,05	0,1	0,095	0,0526	36 (90)	4 (10)	0 (0)
ПС	0,95	0,05	0,1	0,095	0,0526	36 (90)	4 (10)	0 (0)
КГ	0,93	0,07	0,1	0,094	0,063	37 (93)	3 (7)	0 (0)

Примечание: n – число пар, h_{obs} и h_{exp} – ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность соответственно, D – относительное отклонение ожидаемой гетерозиготности от наблюдаемой.

В течение длительного времени развитие ПС считали связанным с нарушением Тн1-клеток и гиперпродукцией цитокинов этой клеточной линии. БА развивается при изменении функции Тн2-клеток. Установлено, что IL17 экспрессируется в биоптате кожи, пораженной ПС, и легких при БА, поскольку Тн17-клетки вовлекаются в иммунный ответ при бактериальном заражении, а также патогенетически связаны с развитием хронических воспалительных заболеваний. После того, как инфекционный агент проникает в организм, IL17 связывается с сигнальным рецептором IL-17RA. Такая реакция вызывает резкое увеличение нейтрофилов в организме носителя инфекции. Белые кровяные клетки нарушают работу лёгких и провоцируют изменения во всех слоях кожи. IL17A и IL17F наиболее хорошо изученные по своим свойствам цитокины семейства IL17. Нами установлены, что генотип 197 AA (40%) встречается среди представителей Харьковской популяции больных ПС в 1,1 раза чаще чем генотип 197 GG (36%). Генотип 161 His His (89%) встречается в 29,6 раза чаще среди представителей с БА чем генотип 161 Arg Arg (3%), что подтверждается результатами исследований проводимых на лабораторных мышах, поломки генома IL17 которых, обеспечивали меньшую подверженность повреждениям лёгких, спровоцированной вирусной инфекцией. Кроме того, у дефектных мышей был зафиксирован пониженный уровень нейтрофилов в лёгких [19,20].

Выводы

Анализ синтропных генов БА, АД и ПС показал:

1. Частота полиморфизма 589 СТ IL4 среди исследуемых МФЗ максимальная для псориаза и составляет 40% ($p < 0,05$), поэтому для данной патологии ключевым полиморфизмом можно считать 589 СТ;
2. Полиморфизм 462 Val Val гена CYP1A1 не встречается среди исследуемых МФЗ;
3. Частота полиморфизма 197AA гена IL17A для псориаза составляет 40%, что показывает генетическую гетерогенность этой патологии.

Перспективы дальнейших исследований. Планируется исследовать SNP- мутации более широкого спектра цитокинов при БА, АД и ПС.

Литература:

1. Bochkov NP Clinical Genetics / NP Bochkov. - Moscow: GEOTAR Media, 2006 .- 480 sec.: Ill.
2. Grechanina EY The phenomenon of phenotypic syntropy in some allergic diseases / EY Grechanina, AI Bezrodnaya // Klinichna genetics. - 2011 .- VIP. 1-2. - S. 197.
3. Zhivotovsky LA Population biometrics / LA Zhivotovsky .- Moscow: "Nauka", 1991.-271 with.

4. Kadagidze ZG Cytokines and their use in oncology / ZG Kadagidze // Int. J. Rehabilitation. - 1997. - № 6. - S. 47-56.
5. Puzyrev VP Liberty genome / VP Puzyrev // Bulletin of Siberian medicine. - 2002. - VIP. 2. - S. 16-29.
6. Medical genetics: a textbook / [E.Y. Grechanina, G. Hoffman, R.V. Bogatyrova and others]; under. Ed. E.Y. Grechaninov]. - K.: TNI "Medicine", 2010. - 552 with.
7. Ajjan R. Intrathyroidal cytokine gene expression in Hashimoto's thyroiditis / R. Ajjan, P. Watson, R. McIntosh, A. Weetman // Clin. Exp. Immunol. — 1996. — Vol. 105. — № 3. — P. 523–528.
8. Bettelli E. Th17: the third member of effector T cell Trilogy / E. Bettelli, T. Korn, K. Vijay // Immunol. — 2007. — Vol. 19, № 6. — P. 652–657.
9. Duffin K.C. Genetic variations in cytokines and cytokine receptors associated with psoriasis found by genome-wide association / K.C. Duffin, G.G. Krueger // J. Invest. Dermatol. - 2009. - V. 129(4). - P. 827-833.
10. Ghoreschi K. Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease / K. Ghoreschi, P. Thomas, S. Breit et al // Nat. Med. - 2003. - V. 9. - P. 40-46.
11. Hoffjan S. Genetic variation in immunoregulatory pathways and atopic phenotypes in infancy / S. Hoffjan, I. Ostrovskaja, D. Nicolae et al // J. Allergy Clin. Immunol. - 2004. - V. 113. - № 3. - P. 511-518.
12. Honkakoski P. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors / P. Honkakoski, M. Negishi // Biochem. J. - 2000. - V. 347. - P. 321-337.
13. Hwang J. Epidermal ablation of Dlx3 is linked to IL-17-associated skin inflammation / J. Hwang, R. Kita, H.S. Kwon et al // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2011. - V. 108. - P. 11566-11571.
14. Ingelman-Sundberg M. Human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms / M. Ingelman-Sundberg // Arch. Pharmacol. - 2004. - V. 369. - P. 89-104.
15. Kolls J. Interleukin-17 family members and inflammation / J. Kolls, A. Linden // Immunity. — 2004. — Vol. 21. — P. 467–476.
16. Kurschus F.C. Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype. / F.C. Kurschus, A.L. Croxford, A.P. Heinen // Eur. J. Immunol. - 2010. - Vol. 40. - P. 3336-3346.
17. Mariotti S. T-cell-mediated and antigen-dependent differentiation of human monocyte into different dendritic cell subsets: a feedback control of Th1/Th2 responses / S. Mariotti, V. Sargentini, C. Marcantonio et al // FASEB J. - 2008. - V. 22. - P. 3370-3379.
18. Patrick E. Flavell Cutting Edge: Changes in Histone Acetylation at the γ IFN- and IL-4 Loci Accompany Th1/Th2 Differentiation / E. Patrick Fields, T. Kim Sean, A. Richard // J. Immunol. - 2002. - V. 169. - P. 647-650.
19. Stark J.M. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus infection in inbred mice / J.M. Stark, S.A. McDowell, V. Koenigsnecht // J. Med. Virol. - 2002. - V. 67. - P. 92-100.
20. Stark J.M. Genomewide association analysis of respiratory syncytial virus infection in mice / J.M. Stark, M.M. Barmada, A.V. Winterberg // J. Virol. - 2010. - V. 84. - P. 2257-2269.
21. Walley A.J. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for association with asthma and atopy / A.J. Walley, W.O. Cookson // J. Med. Genet. - 1996. - V. 33. - P. 689–692.

ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ СИНТРОПНИХ ГЕНІВ МУЛЬТИФАКТОРІАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Гречаніна О.Я., Безродна А.І., Ходош Е.М., Моштаківа І.О.

Була досліджена розповсюдженість поліморфних варіантів 4 генів: IL4 C-589T, IL17A G-197A, IL17F His-161 Arg, CYP1A1 Ile462Val серед пробандів з atopічними патологіями - бронхіальною астмою і atopічним дерматитом, і аутоімунною патологією – псоріазом (ПС). Встановлена достовірно висока 27% частота аллеля T-589 гена IL4 для пробандів з ПС. У 100% пробандів поліморфізм 462 Val Val гена CYP1A1 відсутній.

Ключові слова: гени, синтропія, цитокіни, Тн-клітини, atopія, аутоімунні захворювання.

INVESTIGATION OF SYNTROPIC GENE POLIMORFISMS OF MULTIFACTORIAL DISEASES

Grechanina E.Y., Bezrodnaya A.I., Hodosh E.M., Moshtakova I.A.

We investigated the prevalence of polymorphisms of 4 genes: IL4 C-589T, IL17A G-197A, IL17F His-161 Arg, CYP1A1 Ile462Val among probands with atopic pathologies - bronchial asthma and atopic dermatitis and autoimmune disorders - psoriasis (PS). Set significantly higher 27% frequency of allele T-589 gene IL4 for probands with PS. In 100% of probands 462 Val Val polymorphism of the CYP1A1 gene is absent.

Key words: genes, syntropy, cytokines, Th cells, atopy, autoimmune disease.