

И.В. Салтыкова¹, М.Б. Фрейдin², Е.Ю. Брагина², Л.М. Огородова¹, В.П. Пузырёв²

¹Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Российская Федерация

²Научно-исследовательский институт медицинской генетики СО РАМН, Томск, Российская Федерация

Ассоциация полиморфизма *rs6737848* гена *SOCS5* с бронхиальной астмой

Цель исследования: провести анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов регуляции иммунного ответа с бронхиальной астмой. **Пациенты и методы.** Проанализировано 10 однонуклеотидных замен генов *IFNG* (*rs2069705*), *IFNGR2* (*rs17880053*), *IL4* (*rs2070874*), *IL4RA* (*rs1805010*), *GATA3* (*rs10905277*), *TBX21* (*rs11652969*), *PIASY* (*rs3760903*), *PIAS3* (*rs12756687*), *STAT5β* (*rs16967593*), *SOCS5* (*rs6737848*) путем полиморфизма длин рестрикционных фрагментов у 106 больных бронхиальной астмой и 115 здоровых индивидов. **Результаты.** С помощью логистической регрессии показана ассоциация полиморфизма *rs6737848* гена *SOCS5* с бронхиальной астмой в аддитивной и доминантной модели ($p = 0,05$, $OR = 0,338$, $95\% CI 0,158-0,723$; $p = 0,02$, $OR = 0,284$, $CI 0,126-0,638$, соответственно). Не обнаружено вклада полиморфизма исследованных генов в изменчивость уровня общего IgE. **Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о патогенетической роли полиморфизма *rs6737848* гена *SOCS5* в отношении бронхиальной астмы.

Ключевые слова: бронхиальная астма, генетический полиморфизм, IgE, *SOCS5*.

53

Введение

Бронхиальная астма (БА) — мультифакториальное заболевание дыхательных путей, развитие которого определяется сложным взаимодействием множества генов и факторов внешней среды. Поиск генов предрасположенности к БА — актуальная задача, на решение которой направлены значительные усилия, поскольку ожидается, что установление молекулярно-генетических причин развития заболевания поможет лучше понять его патофизиологию и разработать новые эффективные методы диагностики и персонализированной терапии БА.

В большинстве случаев развитие БА связывают с активностью Т лимфоцитов-хелперов 2-го типа (Th₂). Гены Th₂-профиля иммунного ответа достаточно хорошо изучены в отношении связи с аллергическими болезнями, включая БА. Так, например, показана ассоциация полиморфизма генов *GATA3*, *TBX21*, *IL4*, *IL4RA*, *STAT6* с БА и аллергией [1]. При этом исследования генов

Th₁-профиля, участвующего в иммунном ответе против определенных бактерий и являющегося антагонистом Th₂-иммунитета, в отношении предрасположенности БА единичны. В то же время накапливается все больше данных о роли микробиоты, населяющей бронхолегочные пути, в развитии БА и тяжести ее течения [2, 3]. В связи с этим изучение генов Th₁-пути в отношении развития БА и ее клинических признаков является весьма актуальным. Результаты исследований генов Th₁-профиля подтверждают их роль в развитии БА. Например, показана связь полиморфизма гена *IFNG* с БА детского возраста [4], аллергией [5] и уровнем общего IgE [6].

Процесс дифференцировки наивных Т хелперов в клетки Th₂- или Th₁-профиля называется поляризацией. Ключевыми участниками этого процесса являются цитокины. Они регулируют функциональную активность клеток иммунной системы, изменяя главным образом транскрипционные профили этих клеток. Свое действие цитокины реализуют, связываясь с рецепторами

I.V. Saltykova¹, M.B. Freidin², E.Y. Bragina², L.M. Ogorodova¹, V.P. Puzyrev²

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk, Russian Federation

Association of Polymorphism *Rs6737848* in the *Socs5* Gene with Bronchial Asthma

Aim: to investigate the role of polymorphic variants of immune-response modifying genes in predisposition to asthma. **Patients and methods.** The analysis of restriction fragments length polymorphism was used to investigate 10 single-nucleotide polymorphisms: *IFNG* *rs2069705*, *IFNGR2* *rs17880053*, *IL4* *rs2070874*, *IL4RA* *rs1805010*, *GATA3* *rs10905277*, *TBX21* *rs11652969*, *PIASY* *rs3760903*, *PIAS3* *rs12756687*, *STAT5* *rs16967593*, and *SOCS5* *rs6737848* in 106 asthma patients and 115 healthy people. **Results.** The *rs6737848* *SOCS5* polymorphism was significantly associated with asthma in additive model ($p = 0,05$, $OR = 0,338$, $95\%CI 0,158-0,723$) and in dominant model ($p = 0,02$, $OR = 0,284$, $CI 0,126-0,638$). None of the polymorphisms of the studied genes was associated with total IgE levels. **Conclusions.** This is the first report on the association of *rs6737848* *SOCS5* with asthma.

Key words: bronchial asthma, gene polymorphism, IgE, *SOCS5*.

на клеточной мембране, что приводит к активации транскрипционных факторов, в т.ч. сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции *STAT*. Наиболее изученным геном этого семейства в связи с предрасположенностью к БА является *STAT6*, участвующий в активации *IL 4* и *I3*, однако существуют данные о роли и других молекул семейства *STAT* в развитии БА и связанных с ней клинических признаков. В частности, установлены ассоциации полиморфизма генов *STAT2*, *STAT4* с БА в азиатских популяциях [7, 8].

К ингибиторам проведения сигнальных каскадов относятся супрессоры цитокиновых сигналов (*SOCS*) и протеиновые ингибиторы активированных *STAT* (*PIAS*) [9]. Исследования ингибиторов проведения сигнальных каскадов цитокинов в связи с предрасположенностью к БА и атопии практически отсутствуют. Однако их участие в регуляции функционирования иммунной системы и роль в патогенезе других иммуноопосредованных заболеваний дает основание предполагать вклад генов семейства *SOCS* и *PIAS* в предрасположенность к БА.

Цель исследования: оценить ассоциации БА с полиморфизмом генов, участвующих в регуляции Th₁- и Th₂-профиля иммунного ответа.

Участники исследования

Были сформированы выборки больных БА и здоровых индивидов на базе Медицинского объединения «Центр семейной медицины» и Областной клинической больницы г. Томска. Частично были приглашены волонтеры из числа госпитализированных и амбулаторных пациентов других лечебно-профилактических учреждений г. Томска. Общими критериями включения для анализируемых групп было отсутствие родственных связей между индивидами, принадлежность к русскому этносу, возраст от 18 до 65 лет. Критериями включения для здоровых индивидов были отсутствие аллергических болезней в анамнезе и отрицательные скарификационные аллергологические пробы. Критериями исключения стали психические заболевания, злоупотребления алкоголем или наркотиками в анамнезе, ВИЧ-инфекция.

Обследовано 106 пациентов с БА, из них 82 женщины (43,5±12,3 года) и 24 мужчины (32,6±11,5 года). У всех пациентов была диагностирована atopическая БА на основании критериев экспертов ВОЗ: наличие характерного анамнеза, типичные клинические симптомы астмы, атопия (атопический анамнез, положительные скарификационные аллергологические пробы). Степень тяжести заболевания устанавливали по критериям документа GINA (2006). Контрольную выборку составили 115 индивидов, из них 95 женщин (31,7±11,2 года) и 20 мужчин (34,0±11,4 года).

Методы исследования

Исследовано 10 полиморфных вариантов генов цитокинов и молекул регуляции сигнальных каскадов: *IFNG* rs2069705, *IFNGR2* rs17880053, *IL4* rs 2070874, *IL4RA* rs 1805010, *GATA3* rs10905277, *TBX21* rs11652969, *PIAS1* rs3760903, *PIAS3* rs12756687, *STAT5β* rs16967593, *SOCS5* rs6737848. Для генотипирования использовали образцы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), выделенной из цельной венозной крови по стандартной методике. Генотипирование осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров,

подобранных с помощью программы «Primer3», с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (табл. 1). Для проведения ПЦР добавляли 100–200 нг геномной ДНК в 20 мкл реакционной смеси: 2,5 пмоль специфических праймеров (Биосан, Новосибирск), 2 ммоль каждого dNTP, 1,5 ммоль MgCl₂, 0,5 Ед Taq ДНК-полимеразы (SibEnzyme, Россия) в 10x реакционном буфере. Смесь помещали в 0,5 мл пробирки типа «Эппендорф», наслаивали сверху минеральное масло для предотвращения испарения и амплифицировали в автоматических минициклерах «2720 Thermal Cycler» (Applied Biosystems, США) и «ТП4-ПЦР-01-Терцик» (ДНК-Технология, Россия).

Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводили с использованием программы «SPSS 16.0» (IBM Corp., США). Частоты генотипов по исследованным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга (РХВ) при помощи точного теста Фишера. Методом бинарной логистической регрессии оценены кодоминантные, доминантные, рецессивные и аддитивные модели для каждого из проанализированных полиморфных вариантов генов. Степень выраженности ассоциации определена путем расчета отношения шансов (odds ratio, *OR*) и его доверительного интервала (confidence interval, *CI*) для каждой модели. Межгенные взаимодействия анализировали с помощью множественной логистической регрессии.

Поправку на множественные сравнения проводили с помощью подхода False Discovery Rate (*FDR*) [10]. Расчет поправки проводили в среде R с помощью функции *p.adjust*. В результатах везде представлены величины *p* с учетом поправки на множественные сравнения.

Для анализа ассоциаций уровня IgE с полиморфизмами исследуемых генов использовали однофакторный дисперсионный анализ. Поскольку исходное распределение этого признака отличалось от нормального (согласно данным теста Колмогорова–Смирнова), уровень IgE был прологарифмирован, чтобы перейти к логнормальному распределению. Кроме того, не были получены статистически значимые различия дисперсий между сравниваемыми группами, что позволило применить дисперсионный анализ.

Результаты

У здоровых лиц для исследуемых полиморфных вариантов частоты генотипов соответствовали ожидаемым при РХВ. С помощью логистической регрессии показана связь полиморфизма rs6737848 гена *SOCS5* с БА в аддитивной (*p* =0,05, *OR* =0,338, 95% *CI* 0,158–0,723) и доминантной модели (*p* =0,02, *OR* =0,284, 95% *CI* 0,126–0,638) (табл. 2). Для полиморфизма генов rs2069705 *IFNG* и rs12756687 *PIAS3* была установлена ассоциация с БА в рецессивной модели, однако после поправки на множественные сравнения ассоциации стали статистически не значимы (*p* =0,055) (см. табл. 2). Для других исследованных полиморфизмов ассоциаций с БА не показано.

Учитывая результаты анализа ассоциаций, для генов *SOCS5*, *IFNG* и *PIAS3* проведена оценка межгенного взаимодействия в отношении ассоциации с БА. Тестировали трехкомпонентную модель, включающую взаимодействие 3 генов (рассмотрен аддитивный эффект каждого из генов), а также двухкомпонентные модели для каждой

Таблица 1. Характеристика исследованных полиморфизмов, структуры праймеров и ферменты рестрикции

Ген, полиморфизм	Локализация	Структура праймеров	Фермент рестрикции (SibEnzyme, Россия)
<i>PIAS3</i> <i>rs12756687</i>	1q21 Интрон 1	F-5'-TGAACCCTGACCTGAAAACC-3' R-5'-CCTCCTGGGAACAGGATAGG-3'	Bst2U I
<i>PIASY</i> <i>rs3760903</i>	19p13.3 Интрон 1	F-5'-GGCTGCAGTTTACATACCCC-3' R-5'-CAGAAGCCAGGTGTCCTCGA-3'	Bst4C I
<i>TBX21</i> <i>rs11652969</i>	17q21.32 Интрон 1	F-5'-TGCCTGTAGTCAAGGAGAGAAT-3' R-5'-TGAAGAACTGACGCTCCG-3'	BssT1 I
<i>GATA3</i> <i>rs10905277</i>	10p15 5'UTR	F-5'-GTTGTTGCCACTCCAGCAACT-3' R-5'-GGAGGGGTCGTTTAGCAAAG-3'	Rsa I
<i>IL4RA</i> <i>rs1805010</i>	16p12.1 Экзон3	F-5'-GGCAGGTGTGAGGAGCATCC-3' R-5'-GCCTCCGTTGTCTCAGGTA-3'	Rsa I
<i>IL4</i> <i>rs2070874</i>	5q31.1 5'UTR	F 5'-AGAGAGGGGCTGATTGGC -3' R-5'-GGAGAGATGGTGCCAGAT-3'	BstMAI
<i>STAT5b</i> <i>rs16967593</i>	17q11.2 Интрон 1	F 5'-TTTTGGAATGTTTGCCCTTC-3' R-5'-ATGGCATTCAAGGTTGCGTAG-3'	AatII
<i>IFNG</i> <i>rs2069705</i>	12q14 Промотор	F-5'-ATTATCAAGCCAGTTTACAG-3' R-5'-GATTCTTCTCCTCCTTTGTA-3'	Hpa I
<i>IFNGR2</i> <i>rs17880053</i>	21q22.11 Промотор	F-5'-ATGTCCCTCCCTTCTTACCAGTA-3' R-5'-TGTGGAAGTCAGGCAAGGATTAT-3'	Msp20 I
<i>SOCS5</i> <i>rs6737848</i>	2p21 Интрон 1	F-5'-CGGTTTACAAAATGAAAGCTGA-3' R-5'-GGACGAATAGTAAAATCAAGGACA-3'	BstDE I

Таблица 2. Характеристики логрессионных моделей для rs6737848 *SOCS5*, rs2069705 *IFNG* и rs12756687 *PIAS3*

Модель	Генотипы	БА (n; %)	Контроль (n; %)	OR (95% CI)	p	FDR-скорректированный p
rs6737848 <i>SOCS5</i> доминантная	CC GC-GG	94 (91,3) 9 (8,7)	80 (74,8) 27 (25,2)	1,00 0,284 (0,126–0,638)	0,002	0,020
rs6737848 <i>SOCS5</i> аддитивная	CC GC GG	94 (91,3) 8 (7,8) 1 (1)	80 (74,8) 26 (24,3) 1 (0,9)	1,00 0,338 (0,158–0,723)	0,005	0,05
rs2069705 <i>IFNG</i> рецессивная	CC-CT TT	93 (89,4) 11 (10,6)	85 (75,9) 27 (24,1)	1,00 0,372 (0,174–0,796)	0,011	0,055
rs12756687 <i>PIAS3</i> рецессивная	GG-GC CC	81 (76,4) 25 (23,6)	103 (89,6) 12 (10,4)	1,00 2,649 (1,255–5,593)	0,011	0,055

пары генов. Статистически значимые эффекты взаимодействия не показаны ни для одной из моделей. Также не продемонстрировано ассоциации полиморфизма исследованных генов с уровнем общего IgE ни для одной из тестируемых моделей.

Обсуждение

В результате исследования установлена ассоциация полиморфизма *rs6737848* гена *SOCS5* с БА. Кроме того, показаны тенденции к ассоциации полиморфизмов генов *IFNG* и *PIAS3* с исследуемой болезнью. При этом не установлено статистически значимого эффекта взаимодействия между этими 3 генами в отношении их ассоциации с БА. Таким образом, можно предполагать независимый патогенетический эффект полиморфизма гена *SOCS5* в развитии астмы.

Насколько нам известно, ассоциация гена *SOCS5* с БА показана впервые. *SOCS5* является потенциальным регулятором сигнального каскада *IL 4*, т.к. способен ингибировать Th₂-иммунный ответ путем связывания с α-субъединицей рецептора этого цитокина. Экспрессия гена *SOCS5* по-

ложительно коррелирует с экспрессией *TBX21* и *FOXP3* и негативно связана с экспрессией *IL4* [11].

Данные о роли *SOCS5* в отношении аллергических болезней противоречивы. В одном из исследований сделано заключение о том, что *SOCS5* не связан с аллергическим статусом на основании данных отсутствия корреляции экспрессии *SOCS5* с аллергической сенсibilизацией у 248 детей [11]. В исследовании модели астмы на мышах гиперэкспрессия *SOCS5* оказалась связана с повышением уровня экспрессии *IL5* и *IL13* в бронхолегочном лаваже, эозинофилией и повышенной бронхолегочной реактивностью [12]. Авторы предположили, что гиперэкспрессия *SOCS5* не ингибирует Th₂-иммунный ответ и способствует поддержанию симптомов астмы в модели *in vivo*. Таким образом, исследования, посвященные изучению роли *SOCS5* в отношении аллергических заболеваний, противоречивы и демонстрируют отсутствие понимания функциональной роли этой молекулы.

Поскольку в нашем исследовании не показана ассоциация полиморфизма гена *SOCS5* с уровнем общего IgE, можно предполагать, что *SOCS5* реализует свой вклад в развитие БА независимо от IgE-опосредованных механизмов поддержания аллергического воспаления. Ме-

ханизм вовлеченности *SOCS5* в развитие БА неясен, однако существуют данные, что эта молекула является одним из ингибиторов активации рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), увеличение продукции которого ассоциировано с ремоделированием бронхолегочной системы у больных БА [13]. Таким образом, можно предположить, что *SOCS5* может быть вовлечен в развитие БА посредством регуляции сигнального пути EGFR. Эта гипотеза требует экспериментального подтверждения.

Заключение

Показана ассоциация полиморфизма *rs6737848* гена *SOCS5* с БА в аддитивной и доминантной модели ($p=0,05$, $OR=0,338$, 95% CI 0,158–0,723; $p=0,02$, $OR=0,284$, 95% CI 0,126–0,638, соответственно). Не установлено вклада полиморфизма исследованных генов в изменчивость уровня общего IgE. Полученные данные свидетельствуют о патогенетической роли полиморфизма *rs6737848* гена *SOCS5* в отношении БА.

REFERENCES

1. March M.E., Sleiman P.M., Hakonarson H. The genetics of asthma and allergic disorders. *Discov. Med.* 2011; 11 (56): 35–45.
2. Ege M.J., Mayer M., Schwaiger K. et al. Environmental bacteria and childhood asthma. *Allergy.* 2012; 67 (12): 1565–1571.
3. Hilty M., Burke C., Pedro H. et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One.* 2010; 5 (1): 8578.
4. Nakao F., Ihara K., Kusahara K. et al. Association of IFN- γ and IFN regulatory factor 1 polymorphisms with childhood atopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107 (3): 499–504.
5. Nieters A., Brems S., Becker N. Cross-sectional study on cytokine polymorphisms, cytokine production after T-cell stimulation and clinical parameters in a random sample of a German population. *Hum. Genet.* 2001; 108 (3): 241–248.
6. Nagarkatti R., Rao C.B., Rishi J.P. et al. Association of IFNG gene polymorphism with asthma in the Indian population. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 110 (3): 410–412.
7. Li Y., Wu B., Xiong H. et al. Polymorphisms of STAT-6, STAT-4 and IFN- γ genes and the risk of asthma in Chinese population. *Respir. Med.* 2007; 101 (9): 1977–1981.
8. Hsieh Y.Y., Wan L., Chang C.C. et al. STAT2* C related genotypes and allele but not TLR4 and CD40 gene polymorphisms are associated with higher susceptibility for asthma. *Int. J. Biol. Sci.* 2009; 5 (1): 74–81.
9. Wormald S., Hilton D.J. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem.* 2004; 279 (2): 821–4.
10. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Royal Statistical. Soc., Series B (Methodological).* 1995; 57 (1): 289–300.
11. Daegelmann C., Herberth G., Ruder S. et al. Association between suppressors of cytokine signalling, T-helper type 1/T-helper type 2 balance and allergic sensitization in children. *Clin. Exp. Allergy.* 2008; 38 (3): 438–448.
12. Ohshima M., Yokoyama A., Ohnishi H. et al. Overexpression of suppressor of cytokine signalling-5 augments eosinophilic airway inflammation in mice. *Clin. Exp. Allergy.* 2007; 37 (5): 735–742.
13. Le Cras T.D., Acciani T.H., Mushaben E.M. et al. Epithelial EGF receptor signaling mediates airway hyperreactivity and remodeling in a mouse model of chronic asthma. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2011; 300 (3): 414–421.

56

FOR CORRESPONDENCE

Saltykova Irina Vladimirovna, PhD, Junior Research Worker, Central Research Laboratory of Siberian State Medical University
Address: 634050, Tomsk, Moscow path, 2; **tel.:** (3822) 52-99-16, **e-mail:** ira.saltykova@mail.ru

Freidin Maksim Borisovich, PhD, Senior Research Worker, Laboratory of Population Genetics, Research Institute of Medical Genetics SB RAMS

Address: 634050, Tomsk, Naberezhnaya Reki Ushayki St., 10; **tel.:** (3822) 42-09-56, **e-mail:** mfreidin@medgenetics.ru

Puzyrev Valerii Pavlovich, PhD, Professor, RAMS academician, Director of the Research Institute of Medical Genetics SB RAMS, Head of the Laboratory of Population Genetics Research Institute of Medical Genetics SB RAMS

Address: 634050, Tomsk, Naberezhnaya Reki Ushayki St., 10; **tel.:** (3822) 51-22-28, **e-mail:** valery.puzyrev@medgenetics.ru

Ogorodova Lyudmila Mikhailovna, PhD, Professor, RAMS cor. member, Head of the Pediatrics Department of the Medical Faculty with Children's Diseases Course, Siberian State Medical University

Address: 634050, Tomsk, Moscow path, 2; **tel.:** (3822) 53-10-22, **e-mail:** lm.ogorodova@mail.ru

Bragina Elena Yur'evna, PhD, Research Worker, Laboratory of Population Genetics, Research Institute of Medical Genetics SB RAMS

Address: 634050, Tomsk, Naberezhnaya Reki Ushayki St., 10; **tel.:** (3822) 42-09-56, **e-mail:** elena.bragina72@gmail.com