

И.И. Черкашина¹, С.Ю. Никулина¹, Н.И. Логвиненко², В.Н. Максимов³, Е.Д. Либердовская⁴

Клинико-генетический анализ больных бронхиальной астмой

1 – кафедра внутренних болезней № 1 ГОУ ВПО "Красноярская государственная медицинская академия": 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1;

2 – ГОУ ВПО "Новосибирский государственный медицинский университет": 630091, Новосибирск, Красный просп., 52;

3 – ГУ НИИ терапии СО РАМН: 630089, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175 / 1;

4 – МУЗ "ТКБ № 20 им. И.С.Берзона": 660014, Красноярск, ул. Инструментальная, 12

I.I. Cherkashina, S.Yu. Nikulina, N.I. Logvinenko, V.N. Maksimov, E.D. Liberdovskaya

Clinical and genetic analysis in patients with bronchial asthma

Summary

We investigated families of 81 probands with confirmed bronchial asthma and 183 the first-degree, the second-degree, and the third-degree relatives (the study group). The comparative group involved 263 healthy persons. Family cumulation of asthma was found in the probands' families. Autosomal-dominant inheritance has been estimated for asthma. Heterozygous genotype of receptor gene of macrophage-colony-stimulating factor c-fms could be addressed as one of genetic predictors of asthma. Another predictor of asthma could be homozygous genotype for rare allele of c-fms gene.

Key words: bronchial asthma, genetic predictors, Vainberg's method, own investigation.

Резюме

Проведено семейное обследование 81 пробанда, у которых диагностирована бронхиальная астма (БА), и 183 их родственников I–III степеней родства (основная группа). В группу сравнения были включены практически здоровые люди – 263 человека. Выявлено семейное накопление БА в семьях пробандов с данной патологией. Установлен аутосомно-доминантный тип наследования БА. Гетерозиготный вариант генотипа гена рецептора макрофаг-колониестимулирующего фактора c-fms (РМКСФ) можно рассматривать как один из генетических предикторов возникновения БА. Предиктором возникновения БА может служить также гомозиготный генотип по редкому аллелю гена РМКСФ.

Ключевые слова: бронхиальная астма, генетические предикторы, метод Вайнберга, собственные исследования.

Бронхиальная астма (БА) по-прежнему остается одной из актуальных проблем пульмонологии. В России, по данным эпидемиологических исследований, БА страдают около 7 млн человек (5 % взрослых и 9 % детей) [1].

В настоящее время не возникает сомнения в том, что БА – генетически обусловленное заболевание. Исследования последних лет подтвердили значение наследственной предрасположенности к БА и позволили оценить степень риска возникновения заболевания [1–4]. По данным этих работ, наследственная отягощенность аллергическими заболеваниями выявляется в 48,0–68,8 % случаев. И.В. Василевским и соавт. [3] было установлено, что коэффициент наследуемости генетической предрасположенности к БА составляет $49,0 \pm 0,8$ %, к атопическим заболеваниям – $83,0 \pm 8,3$ %, а линейный показатель наследуемости (h) – 0,70 и 0,91 соответственно. Если болен один из родителей, то вероятность БА у ребенка составляет 20–50 %, а если больны оба родителя, то она достигает 65 %. Общая частота БА в популяции – 4–10 %, а среди близких родственников больного БА – 10–25 % [1].

Долгое время вопрос о типе наследственности при БА оставался нерешенным. Ранние исследования позволили предположить аутосомно-доминантный тип наследования с неполной пенетрантностью [4, 5].

Особое внимание в последние годы уделяется генетической основе формирования болезни. Наиболее распространенным методом изучения генетических механизмов БА является поиск ассоциаций заболевания с полиморфизмом кандидатных генов [6, 7]. За последние 10–15 лет в ходе генетических исследований были выявлены многочисленные гены, обуславливающие предрасположенность к заболеванию БА [7–9]. Но, несмотря на явные успехи в этой области, до полного понимания механизмов развития БА все еще далеко [8, 9]. Имеющиеся результаты нередко носят противоречивый характер, что подтверждает необходимость анализа ассоциаций с БА полиморфизма еще не исследованных в этом отношении генов.

В настоящее время представляет интерес ген рецептора макрофаг-колониестимулирующего фактора c-fms (РМКСФ). Ген РМКСФ экспрессируется в клетках моноцитомакрофагального ряда, включая остеокласты, в клетках миелоидных предшественников и трофобластах при плацентарном развитии эмбрионов [10, 11].

Ген РМКСФ человека локализован в районе длинного плеча q33–q34 хромосомы 5, имеет размер около 61 000 пн и состоит из 22 экзонов и 21 интрона [11]. Транскрипцию гена регулируют 2 тканеспецифических промотора, далеко отстоящих друг от друга (25 тпн) [11]. Один из 2 промоторов, расположенный

перед 1-м нетранслируемым экзоном, активен в клетках плаценты. Другой промотор, локализованный в конце 1-го интрона и в 1-й четверти 2-го экзона, функционирует в моноцитах / макрофагах [11].

Различия в уровне экспрессии при дифференцировке и пролиферации разных субпопуляций макрофагов и миелоидных предшественников показаны в ряде исследований [11].

Экспрессия гена РМКФСФ позитивно и негативно модулируется значительным числом цитокинов, глюкокортикоидами и клеточными метаболитами [12, 13].

В гене РМКФСФ человека обнаружены 2 полиморфных сайта: один — в последнем интроне в позиции 34047 G>A, другой — в виде измененного динуклеотида в 3'-нетранслируемой области гена на расстоянии 34 пн от стоп-кодона трансляции, в позициях 34293 и 34294 TC>CA.

Рецептор (CSF-1R) и его лиганд — колониестимулирующий фактор участвуют в пролиферации и дифференцировке моноцитов, остеокластов и выполняют другие функции.

В аллеле, содержащем инсерцию, нуклеотидная последовательность 11-го интрона в районе локализации полиморфного сайта содержит такие мотивы регуляции транскрипции (ets, CArG, c-myc и т. д.), которые потенциально могли бы изменять уровень транскрипции гена в некоторых клеточных ситуациях и определять специфическую для CSF-1R передачу митогеноактивируемого сигнала к генам-мишеням [12, 14].

Аллель, у которого отсутствует фрагмент ДНК 11-го интрона, ограничен в способности модулировать экспрессию гена РМКФСФ в ответ на некоторые внешние сигналы, в частности на воздействие CSF-1. Продукты активности макрофагов запускают и контролируют иммунный ответ и работу других участвующих в нем клеток.

Мутации в этом гене связывают с агрессивностью злокачественных опухолей [15]. Обсуждается возможная роль гена в органогенезе и атерогенезе [16]. Изучен полиморфизм гена РМКФСФ при сердечно-сосудистых заболеваниях и острых неспецифических инфекциях нижних дыхательных путей [16, 17].

Роль гена РМКФСФ в патогенезе БА еще окончательно не определена.

Цель настоящей работы — установить вероятность и закономерности наследования БА в семьях и изучить связь БА с полиморфизмом гена РМКФСФ.

Материалы и методы

Была обследована 81 семья больных БА (всего 264 человека) жителей Красноярска. В каждой семье выделялся пробанд с верифицированной БА. В основную группу вошли 81 пациент с БА и 183 их родственника I–III степени родства, в т. ч. 73 (39,8 %) мужчины и 110 (60,2 %) женщин. Сегрегационную частоту заболевания и тип наследования выявляли в 63 семьях. Средний возраст пробандов составил $45,65 \pm 0,12$ года, родственников — $49,15 \pm 0,24$ года. Отбор пробандов производился в период их стацио-

нарного лечения в пульмонологическом отделении МУЗ ГКБ № 20. Среди всех родственников были выделены лица с БА, другими различными аллергическими заболеваниями (аллергический ринит, атопический дерматит и др.) и здоровые. В соответствии с критериям GINA [1] легкая интермиттирующая БА была выявлена у 22 (27,2 %) человек, легкая персистирующая — у 13 (16,1 %), БА средней степени тяжести — у 29 (35,8 %), тяжелая — у 17 (20,9 %).

Было проведено комплексное клинико-функциональное обследование пациентов с БА. Диагноз БА устанавливался на основании критериев, изложенных в национальных согласительных документах [1]. У всех пациентов собирали анамнез заболевания, аллергологический анамнез, определяли общий анализ крови. Проводили спирографическое исследование, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, ежедневно определяли утренние и вечерние показатели пиковой скорости выдоха (ПСВ). На основании клинических данных, показателей ПСВ, данных спирографии определяли степень тяжести обострения БА по общепринятым критериям [1].

В группу сравнения вошли практически здоровые люди ($n = 263$; средний возраст — $32,70 \pm 1,36$ года).

Молекулярно-генетические исследования проведены на базе НИИ терапии СО РАМН (Новосибирск).

Генотипирование осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанные в литературе. Для выявления полиморфизма в виде измененного динуклеотида в 3'-нетранслируемой области гена c-fms на расстоянии 34 пн от стоп-кодона трансляции, в позициях 34293 и 34294 TC>CA гена c-fms использовали следующие праймеры: 34056-5'-GGCCT-GATGG-ATCTG-GACTG 3' — общий, 34313-5'-TGGAG-GAGTT-GAAGT-TTGGA-3' — для дикого типа и 34313-5'-TGGAG-GAGTT-GAAGT-TTGTG 3' — для мутантного типа. Аллель-специфическую ПЦР (35 циклов) проводили в режиме: денатурация — 1 мин при 95 °C; отжиг — 0,8 мин при 58 °C; синтез — 1,2 мин при 72 °C. Смесь для ПЦР объемом 12,5 мкл включала: Трис-HCl (pH 9,0) — 75 mM; (NH₄)₂ SO₄ — 20 mM; Tween-20 — 0,01 %; каждого праймера — по 0,4 мкМ; по 0,24 mM раствора каждого из 4 dNTP; MgCl₂ — 2,5 mM; 0,6 единиц — Tag полимеразы; 0,5 мкг ДНК. Продукты ПЦР оценивали электрофорезом в 4%-ном полиакриламидном геле, окрашивание проводили бромистым этидием.

Полученные результаты обрабатывали с помощью методов описательной статистики, коэффициента ранговой корреляции Спирмена, используя программу *Biostat*. Значения $p < 0,05$ принимались как достоверные различия.

Результаты и обсуждение

Одним из доказательств наследственной предрасположенности к БА является семейная агрегация дан-

Таблица 1
Сегрегационный анализ в семьях пробандов с БА

Размер sibства	Число sibств (N)	Общее число детей в выборке (S)	Число sibств с пораженными детьми			Общее число пораженных детей (R)
			1 пораженный ребенок	2 пораженных ребенка	3 пораженных ребенка	
2-сисбсовые	54	108	33	21	–	75
3-сисбсовые	9	27	3	–	6	21
Всего	63	135	36	21	6	96

ной патологии, превышающая распространенность заболевания в популяции. Был установлен факт семейной агрегации заболевания в семьях пробандов с БА. По нашим данным, заболеваемость БА в семьях достигла 18,03 % (33 больных родственника из 183), что значимо превышало популяционную частоту заболевания (по данным R.R.Dodge, B.Burrows, популяционная частота составила 6,6 % [18]). Отмечена зависимость БА от степени родства с пробандом (чем выше степень родства, тем чаще страдали этой патологией родственники). В семьях пробандов с БА наибольший процент пораженных приходился на родственников I степени. Так, БА обнаружена у 24 (72,7 %) обследованных I степени родства и только у 7 (21,2 %) – II степени родства. По нашим данным, среди родственников I степени родства наиболее подвержены БА матери (12,1 %), сестры (15,2 %), дочери (24,2 %) и сыновья (9,1 %).

В семьях с БА были выявлены также другие аллергические заболевания: атопический дерматит – в 38 (28,76 %), аллергический ринит – в 20 (10,92 %), поллиноз – в 6 (3,27 %) случаях.

Наследуемость подверженности (H^2) определялась в рамках модели *Falconer*, которая постулирует нормальное распределение подверженности в популяции и среди родственников I степени родства. Согласно данной модели, коэффициент регрессии подверженности БА:

$$b = \frac{Xq - Xr}{a} = \frac{1,506 - 0,915}{1,941} = 0,31,$$

где Xq – пороговая точка распределения подверженности в популяции; Xr – пороговая точка распределения подверженности среди родственников; a – средняя величина подверженности больных в популяционной выборке.

Данные величины были взяты из таблицы-приложения к формуле для расчета коэффициента регрессии.

Коэффициент наследуемости определяется по формуле:

$$H^2 = \frac{b}{r} = \frac{0,31}{2} = 0,15,$$

где r – коэффициент родства, равный 2 для родственников I степени родства.

Таким образом, наследуемость подверженности БА по модели *Falconer* составила 15 %, остальные 85 %, наиболее вероятно, приходятся на средовые факторы в развитии БА.

Значение генетических факторов становится более очевидным при проверке соответствия заболевания законам наследования. При наличии значимого генетического компонента в детерминации патологии вариативность распределения отличающихся друг от друга фенотипов в семьях обусловлена различными механизмами наследования. Поэтому следующим этапом исследования после доказательства неслучайности семейной агрегации заболевания и установления значимой роли наследственности в формировании БА является сегрегационный анализ, заключающийся в оценке соответствия ожидаемых при определенном типе наследования и наблюдаемых сегрегационных частот. Для сбора семейного материала использовали единичную регистрацию. В выборке представлены семьи брака "больной–здоровый". Для формального генетического анализа типа наследования использован метод Вайнберга для единичной регистрации.

Для проведения сегрегационного анализа использовалась группа больных БА. В табл. 1 представлены sibства для анализа сегрегационной частоты БА.

Все числовые данные в формуле Вайнберга для единичной регистрации взяты из табл. 1.

Пробандовый метод Вайнберга:

$$SF = \frac{R - N}{S - N} = \frac{96 - 63}{135 - 63} = \frac{33}{72} = 0,458$$

$$t = \frac{|SF - \hat{SF}|}{\sqrt{\frac{SF(1-SF)}{S - N}}}$$

$$t_{(аутос-домин)} = \frac{|0,458 - 0,5|}{\sqrt{\frac{0,458(1-0,458)}{135 - 63}}} = \frac{|-0,042|}{\sqrt{\frac{0,458 \times 0,542}{72}}}$$

$$\frac{0,042}{\sqrt{\frac{0,248}{72}}} = \frac{0,042}{0,0583} = 0,72 \quad (t < 2,58)$$

$$t_{(аутос-рец)} = \frac{0,458 - 0,25}{\sqrt{\frac{0,458(1-0,458)}{135 - 63}}} = \frac{0,208}{0,0583} = 3,568 \quad (t > 2,58)$$

Согласно законам экспериментальной генетики, аутосомно-доминантный тип наследования, вычисляемый по методу Вайнберга, определяется, если критерий наследуемости $t < 2,58$. Учитывая результаты

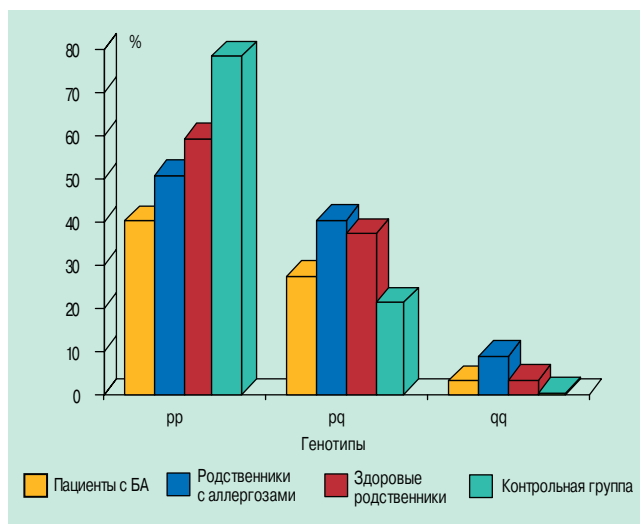


Рисунок. Полиморфизм гена РМКСФ у больных БА и их родственников

пробандового метода сегрегационного анализа в семьях, пробанды которых страдают БА, мы предполагаем аутосомно-доминантный тип наследования данной патологии.

У исследуемых больных БА совместно с сотрудниками НИИ терапии СО РАМН был изучен полиморфизм гена РМКСФ (рисунок). Молекулярно-генетическое исследование было проведено у 91 пациента с БА, 57 родственников с другими аллергическими заболеваниями и 80 здоровых родственников.

Распределение частот генотипов исследованных полиморфных локусов гена РМКСФ у больных БА, их родственников и лиц контрольной группы представлено в табл. 2.

Распределение генотипов по полиморфным вариантам гена РМКСФ у здоровых лиц в исследованной популяции соответствовали ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга.

По полученным данным, у пробандов и их родственников, страдающих различными аллергическими заболеваниями, достоверно преобладал гетерозиготный генотип гена РМКСФ, в отличие от группы сравнения: соответственно у 35 (27,56 %) и 23 (40,35 %) человек, по сравнению с 56 (21,3 %) в группе сравнения ($p < 0,05$). У пробандов и их родственников с аллергическими заболеваниями

преобладал гомозиготный генотип по редкому аллелю соответственно у 4 (3,15 %), 5 (8,77 %) больных и у 1 (0,4 %) человека в группе сравнения ($p < 0,05$).

Анализ частоты аллелей в изучаемых группах позволил выявить преобладание носителей аллеля СА среди больных БА и их родственников в сравнении с группой контроля: у 43 (23,88 %) больных, 33 (28,95 %) родственников с аллергией, 38 (22,09 %) здоровых родственников и 58 (11,03 %) здоровых ($p < 0,05$).

Гетерозиготный генотип ТС / СА гена РМКСФ и гомозиготный генотип по редкому аллелю СА / СА можно рассматривать как генетические предикторы формирования БА. Родственников пробандов с различными проявлениями аллергии и генотипом ТС / СА и СА / СА можно отнести к группе риска развития данной патологии. Носители аллеля СА гена РМКСФ имеют достаточно большой риск развития БА по сравнению с контрольной группой.

Заключение

Выявлено семейное накопление БА в семьях пробандов с данной патологией. Частота БА в семьях составила 18,03 %, что значительно превышает популяционную частоту заболевания. Наибольший процент пораженных – родственники I степени родства. Наследуемость подверженности БА составила 15 %, остальные 85 % приходятся на факторы среды, провоцирующие развитие заболевания. Сегрегационный анализ БА выявил аутосомно-доминантный тип наследования данной патологии. Гетерозиготный вариант генотипа и гомозиготный генотип по редкому аллелю гена РМКСФ можно рассматривать как генетические предикторы возникновения БА. Носительство аллеля СА является также фактором риска формирования БА. Родственников пробандов с генотипом ТС / СА и СА / СА и носителей аллеля СА можно отнести к группе риска.

В целом, анализ данных литературы и результатов нашего исследования показывает, что возникновению БА во многих случаях может способствовать наследственная предрасположенность. Несомненно, что дальнейшие поиски генов-кандидатов БА остаются актуальными. Определение патогенетического значения полиморфных вариантов гена РМКСФ важно для понимания патогенеза БА и решения клинических задач.

Таблица 2
Распределение генотипов и частот аллелей в исследуемых группах гена РМКСФ

Генотипы и аллели	БА $p; n$ (%)	Родственники с аллергиями $p; n$ (%)	Здоровые родственники $p; n$ (%)	Контроль n (%)
ТС / ТС	0,0001; 51 (40,16)	0,0001; 29 (50,88)	0,0001; 47 (59,3)	206 (78,3)
ТС / СА	0,0001; 35 (27,56)	0,004; 23 (40,35)	0,005; 32 (37,2)	56 (21,3)
СА / СА	0,021; 4 (3,5)	0,0001; 5 (8,77)	0,07; 3 (3,48)	1 (0,4)
ТС	0,0001; 137 (76,11)	0,0001; 81 (71,05)	0,0001; 134 (77,81)	468 (88,97)
СА	0,0001; 43 (23,88)	0,0001; 33 (28,95)	0,0001; 38 (22,09)	58 (11,03)

Примечание: p – частота; n – число индивидов.

Литература

1. Чучалин А.Г. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). М.: Атмосфера; 2002.
2. Балаболкин И.И. Бронхиальная астма у детей. М.: Медицина; 2003.
3. Василевский И.В., Суковатых Т.Н., Ростовцев В.Н. Некоторые вопросы семейного наследования бронхиальной астмы. Педиатрия 1986; 12: 19–23.
4. Разгаускас Э.Ф., Кучинскас В.К. В кн.: Пороки развития и генетически обусловленные формы хронических неспецифических заболеваний легких. Л; 1978. 130–131.
5. Sibbald B. Familial inheritance of asthma and allergy. In: Kay A.B., ed. Allergy and allergic diseases. Oxford: Blackwell Science; 1997. 1177–1186.
6. Cookson W.O.C., Moffatt M.F. Genetics of asthma and allergic disease. Hum. Mol. Genet. 2000; 16 (9): 2359–2364.
7. Пузырев В.П., Степанов В.А., Фрейдлин М.Б. Молекулярные основы распространенных мультифакториальных заболеваний. В кн.: Иванов В.И., Кисилев Л.Л. (ред.). Геномика — медицине. М.: ИКЦ "Академкнига"; 2005.
8. Огородова Л.М., Федорова О.С., Брагина Е.Ю. и др. Генетические маркеры бронхиальной астмы у детей, больных atopическим дерматитом. Пульмонология 2007; 4: 37–40.
9. Holloway J.W., Jongepier H., Beghe B. et al. The genetics of asthma. Eur. Respir. Monogr. Asthma 2003; 8 (23): 26–57.
10. Sherr C.J. Colony-stimulating factor-1 receptor. Blood 1990; 75: 1–12.
11. Hampe A., Shamooin B.M., Gobet M. et al. Nucleotide sequence and structural organization of the human FMS proto-oncogene. Oncogene Res. 1989; 4: 9–17.
12. Lee A., States D. Both Src-dependent and – independent mechanisms mediate phosphatidylinositol 3-kinase regulation of colony-stimulating factor 1 – activated mitogen-activated protein kinase in myeloid progenitors. Mol. Cell. Biol. 2000; 20: 6779–6798.
13. Sapi E., Flick M., Gilmore-Hebert M. et al. Transcriptional regulation of the c-fms (CSF-1R) proto-oncogene in human breast carcinoma cells by glucocorticoids. Oncogene 1995; 10: 529–542.
14. Fowles L., Martin M., Nelsen L. et al. Persistent activation of mitogen-activated protein kinases p42 and p44 and ets-2 phosphorylation in response to colony-stimulating factor 1 / c-fms signaling. Mol. Cell. Biol. 1998; 18: 5148–5156.
15. Tangir J., Bonafe N., Gilmore-Hebert M. et al. SGK1, a potential regulator of c-fms related breast cancer aggressiveness. Clin. Exp. Metastas. 2004; 21 (6): 477–483.
16. Iso Y., Suzuki H., Sato T. et al. Contribution of monocyte chemoattractant protein-1 and c-fms / macrophage colony-stimulating factor receptor to coronary artery disease: analysis of human coronary atherectomy specimens. J. Cardiol. 2003; 42 (1): 29–36.
17. Логвиненко Н.И. Некоторые особенности этиологии, клиники, влияние генетических факторов на формирование воспаления (на модели современных пневмоний в Новосибирске): дис. ... д-ра мед. наук. Новосибирск; 2003.
18. Биличенко Т.Б. Эпидемиология бронхиальной астмы. В кн.: Чучалин А.Г. (ред.) Бронхиальная астма. М.; 1997. 400–419.

Информация об авторах

Черкашина Ирина Ивановна – к. м. н., доцент кафедры внутренних болезней № 1 ГОУ ВПО "Красноярская государственная медицинская академия"; тел.: (391) 264-29-80; e-mail: cherkashina@list.ru
 Никулина Светлана Юрьевна – д. м. н., проф., проректор по учебной работе ГОУ ВПО "Красноярская государственная медицинская академия"; тел.: (391) 220-09-14; e-mail: nikulina@mail.ru
 Логвиненко Надежда Ивановна – д. м. н., проф. кафедры терапии ФПК ППВ ГОУ ВПО "Новосибирский государственный медицинский университет"; тел.: (383) 220-86-45; e-mail: nadejda-logvinenko@yandex.ru
 Максимов Владимир Николаевич – д. м. н., старший научный сотрудник ГУ НИИ терапии СО РАМН; e-mail: medik11@mail.ru
 Либердовская Евгения Дмитриевна – врач пульмонологического отделения МУЗ "ГКБ № 20 им. И.С.Берзона"; тел.: (391) 264-29-80; e-mail: gkb20@mail.ru

Поступила 10.03.08
 © Коллектив авторов, 2008
 УДК 616.248-092