

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.1:616.23/.24

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ *CARD15* И *TLR4*
ПРИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

© 2011 г. О. Е. Воронько¹, Е. В. Дмитриева-Здорова^{1*}, Е. А. Латышева²,
М. Г. Аксенова³, Г. И. Сторожаков⁴, Н. В. Бодоев¹, А. И. Арчаков¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича
Российской академии медицинских наук, Москва, 119121

²Институт иммунологии Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 117997

³Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды
им. А.Н. Сысина Российской академии медицинских наук, Москва, 119992

⁴Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова Федерального агентства
по здравоохранению и социальному развитию, Москва, 117997

Поступила в редакцию 28.06.2010 г.

Принята к печати 17.01.2011 г.

С целью определения уровня ассоциации полиморфных маркеров G(+2722)C и 3020insC гена *CARD15* и Asp299Gly гена *TLR4* с развитием атопической бронхиальной астмы проведен сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов этих маркеров у русских жителей Москвы (283 больных атопической бронхиальной астмой и 227 здоровых доноров). Не установлено ассоциации маркеров G(+2722)C и 3020insC гена *CARD15* и Asp299Gly гена *TLR4* с развитием атопической бронхиальной астмы, а также маркеров гена *CARD15* с тяжестью течения заболевания. Не выявлено ассоциации гаплотипов гена *CARD15* ни с атопической бронхиальной астмой, ни с тяжестью ее течения. Обнаружена выраженная ассоциация маркера Asp299Gly гена *TLR4* с тяжестью атопической бронхиальной астмы. Показано, что аллель Asp ассоциирован с легким течением атопической бронхиальной астмы, а минорный аллель Gly – с более тяжелым течением заболевания ($p = 0.04$, $OR = 0.50$ и $OR = 2.01$ соответственно).

Ключевые слова: атопическая бронхиальная астма, масс-спектрометрия MALDI-TOF, полиморфные маркеры G(+2722)C и 3020insC гена *CARD15*, Asp299Gly гена *TLR4*.

CARD15 AND *TLR4* GENES POLYMORPHISMS IN ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA, by O. E. Voronko¹, E. V. Dmitrieva-Zdorova^{1*}, E. A. Latysheva², M. G. Aksenova³, G. I. Storozhakov⁴, N. V. Bodoev¹, A. I. Archakov¹ (¹Orekchovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119121 Russia; *e-mail: inst@ibmc.msk.ru; ²Institute of Immunology, Moscow, 117997 Russia; ³Sysin Institute for Human Ecology and Environmental Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119992 Russia; ⁴Pirogov Russian State Medical University, Moscow, 117997 Russia). In order to investigate whether single nucleotide polymorphisms G(+2722)C and 3020insC in *CARD15* gene and Asp299Gly in *TLR4* gene contribute to atopic bronchial asthma we performed a comparative analysis of alleles and genotypes frequencies of these polymorphisms in Russian patients from Moscow. DNA samples from 283 patients with atopic bronchial asthma and 227 healthy donors were genotyped. There were associations neither of G(+2722)C and 3020insC in *CARD15* gene and Asp299Gly in *TLR4* gene with asthma nor of markers of *CARD15* gene with asthma severity. Haplotype frequency analysis of *CARD15* gene polymorphisms did not reveal significant difference between groups. However, a strong association was found between Asp299Gly and asthma severity. Allele Asp of this marker showed association with mild atopic bronchial asthma and allele Gly – with moderate/severe asthma ($OR = 0.47$, 95% CI [0.24–0.93] and $OR = 2.12$, 95% CI [1.08–4.18] respectively).

Keywords: atopic bronchial asthma, MALDI-TOF mass spectrometry, polymorphic markers G(+2722)C and 3020insC in *CARD15* gene, Asp299Gly in *TLR4* gene.

Бронхиальная астма (БА) – одно из самых распространенных и тяжелых многофакторных заболеваний бронхолегочной системы. Предрасполо-

женность к БА как к многофакторному заболеванию определяется взаимодействием генов с факторами окружающей среды. Анализ ассоциации

Принятые сокращения: БА – бронхиальная астма; CI – доверительный интервал; ПЦР – полимеразная цепная реакция; *CARD15* – ген белка 15, содержащего каспазоактивирующий домен; *TLR4* – ген Toll-подобного рецептора 4; ЛПС – липополисахарид.

* Эл. почта: inst@ibmc.msk.ru

Таблица 1. Общая характеристика обследованных групп

Характеристика	Больные атопической бронхиальной астмой (<i>n</i> = 283)		Контрольная группа, здоровые индивиды (<i>n</i> = 227)
	астма легкой степени тяжести (<i>n</i> = 131)	астма средней и тяжелой степени (<i>n</i> = 152)	
Пол, м/ж	71/60	65/87	103/124
Возраст, лет	34.4 ± 13.4	41.8 ± 16.2	38.5 ± 10.4
Длительность заболевания, лет	11.9 ± 8.6	13.1 ± 8.4	—
Общий IgE, кЕ/л	215 (53; 605)	240 (108; 625)	45 (23; 89)
FEV1	87.5 (82.1; 93.3)	48.6 (28.7; 64.2)	—
FEV1/FVC	78.3 (63.2; 82.1)	58.7 (42.4; 68.3)	—

Примечание. Данные о возрасте и длительности астмы представлены в формате $M \pm SD$, где M – среднее, SD – стандартное отклонение. Концентрация общего IgE, FEV1 и FEV1/FVC – в формате $Me (25; 75\%)$, где Me – медиана, 25–75% – интерквартильный интервал. Для FEV1 и FEV1/FVC данные приведены в процентах от должной величины (FEV1 – объем форсированного выдоха за 1 с; FVC – форсированная жизненная емкость легких).

полиморфных маркеров генов-кандидатов, продукты которых участвуют в патогенезе атопической БА, и оценка их вклада в развитие заболевания представляют актуальную задачу современной медицинской генетики.

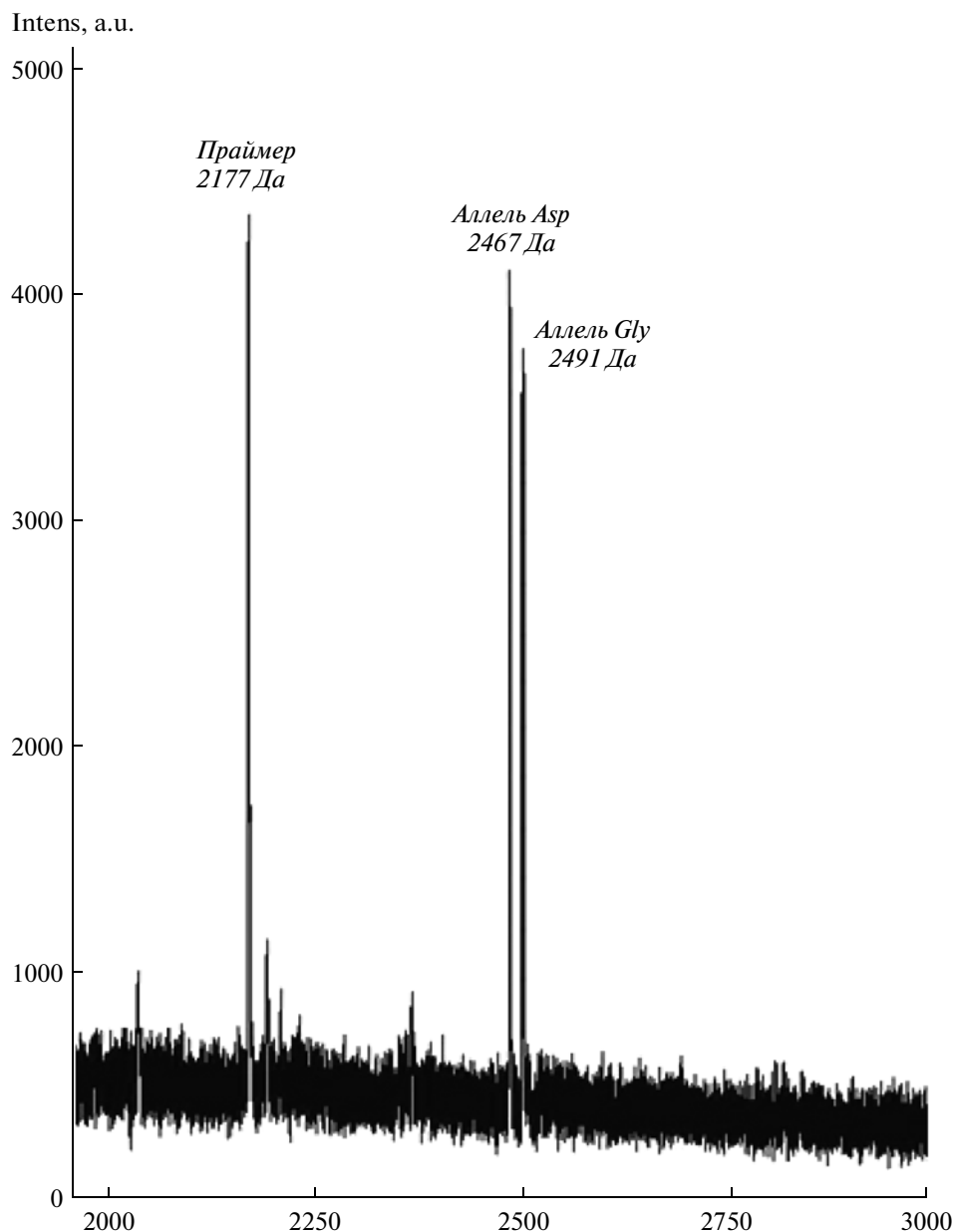
В настоящее время существует гипотеза, согласно которой длительный контакт с микробным антигеном или перенесенные в раннем возрасте инфекции защищают от развития Th2-опосредованных атопических заболеваний. Многочисленные исследования подтверждают, что нарушение активации Th1-клеток приводит к смещению дифференцировки наивных Т-хелперов (Th0) в сторону образования клеток Th2 и к развитию заболеваний с аллергическим компонентом [1, 2]. Следовательно, мутации в генах, продукты которых вовлечены в распознавание микробных антигенов, могут вносить серьезный вклад в предрасположенность к развитию аллергических заболеваний и БА [3, 4]. Эта гипотеза подтверждается ассоциацией полиморфных маркеров в генах, связанных с активацией Th1-опосредованного воспаления (*CD14*, *TLR4*, *CARD15*), с развитием и тяжестью атопических заболеваний [5–7].

В представленной работе анализировали ассоциацию трех полиморфных маркеров – G(+2722)C и 3020insC в гене *CARD15* и Asp299Gly в гене *TLR4*, с атопической БА. Следует отметить, что в России изучение ассоциации полиморфных маркеров этих генов с БА проводится впервые. До настоящего времени внимание российских ученых было сосредоточено в основном на ассоциации с БА генов интерлейкинов и их рецепторов, а также генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков [8–14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали образцы ДНК больных атопической БА (*n* = 283) и здоровых индивидов (*n* = 227). Образцы ДНК и данные клинического обследования больных атопической БА предоставлены кафедрой госпитальной терапии № 2 лечебного факультета Российского государственного медицинского университета Росздрава. Образцы ДНК здоровых доноров предоставлены лабораторией молекулярно-генетической диагностики НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН. В контрольную группу вошли здоровые жители Москвы без клинически диагностированной атопической БА, аллергических и бронхолегочных заболеваний. Общая характеристика групп представлена в табл. 1. Этнически однородные выборки составлены из русских (на основании паспортных данных) жителей Москвы. Для выявления ассоциации полиморфных маркеров с тяжестью заболевания больных атопической БА разделили на две подгруппы согласно критериям GINA (Global Initiative For Asthma) [15]: больные с БА легкой степени тяжести (*n* = 131) и больные со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания (*n* = 152).

Генотипы полиморфных маркеров определяли при помощи времяпролетной масс-спектрометрии с лазерно-десорбционной ионизацией образца в матрице (MALDI-TOF). Качество генотипирования определяли с использованием отрицательного (пробы, не содержащие ДНК) и положительного контроля (образцы ДНК с известным генотипом, установленным методом ПДРФ). Вначале проводили ПЦР-амплификацию локуса, содержащего анализируемую нуклеотидную замену. Праймеры подбирали с помощью программы Primer Premier 5.0. Полиморфные участки выбранных генов амплифицировали в 15 мкл смеси, содержащей 1.5 мкл 10×



Пример MALDI-TOF-спектра, по которому определяли генотипы полиморфного маркера Asp299Gly гена *TLR4*. Представлен гетерозиготный генотип Asp/Gly.

буфера для Taq-полимеразы с сульфатом аммония (“Диалат”, Москва), 1.5 мМ $MgCl_2$ (“Хеликон”, Москва), 200 мкМ смеси dNTP (“Fermentas”, Литва), по 10 пмоль каждого праймера: (для G(+2722)C F – 5'-GGA-TTG-AGT-GGT-CCT-GCC-C-3' и R – 5'-CCT-GAT-CTC-CCC-AAG-AAA-ACT-G-3', для 3020insC F – 5'-ATT-GTA-TCT-TCT-TTT-CCA-GGT-TGT-C-3' и R – 5'-CTG-AAT-GTC-AGA-ATC-AGA-AGG-GAT-3'; для Asp299Gly F – 5'-GCT-GGT-TTA-GAA-GTC-CAT-CGT-T-3' и R – 5'-TTT-ACC-CTT-TCA-ATA-GTC-ACA-CTC-A-3') (“Синтол”, Москва), 1 ед. акт. BioTaq-полимеразы (“Диалат”) и 100 нг геномной ДНК. ПЦР проводи-

ли на амплификаторе “Tetrad 2” (“BioRad”, США) по следующей программе: начальная денатурация – 94°C – 3 мин; далее 35 циклов – 94°C – 15 с, 57°C – 15 с, 72°C – 15 с.

К 8 мкл ПЦР-продукта добавляли 0.5 ед. акт. щелочной фосфатазы креветок (“Fermentas”, Литва) и инкубировали по следующей программе: 37°C – 30 мин, 85°C – 10 мин.

Затем проводили реакцию минисеквенирования (удлинения праймера), в которой использовали специфичный праймер, меченный биотином (bio) с 5'-конца и содержащий фотолинкерную вставку (*L*) в 8-м положении с 3'-конца: для

Таблица 2. Распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров PV92 и TRA25 в группе больных атопической бронхиальной астмой и в контрольной группе

Аллель/ генотип	Частота аллелей и генотипов		<i>p</i>
	астма общая (<i>n</i> = 283)	контроль (<i>n</i> = 227)	
PV92			
D	0.840	0.809	0.213
I	0.160	0.191	
D/D	0.704	0.640	0.129
I/D	0.272	0.337	0.120
I/I	0.024	0.023	1
TRA25			
D	0.561	0.546	0.704
I	0.439	0.454	
D/D	0.287	0.264	0.619
I/D	0.547	0.564	0.721
I/I	0.166	0.172	0.906

G(+2722)C – 5'-bio-CTC-GTC-ACC-CAC-TLC-TGT-TGC-3'; для 3020insC – 5'-bio-TGG-TGT-CAT-TCC-TLT-CAA-GGG-3'; для Asp299Gly – 5'-bio-TAG-CAT-ACT-TAG-ACT-ACL-CTC-GAT-G-3' ("Синтол", Россия). Реакцию проводили в 16 мкл смеси, содержащей 10 мкл ПЦР-продукта, обработанного щелочной фосфатазой, 1.5 мкл 10× буфера для Taq-полимеразы с сульфатом аммония ("Диалат"), 1.5 мМ MgCl₂ ("Хеликон"), по 100 мкМ необходимых ddNTP ("Fermentas"), 10 пмоль праймера, 2 ед. акт. Thermoseq-полимеразы ("Диалат"). Реакцию минисеквенирования проводили на амплификаторе "Tetrad 2" ("BioRad") по следующей программе: начальная денатурация – 94°C – 2 мин, далее 60 циклов – 94°C – 10 с, 56°C – 10 с, 72°C – 10 с.

Продукты минисеквенирования очищали на стрептавидиновых 96-луночных плашках с использованием набора Genostrep 96 kit ("Bruker Daltonics", Германия) согласно рекомендациям производителя. Матрицу (смесь 3-гидроксипиколиновой кислоты (3-НРА) и цитрата аммония (ДАНС) в конечных концентрациях 10 и 1 мг/мл соответственно) в количестве 1 мкл наносили на мишень AnchorChipTM 400/96 ("Bruker Daltonics") и высушивали при комнатной температуре. Затем наносили 1 мкл очищенного образца, УФ-обработанного в течение 15 мин. После высыхания образца мишень помещали в масс-спектрометр Microflex ("Bruker Daltonics") и определяли генотипы, исходя из размеров неупорядоченного праймера и праймеров с присоединенным на 3'-конце нуклеотидом, соответствующим искомому аллелю полиморфного маркера (рисунок).

Для сравнения частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров в группах больных и здоровых индивидов, а также в группах, выделенных по степени тяжести БА, использовали точный двусторонний критерий Фишера (SISA online statistical analysis, Нидерланды). Статистически значимыми считали различия при *p* < 0.05. Относительный риск развития заболевания оценивали с помощью показателя соотношения шансов (odds ratio, OR). Значение OR и 95% доверительный интервал (95% CI) вычисляли с помощью программы Calculator for confidence intervals of odds ratio [16]. OR = 1 рассматривали как отсутствие ассоциации; OR > 1 – как положительную ассоциацию ("фактор предрасположенности"), OR < 1 – как отрицательную ассоциацию аллеля или генотипа с заболеванием ("фактор устойчивости"). Частоты гаплотипов рассчитывали с помощью EM алгоритма (Expectation-Maximization Algorithm, программа Hapstat, США), который позволяет получить максимально правдоподобные оценки частот гаплотипов из мультилокусных генотипических данных при неизвестной гаметической фазе.

Происхождение выборок (больных и здорового контроля) из одной популяции подтверждали генотипированием образцов ДНК по двум Alu-маркерам (PV92 и TRA25), которые широко применяются в популяционных исследованиях. Генотипы полиморфных маркеров PV92 и TRA25 идентифицировали при помощи ПЦР по схеме, приведенной выше, с использованием праймеров: для PV92 – 5'-AAC-TGG-GAA-AAT-TTG-AAG-AGA-AAG-T-3' и R – 5'-TGA-GTT-CTC-AA-CTC-CTG-TGT-GTT-AG-3'; для TRA25 F – 5'-GTA-AGA-GTT-CCG-TAA-CAG-GAC-AGC-T-3' и R – 5'-CCC-CAC-CCT-AGG-AGA-ACT-TCT-CTT-T-3'. Сравнение распределения аллелей и генотипов Alu-маркеров не выявило статистически значимых различий между выборками (табл. 2), что свидетельствует о генетической гомогенности обеих выборок по данным маркерам и дает нам основание предполагать, что обе выборки принадлежат одной популяции.

С использованием программы Hardy-Weinberg equilibrium calculator в обеих выборках проведен тест на соответствие распределений аллелей и генотипов рассматриваемых полиморфных маркеров, а также Alu-маркеров PV92 и TRA25 закону Харди-Вайнберга [17]. Установлено, что распределения аллелей и генотипов маркеров подчиняются закону Харди-Вайнберга.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Toll-подобный рецептор 4 (TLR4, CD284) – мембранный белок, связанный с внеклеточным распознаванием липополисахарида (ЛПС) бактерий и активирующий клеточный иммунный ответ. TLR4 содержит два домена – внеклеточный, богатый остатками лейцина, с помощью которого осуществляется прямое взаимодействие с лигандами

Таблица 3. Частоты аллелей полиморфных маркеров G(+2722)C и 3020insC в гене *CARD15* и Asp299Gly в гене *TLR4* в различных популяциях

Маркер	Аллель	Минорный аллель, частота, %	Популяция	Ссылка
Asp299Gly гена <i>TLR4</i>	Gly	6–8	Русская	Наши данные
		6–8	Английская	[27]
		6–8	Французская	[31]
		8	Немецкая	[32]
		7–9	Австралийская	[33]
		6		[34]
		7	Европеоидная	[35]
		0	Японская	[36]
		0	Китайская	[23]
		G(+2722)C гена <i>CARD15</i>	C	1
2	Немецкая			[7]
3	Европеоидная			[37]
1–6	Французская			[38]
1	Африканская			[37]
2	Австралийская			[39]
3–5	Тунисская			[40]
0	Китайская			[37]
0	Японская			[41]
3020insC гена <i>CARD15</i>	ins			3–5
		4	Немецкая	[7]
		3	Европеоидная	[37]
		2–11	Французская	[38]
		0	Африканская	[37]
		7	Австралийская	[39]
		0–1	Тунисская	[40]
		0	Китайская	[37]
		0	Японская	[41]

микроорганизмов, и цитоплазматический, обеспечивающий передачу сигналов, приводящих к последовательной активации адапторных молекул, киназ, а затем ядерного фактора NF-κB, ответственного за транскрипцию специфических генов цитокинов и хемокинов [18]. *TLR4* присутствует на лейкоцитах различного типа, дендритных клетках, макрофагах и эпителиальных клетках [19].

Ген *TLR4* расположен на хромосоме 9q32-33, он состоит из трех экзонов. Среди 29 полиморфных маркеров гена *TLR4* наибольший интерес вызывает Asp299Gly. Этот маркер определяет аминокислотную замену во внеклеточном домене, посредством которого рецептор взаимодействует с микробными лигандами. Обнаружено, что маркер Asp299Gly гена *TLR4* ассоциирован со снижением иммунного ответа на ЛПС бактерий в результате уменьшения экспрессии *TLR4* и последующего прекращения взаимодействия *TLR4* с ЛПС [6]. Показано также, что маркер Asp299Gly отвечает за подавление передачи сигнала рецептором и снижение воспалительной реакции на грамотрицательные бактерии [20].

У детей из Швеции маркер Asp299Gly ассоциирован с увеличением риска развития атопической БА более чем в 4 раза ($OR = 4.5$) [21], а у турецких детей маркер Asp299Gly ассоциирован с тяжестью течения БА ($p = 0.032$) [22]. Поэтому предполагают, что ген *TLR4* не только связан с иммунным ответом на ЛПС, но и участвует в развитии атопической БА.

Полиморфный маркер Asp299Gly гена *TLR4* представляет собой однонуклеотидную замену A → G в экзоне 3 (положение +896), приводящую к замене остатка аспарагиновой кислоты на глицин в положении 299 во внеклеточном домене рецептора [23].

В нашей работе отмечено преобладание аллеля Asp и генотипа Asp/Asp полиморфного маркера Asp299Gly в обеих группах. Частота минорного аллеля Gly составила 6–8% в обеих группах, что совпадает с частотами в других популяциях (табл. 3). В группе больных БА наблюдалось повышение доли аллеля Gly на 2.1% и генотипа Gly/Gly на 2.6%, а в контрольной группе доля аллеля Asp увеличена на 2.1%, генотипов Asp/Asp и Asp/Gly – на 1.5 и 1% соответственно. При этом статистически значимых

Таблица 4. Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера Asp299Gly гена *TLR4* в группе больных атопической бронхиальной астмой и в контрольной группе

Аллель/ генотип	Частота аллелей и генотипов		<i>p</i>	Частота аллелей и генотипов		<i>p</i>	OR и 95% CI
	астма общая (<i>n</i> = 283)	контроль (<i>n</i> = 227)		астма легкой степени (<i>n</i> = 131)	астма средней и тяжелой степени (<i>n</i> = 152)		
Asp	0.920	0.941	0.22	0.948	0.898	0.04	0.50 [0.26–0.96]
Gly	0.080	0.059		0.052	0.102		2.01 [1.05–3.87]
Asp/Asp	0.866	0.881	0.69	0.901	0.836	0.12	–
Asp/Gly	0.109	0.119	0.78	0.091	0.125	0.45	–
Gly/Gly	0.025	0	0.08	0.008	0.039	0.13	–

различий в частотах не выявлено, что свидетельствует об отсутствии прямой ассоциации этого маркера с развитием атопической БА (табл. 4).

После сравнения частот аллелей и генотипов маркера Asp299Gly гена *TLR4* в группах, сформированных по степени тяжести БА, обнаружена выраженная ассоциация данного маркера с тяжестью течения БА у русских жителей Москвы. Снижение частоты аллеля Asp и генотипа Asp/Asp отмечено в группе больных со средним и тяжелым течением БА, а аллеля Gly и генотипов Asp/Gly и Gly/Gly – в группе с легким течением БА. Различия в частотах аллелей были статистически значимыми. Носительство аллеля Asp связано с легким течением БА (*OR* = 0.50, 95% CI [0.26–0.96]), а минорного аллеля Gly – с более тяжелым течением атопической БА (*OR* = 2.01, 95% CI [1.05–3.87]) (табл. 4).

Ассоциация маркера Asp299Gly с БА [21], обнаруженная у детей из Швеции, не подтвердилась в исследованиях, выполненных на других популяциях [24–26]. Таким образом, наши результаты согласуются с данными большинства других работ. Ассоциация маркера Asp299Gly с тяжестью течения БА, выявленная у турецких детей [22], подтверждает наши данные об ассоциации этого маркера с тяжестью БА. Тем не менее, согласно [27], маркер Asp299Gly не ассоциирован с тяжестью БА в Великобритании, однако с тяжестью атопии ассоциированы генотипы Asp/Gly и Gly/Gly маркера Asp299Gly.

Выявленная ассоциация полиморфного маркера Asp299Gly гена *TLR4* с тяжестью течения БА подтверждает предположение о том, что при нарушении взаимодействия человека с микробным антиге-

ном усиливается развитие аллергии и БА. Известно, что этот маркер ассоциирован с уменьшением синтеза *TLR4* и с прекращением взаимодействия *TLR4* с ЛПС. Вероятно, нарушение взаимодействия *TLR4* с ЛПС в большей степени влияет на прогрессию атопической БА, чем на ее возникновение.

Молекулы, распознающие микробные антигены, находятся и в цитозоле, где они опознают патоген и вызывают ответ, направленный на блокирование микробного действия за счет активации NF-κB-зависимого пути. CARD15 (белок 15, содержащий каспазоактивирующий домен) относится к семейству белков NOD1/APAF1, вовлеченных в запуск апоптоза, особенно в ответ на бактериальную инфекцию. CARD15 состоит из двух каспазных доменов, нуклеотидсвязывающего домена и рецепторного домена, обогащенного лейциновыми повторами (LRR, 10 повторов по 27 аминокислот), с помощью которого происходит распознавание ЛПС бактерий.

Ген *CARD15* расположен на хромосоме 16q.12, он содержит 13 однонуклеотидных полиморфизмов. Полиморфные маркеры гена *CARD15* ассоциированы с болезнью Крона (Th1-ассоциированное воспалительное заболевание кишечника) и псориазом [28, 29]. На сегодняшний день только в одной работе проведен поиск ассоциации маркеров гена *CARD15* с аллергическими заболеваниями и БА у немецких школьников. Оказалось, что носительство аллеля С маркера G(+2722)С увеличивает риск развития аллергического ринита в 3 раза, а аллергического дерматита – в 2 раза. Наличие вставки С в положении +3020 кодирующей области гена связано с

Таблица 5. Распределение аллелей и генотипов полиморфных маркеров G(+2722)C и 3020insC гена *CARD15* в группе больных атопической бронхиальной астмой и в контрольной группе

Аллель/ генотип	Частота аллелей и генотипов		<i>p</i>	Частота аллелей и генотипов		<i>p</i>
	астма общая (<i>n</i> = 283)	контроль (<i>n</i> = 227)		астма легкой степени (<i>n</i> = 131)	астма средней и тяжелой степени (<i>n</i> = 152)	
G(+2722)C						
G	0.989	0.987	0.775	0.981	0.997	0.101
C	0.011	0.013		0.019	0.003	
GG	0.979	0.974	0.773	0.962	0.993	
CG	0.021	0.026		0.038	0.007	
3020insC						
N	0.975	0.954	0.082	0.981	0.967	0.433
ins	0.025	0.046		0.019	0.033	
N/N	0.951	0.907	0.077	0.962	0.934	
N/ins	0.049	0.093		0.038	0.066	

возрастанием риска атопии на 50% [7]. Установлена также значительная ассоциация маркера G(+2722)C с повышенным уровнем общего IgE (*OR* = 2.16) [30]. Оба маркера находятся в области гена *CARD15*, кодирующей рецепторный домен LRR, т.е. они могут существенно влиять на связывание ЛПС с рецепторным доменом и последующую передачу сигнала.

Полиморфный маркер G(+2722)C гена *CARD15* представляет собой замену G → C в положении +2722 кодирующей области гена, в результате которой вместо остатка глицина в положении 881 в рецепторном домене появляется аргинин. Другой маркер, 3020insC, гена *CARD15* представляет собой полиморфизм типа вставка/отсутствие вставки в положении +3020 кодирующей области гена. Аллель со вставкой обозначают ins, аллель без вставки – “норма” – N.

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера G(+2722)C гена *CARD15* в группе больных БА было таким же, как в контрольной группе. Генотип CC не встречался ни в одной из групп. Частота аллеля C в обеих группах составила 1%, что согласуется с частотами в других популяциях (табл. 3), а гетерозиготного генотипа CT – 2.1–2.6%. Различия в частотах генотипов и аллелей маркера G(+2722)C в этих группах статистически незначимые, что свидетельствует об отсутствии ассоциации маркера с развитием атопической БА. Также не установлено ассоциации данного маркера с тяжестью течения БА (табл. 5).

В обеих группах отмечено преобладание аллеля N и генотипа N/N полиморфного маркера 3020insC гена *CARD15*. Гомозиготный генотип ins/ins не обна-

ружен ни в контрольной группе, ни в группе больных БА. Частота минорного аллеля ins составляет 3–5%, как и в европеоидных популяциях (табл. 3). Не выявлено статистически значимых различий в распределении аллелей и генотипов полиморфного маркера 3020insC в этих группах, что свидетельствует об отсутствии прямой ассоциации с развитием атопической БА. Также не найдено ассоциации этого маркера с тяжестью БА (табл. 5).

С целью оценки комбинированного вклада маркеров G(+2722)C и 3020insC гена *CARD15* в патогенез БА мы проанализировали встречаемость гаплотипов в группе больных атопической БА и в группе здоровых доноров (контроль). Наиболее часто в обеих группах встречался гаплотип дикого типа – G-N. Гаплотип C-ins не обнаружен ни в одной группе. Можно отметить повышение частоты гаплотипа G-N и уменьшение частоты гаплотипа G-ins среди больных БА по сравнению со здоровыми индивидами. Однако такие различия не являются статистически значимыми, что свидетельствует об отсутствии ассоциации гаплотипов G(+2722) и 3020insC гена *CARD15* с развитием атопической БА. Не установлено также ассоциации данных гаплотипов с тяжестью течения заболевания (табл. 6).

К настоящему времени известна только одна работа, в которой изучали ассоциацию маркеров G(+2722)C и 3020insC гена *CARD15* с БА [7]. Согласно [7], маркер G(+2722)C ассоциирован с развитием аллергического ринита и аллергического дерматита, а маркер 3020insC – с атопией, однако ассоциация данных маркеров с БА не выявлена. Полученные нами данные также не позволяют говорить о существо-

Таблица 6. Частоты встречаемости гаплотипов (G(+2722)C и 3020insC) гена *CARD15* в группе больных атопической бронхиальной астмой и в контрольной группе

Гаплотип	Частота встречаемости гаплотипов		<i>p</i>	Частота встречаемости гаплотипов		<i>p</i>
	астма общая (<i>n</i> = 283)	контроль (<i>n</i> = 227)		астма легкой степени (<i>n</i> = 131)	астма средней и тяжелой степени (<i>n</i> = 152)	
G-N	0.964	0.942	0.285	0.965	0.962	1
G-ins	0.024	0.046	0.321	0.015	0.033	0.456
C-N	0.012	0.012	1	0.020	0.005	0.339
C-ins	0	0	1	0	0	1

вании ассоциации между маркерами G(+2722)C и 3020insC гена *CARD15* и развитием атопической БА. Поэтому можно предположить, что полиморфные маркеры G(+2722)C и 3020insC гена *CARD15* не влияют на кинетику связывания рецепторного домена с ЛПС, стабильность данного комплекса и последующую передачу сигнала.

Работа выполнена при поддержке программы “Протеомика для медицины и биотехнологии” Российской академии медицинских наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Martinez F.D. 2001. Maturation of a hypothesis. *Mediators Inflamm.* **10**(6), 306–307.
- Weiss S.T. 2002. Eat dirt—the hygiene hypothesis and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.* **347**(12), 930–931.
- Yamada R., Yamamoto K. 2005. Recent findings on genes associated with inflammatory disease. *Mutat. Res.* **573**(1–2), 136–151.
- Strachan D.P. 2000. Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax.* **55**, 2–10.
- Koppelman G.H., Reijmerink N.E., Colin Stine O., et al. 2001. Association of a promoter polymorphism of the *CD14* gene and atopy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**(4), 965–969.
- Arbour N.C., Lorenz E., Schutte B.C., et al. 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat. Genet.* **25**(2), 187–191.
- Kabesch M., Peters W., Carr D., et al. 2003. Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**(4), 813–817.
- Фрейдин М.Б., Пузырев В.П., Огородова Л.М. и др. 2002. Полиморфизм генов интерлейкинов и их рецепторов: популяционная распространенность и связь с атопической бронхиальной астмой. *Генетика.* **38**(12), 1710–1718.
- Пузырев В.П., Фрейдин М.Б., Огородова Л.М., Кобякова О.С. 2002. Взаимосвязь полиморфных вариантов генов интерлейкинов и их рецепторов с атопической бронхиальной астмой. *Мед. генетика.* **1**(2), 86–92.
- Дмитриева-Здорова Е.В., Воронько О.Е., Аксенова М.Г., Бодоев Н.В. 2010. Ассоциация полиморфных маркеров гена интерлейкина-13 с атопической бронхиальной астмой. *Генетика.* **46**(1), 111–117.
- Ляхович В.В., Вавилин В.А., Макарова С.И. и др. 2000. Роль ферментов биотрансформации ксенобиотиков в предрасположенности к бронхиальной астме и формировании особенностей ее клинического фенотипа. *Вестн. РАМН.* **12**, 36–41.
- Ивашенко Т.Э., Сиделева О.Г., Петрова М.А. и др. 2001. Генетические факторы предрасположенности к бронхиальной астме. *Генетика.* **37**(1), 107–111.
- Вавилин В.А., Макарова С.И., Ляхович В.В., Гавалов С.М. 2002. Ассоциация полиморфных ферментов биотрансформации ксенобиотиков с предрасположенностью к бронхиальной астме у детей с наследственной отягощенностью и без таковой. *Генетика.* **38**(4), 539–545.
- Федорова Ю.Ю., Гра О.А., Карунас А.С. и др. 2009. Ассоциация полиморфных вариантов генов системы биотрансформации с атопическими заболеваниями у детей русской этнической принадлежности из республики Башкортостан. *Молекуляр. биология.* **43**(6), 1032–1039.
- Koshak E.A. 2007. Classification of asthma according to revised 2006 GINA: Evolution from severity to control. *Ann. Thorac. Med.* **2**, 45–46.
- Hutchon D.J.R. Calculator for confidence intervals for odds ratio unmatched case control study, <http://www.hutchon.net/ConfidOR.htm>.
- Rodriguez S., Gaunt T.R., Day I.N. 2009. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *Am. J. Epidemiol.* **169**(4), 505–514. <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.html>.
- Miggin S.M., O’Neill L.A. 2006. New insights into the regulation of TLR signaling. *J. Leukoc. Biol.* **80**(2), 220–226.
- Mollen K.P., Levy R.M., Prince J.M., et al. 2008. Systemic inflammation and end organ damage following trauma involves functional TLR4 signaling in both bone marrow-derived cells and parenchymal cells. *J. Leukoc. Biol.* **83**(1), 80–88.
- Kiechl S., Lorenz E., Reindl M., et al. 2002. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N. Engl. J. Med.* **347**(3), 185–192.

21. Fageras-Bottcher M., Hmani-Aifa M., Lindstrom A., et al. 2004. TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**(3), 561–567.
22. Sackesen C., Karaaslan C., Keskin O., et al. 2005. The effect of polymorphisms at the CD14 promoter and the *TLR4* gene on asthma phenotypes in Turkish children with asthma. *Allergy*. **60**(12), 1485–1492.
23. Liang X.H., Cheung W., Heng C.K., Wang D.Y. 2005. Absence of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in Singaporean Chinese. *Ther. Clin. Risk Manag.* **1**(3), 243–246.
24. Raby B.A., Klimecki W.T., Laprise C., et al. 2002. Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**(11), 1449–1456.
25. Noguchi E., Nishimura F., Fukai H., et al. 2004. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin. Exp. Allergy*. **34**(2), 177–183.
26. Eder W., von Mutius E. 2005. Genetics in asthma: the solution to a lasting conundrum? *Allergy*. **60**(12), 1482–1484.
27. Yang I.A., Barton S.J., Rorke S., et al. 2004. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. *Genes Immun.* **5**(1), 41–45.
28. Ogura Y., Bonen D.K., Inohara N., et al. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. **411**(6837), 603–606.
29. Rahman P., Bartlett S., Siannis F., et al. 2003. *CARD15*: a pleiotropic autoimmune gene that confers susceptibility to psoriatic arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* **73**(3), 677–681.
30. Weidinger S., Klopp N., Rummeler L., et al. 2005. Association of *CARD15* polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults. *Clin. Exp. Allergy*. **35**(7), 866–872.
31. Lorenz E., Mira J.P., Frees K.L., et al. 2002. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch. Intern. Med.* **162**, 1028–1032.
32. Werner M., Topp R., Wimmer K., et al. 2003. *TLR4* gene variants modify endotoxin effects on asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**, 323–330.
33. Michel O., LeVan T.D., Stern D., et al. 2003. Systemic responsiveness to LPS and polymorphisms in the toll-like receptor 4 gene in human beings. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**, 923–929.
34. Reindl M., Lutterotti A., Ingram J., et al. 2003. Mutations in the gene for toll-like receptor 4 and multiple sclerosis. *Tissue Antigens*. **61**, 85–88.
35. Smirnova I., Hamblin M.T., McBride C., et al. 2001. Excess of race acid polymorphisms in the toll-like receptor 4 in humans. *Genetics*. **158**, 1657–1664.
36. Okayama N., Fulimura K., Suehiro Y., et al. 2002. Simple genotype analysis of the Asp299Gly polymorphism the toll-like receptor 4 gene that is associated with lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *J. Clin. Lab. Anal.* **16**, 56–58.
37. Marsh S., McLeod H.L. 2003. Crohn's disease: ethnic variation in *CARD15* genotypes. *Gut*. **52**(5), 770.
38. Hugot J.P., Chamaillard M., Wouali H., et al. 2001. Association of NOD2 leucine repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. **411**, 599–603.
39. Cavanaugh J.A., Adams K.E., Quak E.J., et al. 2003. *CARD15/NOD2* risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. *Ann. Hum. Genet.* **67**(1), 35–41.
40. Zouiten-Mekki L., Zaouali H., Boubaker J., et al. 2005. *CARD15/NOD2* in a Tunisian population with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* **50**(1), 130–135.
41. Inoue N., Tamura K., Kinouchi Y., et al. 2002. Lack of common *NOD2* variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. **123**(1), 86–91.