

ИММУННЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

© 2018 г. Т. Б. Сенцова^{1,3}, И. В. Ворожко^{1*}, О. О. Черняк¹, В. А. Ревякина¹,
А. Г. Тимофеева¹, А. Е. Донников², В. А. Мухортных¹

*E-mail: bio455@inbox.ru

¹ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия;

²ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;

³ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

Поступила: 12.04.2017. Принята: 25.08.2018

Для изучения иммунного статуса у детей с аллергическими заболеваниями при различных вариантах полиморфизма витамина D (VDR) было обследовано 130 детей (66 мальчиков и 64 девочки) в возрасте от 1,5 до 16 лет. Выявлены достоверные различия распределения частот генотипов и аллелей у детей с аллергическими заболеваниями и в популяции. У больных детей достоверно повышена частота встречаемости аллеля A в сайте BsmI гена VDR (OR=1,81, P=0,04) и носительство гомозиготного A/A и гетерозиготного G/A генотипа (OR=2,03, P=0,05 и OR=1,8, P=0,05 соответственно). Исследование содержания IL-16, IL-17, BAFF, TGFβ1 и sCD134 в сыворотке крови у детей с аллергическими заболеваниями показало активацию различных иммунных факторов с провоспалительной активностью, а также T- и B- клеток при ингибции противовоспалительного маркера TGFβ1. Установлено снижение уровня TGFβ1 в сыворотке крови у детей – носителей гетерозиготных A/G маркёров FokI гена VDR.

Ключевые слова: ген рецептора витамина D, полиморфизм, аллергические болезни, иммунный статус, аллель

DOI: 10.31857/S102872210002374-6

Адрес: 105062, Москва, Подсосенский пер. д. 18/5 стр.1, кв.18.
Ворожко Илья Викторович.

Тел.: +79296017517 (моб.). E-mail: bio455@inbox.ru.

Авторы:

Сенцова Т. Б., д.м.н., профессор, заведующая лабораторией клинической биохимии, иммунологии и аллергологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия;

Ворожко И. В., к.м.н., с.н.с. лаборатории клинической биохимии, иммунологии и аллергологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия;

Черняк О. О., научный сотрудник лаборатории клинической биохимии, иммунологии и аллергологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия;

Ревякина В. А., д.м.н., профессор, заведующая отделением аллергологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия;

Тимофеева А. Г., аспирант ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» Москва, Россия;

Донников А. Е., врач клинической лабораторной диагностики лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;

Мухортных В. А., аспирант ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» Москва, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время общепризнан мультифакториальный характер развития аллергических болезней, при которых генетическая составляющая играет не только важную, но иногда и определяющую роль в реализации иммунных изменений [1, 2].

Выявление генетических маркёров предположенности к атопии, так называемых «генов-кандидатов», в основном, сводилось к исследованию генов иммунной системы, прежде всего

генов главного комплекса гистосовместимости, цитокинов, IgE, лейкотриенов, ростовых факторов и др. [3, 4]. Однако, в настоящее время в опубликованной литературе обсуждается гипотеза об участии синтропных генов в развитии аллергических болезней [5]. Согласно мнению авторов, синтропные гены ответственны за общие звенья патогенеза, хотя не исключается возможность одновременной инициации и регуляции иммунного ответа специфическими для аллергии генами. По сути, подтверждается полигенный характер предрасположенности к развитию аллергических заболеваний [6, 7]. В этой связи, большой интерес исследователей вызывает ген рецептора витамина D (VDR), который кодирует внутриклеточный рецептор, способный, в частности, связывать активные формы витамина D, опосредованно осуществляя иммунорегуляторные эффекты [8]. Поскольку рецептор витамина D широко представлен во многих клетках и тканях организма, то в последние годы были предприняты многочисленные попытки изучения ассоциации полиморфизма гена *VDR* с развитием артериальной гипертензии, ХОБЛ, туберкулёза лёгких, псориаза, раковых опухолей, сахарного диабета 2 типа, болезни Паркинсона, остеопороза и др. [9, 10, 11].

Кроме того, в работах последних лет было продемонстрировано, что VDR экспрессируется на клетках иммунной системы: моноцитах, макрофагах, активированных лимфоцитах, клетках тимуса и др. [12, 13]. Поэтому становится очевидным, что выявление особенностей функционирования иммунорегуляторных субстанций при различных аллелях гена *VDR* имеет не только большое теоретическое, но и практическое значение для прогноза выраженности аллергического воспаления.

Целью исследования явилось изучение иммунного статуса у детей с аллергическими заболеваниями при различных вариантах полиморфизма гена рецептора витамина D.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 130 детей (66 мальчиков и 64 девочек) с аллергическими заболеваниями в возрасте от 1,5 до 16 лет, находившихся на лечении в отделении аллергологии Клиники ФГБНУ «НИИ питания». Всем детям проводили общеклинические и аллергологические исследования. У 93 детей (71,5%) диагностировалась изолированная аллергопатология, в основном пищевая аллергия и атопический дерматит,

у 37 детей (28,4%) – сочетанная (бронхиальная астма, крапивница, аллергический ринит и др.). Группу контроля составил 41 практически здоровый ребенок в возрасте от 1 года до 10 лет, обратившийся в поликлинику с целью диспансерного осмотра.

Содержание IL-16, IL-17, TGFβ1, BAFF и sCD134 определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов фирмы «BCM Diagnostics», «Bender Medsystems (США) на спектрофотометре Tecan (Австрия).

Для выделения ДНК использовали набор «Проба-Рapid-Генетика» фирмы «ДНК-Технология» (Россия). Анализ полиморфных маркеров FokI (rs2228570), BsmI (rs 1544410) и TaqI (rs 731236) гена *VDR* проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени при использовании детектирующего амплификатора ДТ-96 и наборами для ДНК-диагностики фирмы «ДНК-технология» (Россия).

Статистическая обработка данных выполнена с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel», и пакета прикладных программ «Statistica for Windows» v. 6.0, Stat Soft Inc. (США). Различия в частотах аллелей или генотипов выявляли с помощью метода χ^2 , для вычисления которого прибегали к построению таблиц «2x2» и «2x3» соответственно.

Различия в концентрациях IL-16, IL-17, TGFβ1, BAFF и sCD134 между группами в зависимости от полиморфных вариантов гена *VDR* оценивали с помощью теста Kruskal-Wallis и post-hoc теста Dunn при $\alpha=0,05$.

Исследование являлось открытым, проспективным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении частоты встречаемости генотипов FokI, BsmI, TaqI *VDR* у больных детей и в контрольной группе были получены следующие результаты (табл. 1). У больных детей достоверно повышена частота встречаемости аллеля А в сайте BsmI гена *VDR* (OR=1,81, P=0,04) и носительство гомозиготного А/А, гетерозиготного G/A его генотипа (OR=2,03, P=0,05 и OR=1,8, P=0,05 соответственно), что даёт возможность рассматривать его в качестве прогностического маркера ассоциированного с риском развития аллергического заболевания. Как свидетельствуют клинические наблюдения, эту группу составили, в основном, дети с пищевой аллергией. При анализе частоты встречаемости по-

Таблица 1. Распределение частот аллелей и генотипов гена *VDR* у детей с аллергическими заболеваниями и в контрольной группе

Аллели, генотипы	Частоты аллелей и генотипов		OR [95% CI]	p
	Дети с аллергическими заболеваниями (n=130)	Контрольная группа (n=41)		
<i>FokI (rs2228570) A>G</i>				
Аллель А	0,460	0,378	1,40 [0,82–2,39]	0,22
Аллель G	0,540	0,622	0,71 [0,42–1,22]	0,22
Генотип А/А	0,241	0,122	2,29 [0,8–6,59]	0,29
Генотип G/A	0,437	0,512	0,74 [0,35–1,56]	0,29
Генотип G/G	0,322	0,366	0,82 [0,38–1,78]	0,29
<i>BsmI (rs1544410) A>G</i>				
Аллель А	0,443	0,305	1,1 [1,04–3,16]	0,04
Аллель G	0,557	0,695	0,55 [0,32–0,96]	0,04
Генотип А/А	0,138	0,073	2,03 [0,54–7,62]	0,05
Генотип G/A	0,609	0,463	1,80 [0,85–3,82]	0,05
Генотип G/G	0,253	0,463	0,39 [0,18–0,86]	0,05
<i>TaqI (rs731236) T>C</i>				
Аллель Т	0,569	0,451	1,61 [0,95–2,72]	0,08
Аллель С	0,431	0,549	0,62 [0,37–1,06]	0,08
Генотип Т/Т	0,276	0,220	1,35 [0,56–3,25]	0,06
Генотип С/Т	0,576	0,463	1,64 [0,78–3,46]	0,06
Генотип С/С	0,138	0,317	0,34 [0,14–0,84]	0,06

Таблица 2. Содержание IL-16, IL-17AF, TGFβ1, sCD134 и BAFF (пг/мл) в сыворотке крови у детей с аллергическими заболеваниями

Группы	IL-16	IL-17AF	TGFβ1	sCD134	BAFF
1. Дети с аллергическими заболеваниями (n=130)	1556,5 ± 163,8	2483,7 ± 235,6	872,3 ± 81,4	123,8 ± 10,1	120,3 ± 11,0
2. Здоровые дети (n=41)	112,5 ± 1,6	103,5 ± 1,8	6723 ± 51,3	11,4 ± 0,1	0,4 ± 0,01
P ₁₋₂	< 0,05				

лиморфного варианта *FokI* гена *VDR* у детей с аллергическими заболеваниями и у здоровых детей не выявлено различий, как в отношении распределения аллелей, так и в отношении распределения генотипов ($P=0,22$, $P=0,29$). Аналогичные результаты были получены при исследовании полиморфного сайта *TaqI* гена *VDR* ($P=0,08$, $P=0,06$). Результаты статистического

анализа продемонстрировали, что наиболее информативным маркером наследования у детей с аллергическими заболеваниями является аллель А против аллеля G в сайте *BsmI* гена *VDR*. Обращает на себя внимание тот факт, что у здоровых детей чаще обнаруживалось носительство мутантного гомозиготного генотипа G/G полиморфного сайта *BsmI* гена *VDR* (OR=0,39,

$P=0,05$) и аллеля G ($OR=0,55$, $P=0,04$) чем у больных детей. Можно предположить, что носительство данного генотипа является протективным в отношении развития аллергических заболеваний.

Иммунный статус у детей с аллергическими заболеваниями изучался на основании определения содержания IL-16, IL-17, BAFF, TGF β 1 и sCD134 в сыворотке крови. Как показало проведенное исследование (табл. 2), у детей с аллергическими болезнями отмечалось статистически достоверное ($P<0,05$) повышение уровней IL-16 и IL-17 в по сравнению с контрольной группой. Увеличение синтеза IL-16

и IL-17, обладающих провоспалительной активностью, по-видимому, явилось результатом активации Т-хелперов, апоптоза, хемокинов и других иммунологических факторов, участвующих в процессах аллергического воспаления. Подтверждением этого положения можно считать констатацию факта увеличение синтеза активированных Т- и В-клеток при исследовании содержания BAFF и sCD134: у детей с аллергическими заболеваниями значения этих показателей статистически значимо различались ($P<0,05$) с данными контрольной группы. Изучение содержания TGF β 1-ростового фактора с противовоспалительной активностью показало

Таблица 3. Концентрации IL-16, TGF β 1, BAFF, sCD134 и IL-17AF (пг/мл) в сыворотке крови у детей с аллергическими заболеваниями при различных полиморфных вариантах гена *VDR*

Исследуемый показатель	тест Kruskal-Wallis (медиана, (q1; q2))			p	post-hoc тест Dunn $\alpha=0,05$		
	FokI (rs2228570) A>G						
	гомозигота A/A	гетерозигота A/G	гомозигота G/G		A/A vs A/G	A/A vs G/G	A/G vs G/G
IL-16	1070 (1598;2517)	160,7 (1366;1980)	551 (1152;2658)	0,76	-	-	-
TGF β 1	1134 (896,6;1705)	610,8 (511,7;919,8)	838,4 (734,2;901,2)	0,02	*	-	-
BAFF	0 (0;0)	12,06 (0;281,5)	104 (0;337)	0,09	-	-	-
sCD134	1,19 (0;213,9)	3,28 (0;6,33)	8,99 (6,1;375,4)	0,08	-	-	-
IL-17AF	492 (0;1953)	333,6 (0;1393)	238,3 (1043;9678)	0,50	-	-	-
	BsmI (rs1544410) A>G						
	гомозигота A/A	гетерозигота A/G	гомозигота G/G		A/A vs A/G	A/A vs G/G	A/G vs G/G
IL-16	968,3 (0;2693)	1617 (409,5;2032)	1382 (1189;2213)	0,72	-	-	-
TGF β 1	607,8 (482,7;840,6)	881,4 (585,2;1045)	791,8 (597,6;1135)	0,29	-	-	-
BAFF	0 (0;120,5)	24,11 (0;288,1)	0 (0;169,6)	0,50	-	-	-
sCD134	3,43 (0;7,78)	4,42 (0;11,48)	3,13 (1,755;7,74)	0,98	-	-	-
IL-17AF	382,8 (0;1444)	997 (53,97;3713)	55,92 (0;1099)	0,34	-	-	-
	TaqI (rs731236) T>C						
	гомозигота C/C	гетерозигота C/T	гомозигота T/T		C/C vs T/C	C/C vs T/T	C/T vs T/T
IL-16	968,3 (0;2693)	1617 (780,8;2021)	1382 (1103;2768)	0,71	-	-	-
TGF β 1	607,8 (482,7;840,6)	881,4 (689,6;1004)	791,8 (581,4;1336)	0,30	-	-	-
BAFF	0 (0;120,5)	24,11 (0;274,8)	0 (0;244,8)	0,66	-	-	-
sCD134	3,43 (0;7,78)	4,42 (0;9,47)	3,13 (0;4,42)	0,94	-	-	-
IL-17AF	382,8 (0;1444)	997 (115,6;2796)	55,92 (0;1241)	0,44	-	-	-

ло снижение его концентрации у детей с аллергическими заболеваниями по сравнению с контрольной группой ($P < 0,05$).

Таким образом, иммунный статус у детей с аллергическими заболеваниями характеризовался активацией различных факторов с провоспалительной направленностью действия, Т- и В-клеток и ингибцией противовоспалительного маркера TGF β 1.

При анализе показателей иммунного статуса у детей с аллергическими заболеваниями не было установлено статистически значимых их различий (табл. 3) при полиморфных вариантах TakI и BsmI гена VDR. Напротив, у носителей гетерозиготных A/G маркёров FokI отмечено статистически значимые различия в содержании TGF β 1 ($P = 0,02$) по сравнению с другими полиморфными сайтами гена VDR. В этой группе детей уровни TGF β 1 были сниженными.

Оценивая в целом полученные результаты, следует отметить, что изучение полиморфизма гена VDR даёт основание рассматривать его прогностическую значимость, как минимум в двух направлениях. С одной стороны, выявлена ассоциация полиморфного локуса BsmI и его аллеля А с риском развития аллергического заболевания, с другой – носительство гетерозиготного варианта сайта FokI гена VDR являлось маркёром выраженности иммунных изменений, определяющих аллергическое воспаление.

Таким образом, установленные закономерности позволяют использовать данные полиморфизма гена VDR с последующей характеристикой иммунного статуса для разработки персонализированных подходов к профилактике, фармако- и диетотерапии аллергических заболеваний у детей.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены достоверные различия распределения частот генотипов и аллелей VDR гена у детей с аллергическими заболеваниями и в популяции. У больных детей достоверно повышена частота встречаемости аллеля А в сайте BsmI гена VDR и носительство гомозиготного A/A и гетерозиготного G/A его генотипа.

2. Низкие концентрации TGF β 1 при генотипе FokI VDR определяют выраженность иммунных изменений у детей с аллергическими заболеваниями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Дедов И. И., Тюльпаков А. Н., Чехонин В. П., Ба-
клушев В. П., Арчаков А. Н., Мошковский С. А. Пер-
сонализированная медицина: современное со-
стояние и перспективы. Вестник РАМН, 2012, 12,
4–12. [Dedov I. I., Tyul'pakov A. I., Chekhonin V. P.,
Baklaushev V. P., Archakov A. I., Moshkovskii S. A. Per-
sonalized medicine: state-of-the-art and prospects.
Annals of the Russian academy of medical sciences
(Russia) 2012, 67, 4–12.]
2. Ortiz R. A., Barnes K. C. Genetics of allergic diseases.
Immunol Allergy Clin North Am. 2015, 35, 19–44.
3. Yucesoy B., Kashon V. L., Johnson V. J., Lummus Z. L.
Fluharty K., Gautrin D., Carter A., Boulet L. P. Genetic
variants in TNF α , TGF β 1, PTGS1 and PTGS2 genes
are associated with disocyanate-induced asthma. J Im-
munotoxicol 2015, 27, 1–8.
4. Фрейдин М. Б., Пузырёв В. П. Синтропные гены ал-
лергических заболеваний. Генетика 2010, 46, 255–
261. [Freidin M. B., Puzыrev V. P. Syntropic Genes of
Allergic Diseases. Russian J. of Genet. (Russia) 2010,
46, 255–261.]
5. Saccone D., Asani F., Bornman L. Regulation of the vi-
tamin D receptor gene by environment, genetics and
epigenetics. Gene 2015, 159–156.
6. Gruber B. M. The phenomenon of vitamin D. Postery Hig
Med Dosw, 2015, 69, 127–139.
7. Bunyavanich S., Schadt E. E. System biology of asthma
and allergic diseases: a multiscale approach. J Allergy
Clin Immunol 2015, 135, 31–42.
8. Barry E. L., Rees J. R., Peacock J. L., Mott L. A., Amos C. I.,
Bostick R. M., Burke C. A., Baron J. A. Genetic variants
in CYP2R1, CYP24A1, and VDR modify the efficacy of
vitamin D3 supplementation for increasing serum 25-
hydroxyvitamin D levels in a randomized controlled
trial. J Clin Endocrinol Metab 2014, 99, 133–137.
9. Gnagnarella P., Pasquali E., Serrano D., Raimondi S.,
Disalvatore D., Gandini S. Vitamin D polymorphism
and cancer risk: a comprehensive meta-analysis. Car-
cinogenesis 2014, 35, 1913–1919.
10. Taiouri L., Ovcaric M., Curtain R., Johnson M. P., Grif-
fiths L. R., Csurhes P., Pender M. P., Lea R. A. Variation
in the vitamin D receptor gene is associated with mul-
tiple sclerosis in Australian population. J Neurogenet
2005, 19, 25–38.
11. Liu Z., Liu L., Chen X., He W., Yu X. Association study of
vitamin D receptor gene polymorphisms with diabetic
microvascular complication: a meta-analysis. Gene
2014, 546, 6–10.
12. Wobke T. K., Sorg B. L., Steinhilber D. Vitamin D in in-
flammatory diseases. Front Physiol. 2014, 5, 244–256.
13. Миронова Ж. А. Молекулярно-генетические аспек-
ты терапевтической резистентности у больных
бронхиальной астмой. Автореф. дисс. докт. мед.
наук. Санкт-Петербург, 2012, 24. [Mironova Zh. A.
Molecular-genetic aspects of therapeutic resistance in
patients with bronchial asthma. Doct. Diss. St. – Petes-
burg (Russia) 2012, 24].

IMMUNE MANIFESTATIONS OF VITAMIN D RECEPTOR GENE POLYMORPHISM IN CHILDREN WITH ALLERGIC DISEASES

© 2018 T. B. Sentsova^{1,3}, I. V. Vorozhko^{1*}, O. O. Chernyak¹, V. A. Revyakina¹,
A. G. Timopheeva¹, A. E. Donnikov², V. A. Mukhortnyh¹

*E-mail: bio455@inbox.ru

¹Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia;

²Scientific Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia;

³Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Received: 12.04.2017. Accepted: 28.08.2018

To study the immune status in children with allergic diseases and different types of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism 130 children (66 boys and 64 girls) aged 1,5 to 16 years were examined. Significant differences in genotypes and alleles frequency distribution between children with allergic diseases and population were revealed. The frequency of allele A, homozygous A/A and heterozygous G/A genotypes in site BsmI were significantly increased in children with allergic diseases compare population (OR = 1,81, p = 0,04; OR = 2,03, p = 0,05 and OR = 1,8, P = 0,05 respectively). The investigation of IL-16, IL-17, BAFF, TGFβ1 and sCD134 levels in the sera of children with allergic diseases showed activation of various immune factors with pro- and anti-inflammatory activity, as well as T and B cells. A reduction in the level of TGFβ1 in serum in children – carriers of heterozygous A/G markers FokI VDR gene.

Key words: vitamin D receptor gene polymorphism, allergic diseases, immune status, allele

Authors:

Sentsova T. B., MD (Medicine), Professor, Head of Laboratory of Clinical Biochemistry, Immunology and Allergology, Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia;

Vorozhko I. V. ✉ PhD (Medicine), Leading Research Associate of Laboratory of Clinical Biochemistry, Immunology and Allergology, Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia; **E-mail:** bio455@inbox.ru;

Chernyak O. O., research fellow of Laboratory of Clinical Biochemistry, Immunology and Allergology, Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia;

Revyakina V. A., MD (Medicine), Professor, Head of Department of Allergology, Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia;

Timopheeva A. G., PhD student, Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia;

Donnikov A. E., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics of the Laboratory of Molecular Genetic Methods, Scientific Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia;

Mukhortnyh V. A., PhD student, Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia.