Этнические различия в распределении частот аллелей и генотипов по полиморфному маркёру rs1801275 гена IL-4R, ассоциированного с развитием лекарственной аллергии при применении β-лактамных антибиотиков

Грознова И.В.[1], Мирзаев К.Б.[2], Казаков Р.Е.[3], Гафуров Д.М.[4], Маммаев С.Н.[5], Сычёв Д.А.[6]

[1] — управление экспертизы лекарственных средств №1 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

[2] — кафедра клинической фармакологии и терапии, Российская медицинская академия последипломного образования, г. Москва

[3] — отдел персонализированной медицины и клинической фармакогенетики Центра клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

[4] — ГБУ РД «Лакская центральная районная больница», республика Дагестан

[5] — кафедра госпитальной терапии, Дагестанская государственная медицинская академия, Махачкала

[6] — кафедра клинической фармакологии и терапии, Российская медицинская академия последипломного образования, г. Москва

Резюме. Цель исследования: определить частоты аллелей и генотипов по полиморфному маркёру rs1801275 гена IL-4Rα, ассоциированного с развитием лекарственной аллергии на β-лактамные антибиотики, в популяциях европеоидов Московского региона и Республики Дагестан. У всех участников исследования были определены генотипы по полиморфному маркёру rs1801275 гена IL-4Rα методом аллель-специфической ПЦР (полимеразная цепная реакция) после предварительного выделения ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) из лейкоцитов цельной крови. В результате проведённого исследования определены частоты аллелей и генотипов по полиморфному маркёру rs1801275 гена IL-4Rα в популяциях европеоидов Московского региона (A — 0,668, G — 0,332; A/A — 0,394, A/G — 0,548, G/G — 0,058) и Республики Дагестан (A — 0,5375, G — 0,4625; A/A — 0,15, A/G — 0,775, G/G — 0,075). Показано, что такой фактор как этническая принадлежность, может влиять на распределение аллелей и генотипов по полиморфному маркёру rs1801275 гена IL-4Rα, а, следовательно, и генетически детерминированную предрасположенность к развитию лекарственной аллергии при применении β-лактамных антибиотиков.

Ключевые слова: полиморфный маркер rs1801275 гена IL-4Rα, этническая группа, аллель-специфическая ПЦР, частоты аллелей и генотипов

Ethnic differences in the distribution of allele and genotype frequencies for polymorphic markers rs1801275 gene IL-4R, associated with the development of drug allergy in the application of β-lactam antibiotics

Groznova I.V.[1], Mirzaev K.B.[2], Kazakov R.E.[3], Gafurov D.M.[4], Mammayev S.N.[5], Sychev D.A.[6]

[1] — Office of Drug Expertise Center №1 expertise and control of finished drugs FGBU «Scientific Centre of Medical Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

[2] — Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow

[3] — Department of personalized medicine and clinical pharmacogenetics Center for Clinical Pharmacology FGBU «Scientific Centre of Medical Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

[4] — SBD RD «Lak central regional hospital», the Republic of Dagestan

[5] — Department of Hospital Therapy, Dagestan State Medical Academy, Makhachkala

[6] — Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow

Abstract. Objective: to determine the frequency of alleles and genotypes of polymorphic markers rs1801275 gene IL-4Rα, associated with the development of drug allergy β-lactam antibiotics in europeoids populations in Moscow region and the Republic of Dagestan. All study participants were identified genotypes at polymorphic markers rs1801275 gene IL-4Rα by allele-specific PCR (polymerase chain reaction) after prior isolation of DNA (deoxyribonucleic acid) from whole blood leukocytes. As a result of the study determined the frequencies of alleles and genotypes of polymorphic markers rs1801275 gene IL-4Rα in europeoids populations of Moscow region (A — 0,668, G — 0,332; A / A — 0.394, A / G — 0,548, G / G — 0,058) and Republic of Dagestan (A — 0,5375, G — 0,4625; A / A — 0.15 A / G — 0,775, G / G — 0,075). It is shown that such factors as ethnicity may influence the distribution of alleles and genotypes of polymorphic markers rs1801275 gene IL-4Rα, and, consequently, the genetically determined predisposition to the development of drug allergy in the application of β-lactam antibiotics.

Keywords: polymorphic marker rs1801275 gene IL-4Rα, ethnic group, allele-specific PCR, frequency of alleles and genotypes

Автор, ответственный за переписку:

Грознова Ирина Евгеньевна — эксперт 1 категории Управления экспертизы лекарственных средств №1 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); 123060, г. Москва, Первый Волоколамский проезд, дом 10; тел. +7 (926) 423-97-45; e-mail: groznova_ira@mail.ru

Введение

При проведении фармакогенетических исследований необходимо учитывать неравномерное распределение аллельных вариантов генов-кандидатов в разных этнических группах: аллель, редко встречающийся у одних народов, может оказаться распространённым у других [1]. Изучение распространённости полиморфизма в различных этнических группах целесообразно для оценки возможности проведения генотипирования для прогнозирования возникновения нежелательных реакций при применении тех или иных лекарственных средств. Кроме того, ассоциация полиморфного маркера с развитием нежелательных реакций может различаться между этносами.

В настоящее время наибольше количество исследований по поиску генетических предикторов лекарственной аллергии на β-лактамные антибиотики посвящены полиморфному маркеру rs1801275 гена IL-4Rα (оценивались ассоциации с развитием гиперчувствительности немедленного типа при применении β-лактамных антибиотиков), но результаты, полученные разными авторами, не всегда однозначны [2-5].

Одной из причин неоднозначности результатов ассоциативных исследований являются этногенетические различия в распределении аллельных вариантов исследуемых генов [2].

Например, в исследовании, проведённом *Zhang W. и др.*, продемонстрировано, что ассоциация полиморфизмов гена IL-4Rα, в том числе полиморфизма rs1801275, с бронхиальной астмой различается между этническими группами. В исследовании принимали участие китайцы, малайцы и представители индийской популяции. Частота полиморфизма значительно варьировалась среди этнических групп [6].

Таким образом, необходимо накопление сведений о частотах аллелей и генотипов по полиморфному маркёру rs1801275 гена IL-4Rα в различных этнических группах для прогнозирования возможности развития нежелательных реакций и для определения целесообразности проведения генотипирования для прогнозирования развития лекарственной аллергии при применении β-лактамных антибиотиков особенно в многонациональных государствах таких как Российская Федерация.

Цель исследования

Целью исследования являлось определение частоты аллелей и генотипов по полиморфному маркёру rs1801275 гена IL-4Rα в популяциях европеоидов Московского региона и Республики Дагестан.

Методы

Для проведения исследования были сформированы популяция европеоидов Московского региона и популяция европеоидов Республики Дагестан. В популяцию европеоидов Московского региона было включено 137 здоровых добровольцев обоего пола. В популяцию европеоидов Республики Дагестан было включено 40 здоровых добровольцев обоего пола (представители трёх этнических групп коренного населения Республики Дагестан: аварцы, даргинцы, лакцы). Т.е. исследование проводилось в различных этнических группах, чтобы выявить, влияет ли этническая принадлежность на распределение генотипов.

Все участники подписали Информированное согласие на участие в исследовании.

У всех участников исследования была проведена идентификация генотипов по полиморфному маркеру rs1801275 гена IL-4Rα методом аллель-специфической ПЦР. Метод аллель-специфической ПЦР основан на неспособности Taq-полимеразы инициировать синтез ДНК на праймерах, 3'-концевой нуклеотид которых некомплементарен матричной ДНК [7].

ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови с помощью коммерческого набора реактивов Genomic

DNA purification Kit №K0512, производства фирмы «Fermentas», Литва, в соответствии с инструкцией, вложенной в набор.

В исследовании для проведения ПЦР применялся амплификатор модели «Mastercycler» («Eppendorf AG», Германия).

ПЦР программа состояла из 30 циклов. Каждый цикл состоял из трёх стадий: денатурации, отжига и элонгации (синтеза). Предварительно была стадия инактивирования антитела, удерживающего полимеразу (при 95˚С, в течение 2 мин). Денатурация геномной ДНК проводилась в течение 20 сек. при 95˚С; отжиг праймеров — 20 сек. при 67˚С; элонгация ДНК — 20 сек. при 72˚С.

Праймеры для амплификации исследованного локуса были подобраны с помощью программы Vector NTI advance 10 («Invitrogen», США) в соответствии с требованиями метода (табл. 1). Их специфичность была проверена с помощью находящейся в свободном доступе программы primer BLAST (NCBI — National Center for Biotechnology Information (Национальный центр биотехнологической информации)).

Таблица 1

Праймеры для амплификации исследованного локуса

Последовательность праймеров	Размер амплифицируемого фрагмента
IL-4Rα-F-A — 5' — CCCCACCAGTGGCTATCA — 3'	266 пар нуклеотидов
IL-4Rα-F-G — 5' — CCCCACCAGTGGCTATCG — 3'	
IL-4Rα-R — 5' — TGTCCAGTCCAAAGGTGA — 3'	

Химический синтез олигонуклеотидов, использованных в качестве праймеров для проведения аллель-специфической ПЦР, выполнен ЗАО «Синтол», Россия.

Детекцию продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле на основе 1% TAE с добавлением бромистого этидия. Фрагменты ДНК после амплификации наносили в лунки агарозного геля. Для визуализации продуктов амплификации гена IL-4Rα использовали 1,5% агарозный гель.

Бромистый этидий, необходимый для окрашивания молекул ДНК, добавляли в гель при его приготовлении (4,5 мкл 0,5 мкг/мл раствора бромистого этидия на 60 мл агарозного геля).

Визуализировали продукты амплификации на трансиллюминаторе ТСХ-15 М производства «Vilber Lourmat» (Франция) в ультрафиолетовом свете при длине волны 312 нм.

Размеры амплифицированных фрагментов определяли с помощью маркера 100bp + 50bp DNA Ladder («Сибэнзим», Россия).

Для построения таблиц, диаграмм и статистической обработки данных были использованы приложения для персонального компьютера: Microsoft Excel 2010; Microsoft Word 2010.

Для сравнения частот генотипов по исследуемому полиморфному локусу в популяциях европеоидов Московского региона и Республики Дагестан мы использовали критерий χ^2.

Нулевая гипотеза (H0) — частоты генотипов распределены равновероятно между исследуемыми группами. Альтернативная гипотеза (H1) — существуют различия в распределении генотипов между исследуемыми группами. При $P \geq 0{,}05$ различия считали статистически незначимыми. Статистически значимыми считали различия при $P<0{,}05$. Расчёт значения χ^2 проводился по следующей формуле:

$$\chi 2 = \sum[(O-E)2/E],$$

где O — *наблюдаемое число в клетке таблицы сопряжённости;*

E — *ожидаемое число в той же клетке* [8].

Результаты

Исследуемые популяции были прогенотипированы по полиморфному маркеру rs1801275 гена IL-4Rα. В результате были получены распределения генотипов участников исследования (табл. 2), статистически значимо не различающиеся от ожидаемых в соответствии с уравнением Харди-Вайнберга.

Таблица 2

Распределение генотипов по полиморфному маркёру rs1801275 гена IL-4Rα в различных этнических группах

Генотип	Популяция европеоидов Московского региона (n= 137)	Популяция европеоидов Республики Дагестан (n= 40)
A/A	54	6
A/G	75	31
G/G	8	3

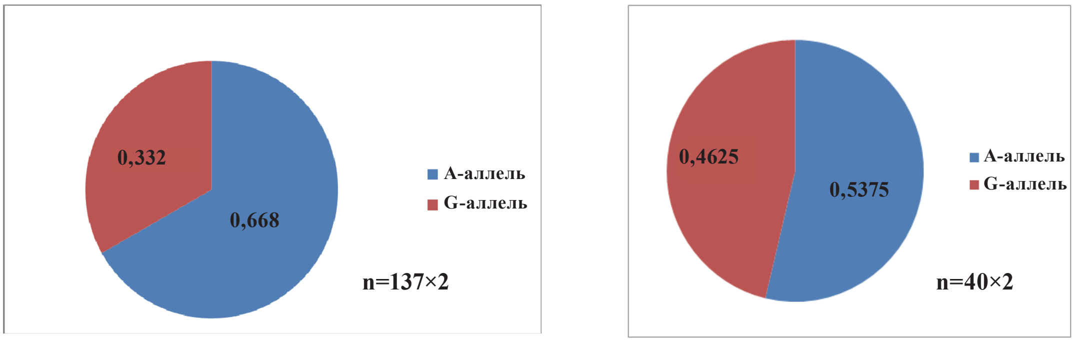
Определены частоты генотипов по полиморфному маркеру rs1801275 гена IL-4Rα: в популяции европеоидов Московского региона: A/A — 0,394; A/G — 0,548; G/G — 0,058; в популяции европеоидов Республики Дагестан: A/A — 0,15; A/G — 0,775; G/G — 0,075.

Результаты определения частот аллелей по полиморфному маркеру rs1801275 гена IL-4Rα в различных этнических группах представлены на рис. 1.

Исследована статистическая значимость различий по частотам распределения генотипов по полиморфному маркеру rs1801275 гена IL-4Rα в популяциях европеоидов Московского региона и Республики Дагестан.

При статистической обработке результатов мы использовали критерий χ^2, так как в данном случае (число строк в таблице сопряжённости больше двух) все ожидаемые числа не меньше 1 и доля клеток с ожидаемыми числами меньше 5 не превышает 20% [8].

Рассчитанное фактическое значение $\chi^2 = 8{,}26$; $df = 2$. Рассчитанное фактическое значение больше табличного и $P = 0{,}02$ меньше уровня значимости 0,05. Полученные данные позволили отклонить нулевую гипотезу о том, что частоты генотипов распределены равновероятно



Популяция европеоидов Московского региона   Популяция европеоидов Республики Дагестан

Рис. 1. Частоты аллелей по полиморфному маркеру rs1801275 гена IL-4Rα в популяции

между группами, и принять альтернативную о существовании различий в распределении генотипов между исследуемыми группами. Т.е. такой фактор, как этническая принадлежность, может влиять на распределение генотипов.

Таким образом, определены частоты аллелей и генотипов по полиморфному маркеру rs1801275 гена IL-4Rα в популяциях европеоидов Московского региона и Республики Дагестан. Показано, что существуют статистически значимые различия в распределении генотипов между исследуемыми группами (P<0,05). Полученные данные свидетельствуют о том, что такой фактор, как этническая принадлежность, может влиять на распределение генотипов, следовательно, и генетически детерминированную предрасположенность к развитию лекарственной аллергии при применении β-лактамных антибиотиков.

Обсуждение

Сравнивая полученные нами данные с результатами исследований, проведённых в России и за рубежом, можно сделать вывод, что частоты аллелей и генотипов варьируются среди этнических групп.

Например, в исследовании *Кучера А.Н. и др.* приведены сведения об изменчивости в том числе полиморфизма гена IL-4Rα (rs1801275) у представителей четырёх этнических групп Сибири (бурят, тувинцев, якутов и пришлого русского населения). Буряты, тувинцы и якуты относились к монголоидной расе, русские являлись европеоидами. В каждой этнической группе были обследованы 96 человек.

Во всех изученных этнических группах по полиморфному маркеру rs1801275 гена IL-4Rα преобладал аллель A. Минимальная частота аллеля A показана для якутов, максимальная — для русских и только для данной пары сравнения показаны статистически значимые различия по частотам аллельных вариантов [2]. В проведённом нами исследовании также преобладал аллель A.

Согласно данными NCBI для европеоидов частота аллеля A по полиморфному маркеру rs1801275 гена IL-4Rα находится в пределах 0,677 — 0,775 [2, 9]. Полученные нами значения частоты аллеля A по полиморфному маркеру rs1801275 гена IL-4Rα для изученных этнических групп выходят за границы оценок, приведённых для европеоидов в NCBI.

Несмотря на то, что сравниваемые нами группы принадлежат к одной расе (европеоиды), частоты генотипов по полиморфному маркеру rs1801275 гена IL-4Rα в них статистически значимо различаются. Поэтому следует учитывать полученные результаты при проведении исследований, направленных на изучение ассоциации полиморфизма гена IL-4Rα (rs1801275) с развитием нежелательных реакций при применении лекарственных препаратов в популяциях европеоидов Московского региона и Республики Дагестан.

Литература

1. *Игнатьев И.В.* Полиморфизм гена MDR1: популяционные и фармакогенетические аспекты [диссертация]. — М., 2007. — 108 с.
2. *Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Брагина Е.Ю., Ан А.Р., Рудко А.А., Фрейдин М.Б. и др.* Изменчивость полиморфных вариантов генов интерлейкинов и их рецепторов у представителей четырех этнических групп Сибирского региона. // Медицинская генетика. — 2009. — Т. 8. — № 10. — С. 43-52.
3. *Hershey G.K., Friedrich M.F., Esswein L.A., Thomas M.L., Chatila T.A.* The association of atopy with a gain-of-function mutation in the α subunit of the interleukin-4 receptor. N Engl J Med 1997 Dec 11;337(24):1720-5.
4. *Kruse S., Japha T., Tedner M., Sparholt S.H., Forster J., Kuehr J. et al.* The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. Immunology 1999 Mar;96(3):365-71.
5. *Qiao H.L., Yang J., Zhang Y.W.* Relationships between specific serum IgE, cytokines and polymorphisms in the IL-4, IL-4Rαlpha in patients with penicillins allergy. Allergy 2005 Aug;60(8):1053-9.
6. *Zhang W., Zhang X., Qiu D., Sandford A., Tan W.C.* IL-4 receptor genetic polymorphisms and asthma in Asian populations. Respir Med 2007 Jan;101(1):186-90.
7. *Патрушев Л.И.* Генная и белковая инженерия. — М.: Наука, 2004. — 214 с.
8. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. Пер. с анг. — М.: Практика, 1998. — 459 с.
9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov.