

11. Minsall E.M., Schleimer R., Cameron L. et al. Interleukin-5 Expression in the bone marrow of sensitized balb/c mice after allergen challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 158 (3): 951–957.
12. Сазонов А.Э., Петровский Ф.И., Иванчук И.И. и др. Экспрессия ИЛ-5 в мокроте больных бронхиальной астмой. *Бюл. exper. биол.* 2003; 135 (4): 437–440.
13. Menzies-Gow A., Flood-Page P., Sehmi R. et al. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy induces bone marrow eosinophil maturational arrest and decreases eosinophil progenitors in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111 (4): 714–719.
14. Hakonarson H., Maskeri N., Carter C., Grunstein M.M. Regulation of TH1- and TH2-type cytokine expression and action in atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 1077–1087.
15. Rizzo C.A., Yang R., Greenfeder S. et al. The IL-5 receptor on human bronchus selectively primes for hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109 (3): 404–409.
16. Salvi S., Semper A., Blomberg A. et al. Interleukin-5 production by human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1999; 20: 984–991.

Поступила 21.08.03

Оригинальные исследования

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

УДК 616.248-056.7-092

А.В.Дубаков¹, М.Б.Фрейдин², Ф.Ф.Тетенев¹, Л.М.Огородова¹, В.П.Пузырев²

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ IL-4 И IL-4RA С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ВЕНТИЛЯЦИОННОЙ ФУНКЦИИ ЛЕГКИХ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИМИ ПРИЗНАКАМИ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ В СЕМЬЯХ

¹ Сибирский государственный медицинский университет;

² НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, Томск

THE ASSOCIATION OF IL-4 AND IL-4RA GENES POLYMORPHISM WITH PULMONARY
VENTILATION FUNCTION AND PATHOGENIC SIGNS OF ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA

A.V.Dubakov, M.B.Freydin, F.F.Tetenev, L.M.Ogorodova, V.P.Puzyrev

Summary

An attempt was made to discover pathogenic links between gene polymorphism of interleukin-4 which is "the critical inflammatory cytokine", atopic features, respiratory function and bronchial hyperresponsiveness (BHR) in 70 families of atopic asthma patients.

Spirometry, methacholine challenge test ("MasterLab pro"), serum total IgE level, serum IL-4 level (by the ELISA method), skin prick tests ("Immuno Tek"), IL-4 (-589C/T, G/C 3'-utr) and IL-4RA (Ile50Val, Glu551Arg) genes polymorphism were investigated in 70 probands (11.6 ± 1.2 yrs) and 247 relatives (36.7 ± 1.2 yrs) from Tomsk region (Siberia). Significant associations of certain variants of polymorphous IL-4 and IL-4RA genes with bronchial airflow parameters (FEV₁), atopic features (increased IgE level), and bronchial asthma severity were found. Patients with persistent mild, moderate, and severe asthma had their proper variations of polymorphism. The methacholine challenge test was an objective marker of BHR in this study but any associations between BHR and IL-4 and IL-4RA polymorphous variants were not found.

Резюме

Осуществлена попытка выявления патогенетических связей между полиморфизмом генов "критического цитокина воспаления" — интерлейкина-4 (IL-4), проявлениями атопии, функцией внешнего дыхания и реактивностью бронхов в 70 семьях больных атопической бронхиальной астмой (БА). В результате комплексных клинических, аллергологических, иммунологических, генетических исследований найдены ассоциации определенных вариантов полиморфных генов IL-4 и его рецептора с показателями проходимости бронхов, атопией и степенью тяжести БА.

Сложность этиологии и патогенеза бронхиальной астмы (БА), (иммунологический и воспалительный компоненты, нейрогенный контроль), а также влияние модифицирующих факторов (наличие аллергенов в окружающей среде, возраст, климатические особенности и т. д.) делают правомерным отнесение БА к мультифакториальным заболеваниям.

Это обстоятельство весьма затрудняет генетический анализ. К настоящему времени изучено уже более 80 генов-кандидатов БА и атопии, и список этот постоянно пополняется. Несколько генов, вероятно, контролируют астму и атопию, а некоторые из них, очевидно, связаны с изменчивостью уровней цитокинов и активностью цитокиновых рецепторов [1–4].

Из генов-кандидатов БА и атопии внимание исследователей в большой степени привлечено к гену одного из регуляторных пептидов — интерлейкина-4 (IL-4). IL-4 часто называют "критическим цитокином воспаления" [3, 5]. Именно IL-4 на начальных стадиях развития воспаления, связываясь со своим рецептором на поверхности В-клеток, переключает их на производство IgE [6]. Еще одной функцией IL-4 является активация экспрессии высоко-аффинного рецептора к IgE на CD23+ В-клетках. IL-4 также индуцирует эндотелиальные клетки на производство молекул адгезии, что приводит к селективной аккумуляции эозинофилов в очаге воспаления. Наконец, IL-4 является сигналом дифференцировки CD4+ Т-клеток в хелперы типа 2, которые затем высвобождают дополнительное количество самого IL-4. Наконец, IL-4 выступает как фактор роста Т-клеток и мастоцитов [7, 8].

Несмотря на привлекательную роль IL-4 в качестве причинного фактора в развитии атопии, данные на этот счет достаточно противоречивы [3, 9–12].

Целью настоящего исследования была оценка ассоциации полиморфизма гена IL-4 (замены -589C/T и G/C 3'-UTR) и его рецептора IL-4RA (замены Ile50Val, Glu551Arg) с вентиляционной функцией легких больных БА и патогенетическими признаками заболевания (атопия, бронхиальная гиперреактивность — BHR).

Материал и методы

Исследования проведены на материале 70 семей больных atopической БА (всего 317 человек), жителей Томской области. В каждой семье выделялся пробанд с верифицированной БА. Таким образом, в основную группу вошли 70 пациентов с БА и 247 родственников, в т. ч. 153 мужчины (48 %) и 164 женщины (52 %). Средний возраст пробандов ($\pm m$) составил $11,6 \pm 1,2$ лет; родственников — $36,7 \pm 1,2$ лет. Распределение пациентов по степени тяжести БА, установленное по критериям GINA 2002, было следующее: легкая интермиттирующая БА — 18 человек (26 %), легкая персистирующая БА — 10 человек (14 %), БА средней степени тяже-

сти — 39 человек (56 %), тяжелая БА — 3 человека (4 %).

Оценку atopического статуса проводили по данным анамнеза, наличию atopических заболеваний, уровню общего IgE сыворотки крови и тестам кожных аллергических проб (КАП).

Изучение вентиляционной функции внешнего дыхания (ФВД) проведено на пульмонологическом комплексе Master Lab Pro "Erich Jaeger" по стандартной методике [13] с анализом показателей спирографии и кривой "поток-объем".

Исследование реактивности дыхательных путей выполнено посредством провокационного теста с метахолином при исходных значениях $ОФВ_1 \geq 75$ % от должных величин. Тест проведен дозовым методом при помощи небулайзера DeVilbiss. Результаты выражены как предельная концентрация метахолина, вызывающая падение $ОФВ_1$ на 20 % ($ПК_{20}$). $ПК_{20}$ вычисляли методом линейной интерполяции по стандартной формуле [13]. Клинически значимой считали $ПК_{20} \leq 8$ мг/мл, что расценивали как проявление гиперреактивности бронхов. Полученный бронхоспазм купировали ингаляциями β_2 -адреномиметика короткого действия (Сальбутамол 2–4 дозы), с последующей регистрацией через 2 мин маневра ФЖЕЛ для объективизации бронходилатирующего эффекта. За время исследований побочных эффектов и случаев некупируемого бронхоспазма отмечено не было.

Кожные прик-тесты с бытовыми, эпидермальными, растительными и грибковыми аллергенами были проведены в соответствии с методическими указаниями (наборы "Биомед", Москва, наборы "Immuno Tek", Испания). Степень выраженности сенсибилизации оценивалась по размерам папулы (+ — 2–3 мм, ++ — 4–5 мм, +++ — 6–10 мм, ++++ — более 10 мм).

Иммунологическое обследование было проведено на базе Центральной научной исследовательской лаборатории СибГМУ и включало в себя определение концентрации общего IgE в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа по рекомендациям производителей наборов ("Вектор-Бест", Новосибирск, "Cytelisa", США).

Генетические исследования проведены на базе ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН. Было предпринято типирование полиморфизмов -589C/T, G/C 3'-UTR гена IL-4 и Glu551Arg, Ile50Val гена его рецептора (IL-4RA) при помощи ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) ПЦР-продуктов.

Статистическая обработка результатов была проведена с помощью программы "Statistica 5.0 for Windows". Оценка наследуемости количественных признаков проведена с использованием коэффициента корреляции Пирсона. В некоторых случаях было использовано предварительное логарифмирование показателя для нормализации распределения. Анализ связи полиморфизмов генов IL-4, IL-4RA с БА проводили с помощью Transmission/Disequilibrium Test (TDT) [14].

Результаты и обсуждение

Результаты проведенного исследования функции внешнего дыхания у больных атопической БА показали: в отсутствие рестриктивных нарушений у всех членов семей отмечена статистически значимая разница в объемах легких между выделенными группами "не астма-не атопия"—"астма-атопия" ($p < 0,05$), "астма-не астма" ($p < 0,05$), что свидетельствовало о связи заболевания с изменением емкостных параметров, не выходящих за пределы возрастных норм. При этом влияния пола найдено не было: ФЖЕЛ у мужчин и женщин составляла $102,5 \pm 12,8 \%$ и $103,9 \pm 13,4 \%$ соответственно ($p > 0,05$). При разделении больных по степени тяжести на легкую интермиттирующую, легкую персистирующую, среднетяжелую и тяжелую БА также не отмечено статистически значимых различий уровней ФЖЕЛ, в среднем сохранявшихся в пределах возрастной нормы. Проходимость бронхиального дерева у разных клинических групп обнаружила следующие тенденции: значимые обструктивные изменения начинали развиваться только при средней степени тяжести БА, проявляясь вначале на уровне мелких дыхательных путей ($\text{МОС}_{75} — 58,6 \pm 33,1 \%$), усиливались при тяжелой БА, распространяясь по всему бронхиальному дереву ($\text{МОС}_{25} — 35,2 \%$, $\text{МОС}_{50} — 19,3 \%$, $\text{МОС}_{75} — 10,6 \%$) ($p < 0,01$). Вероятно, это явилось отражением нарастающих структурных изменений бронхиального дерева с нарушением их вентиляционной функции при утяжелении течения БА. В разные фазы заболевания проходимость дыхательных путей статистически значимо изменялась, что подтверждено данными положительной динамики всех показателей вентиляции бронхов в фазу терапевтически индуцированной ремиссии ($p < 0,05$). Возможно, это связано с медленным ремоделированием бронхиального дерева при адекватном лечении.

Прямой связи возраста со степенью тяжести БА обнаружено не было, однако линейный корреляционный анализ показал статистически значимую связь возраста с показателями функции внешнего дыхания (табл. 1).

Таблица 1
Возрастные зависимости показателей ФВД

Признак	Коэффициент корреляции	Коэффициент регрессии	Уровень значимости
ФЖЕЛ	0,242	0,1807	0,000
ОФВ ₁	-0,237	-0,2059	0,001
МОС ₂₅	-0,307	-0,4403	0,000
МОС ₅₀	-0,416	-0,6126	0,000
МОС ₇₅	-0,447	-0,7487	0,000

Для объемных величин (ФЖЕЛ) линейная корреляция была положительной, а для показателей бронхиальной проходимости — отрицательной (везде $p < 0,01$). Можно полагать, что, с одной стороны, заболевание не приводит с возрастом к значимым рестриктивным изменениям легочной ткани у пациентов с БА, а с другой — прогрессирующие изменения проходимости дыхательных путей у больных, в отличие от их родственников, не страдающих БА, значимо связаны с наличием атопического воспаления в бронхиальном дереве.

Повышенная реактивность бронхов являлась достоверным маркером БА, различаясь в группах больных и здоровых членов семей ($p < 0,01$). Реактивность дыхательных путей не была связана с формой БА ($p > 0,05$), но пороговая концентрация метахолина (ПК_{20}), необходимая для выявления преходящей обструкции, значительно возрастала в фазу ремиссии при любой тяжести астмы ($p < 0,001$), свидетельствуя о снижении степени реактивности бронхов, что показательно для мониторингирования БА и оценки эффективности лечения.

Исходя из ведущей роли IgE-зависимого механизма в развитии атопической БА, была проведена оценка распределения уровня IgE сыворотки крови в изучаемых семьях. По результатам исследований, во всей выборке была выявлена повышенная продукция сывороточного IgE более 100 МЕ/мл с высоким коэффициентом наследуемости (78,86 %). При этом средний уровень IgE у больных составил $361,0 \pm 38,2$ МЕ/мл, статистически значимо превысив этот показатель у родственников — $164,2 \pm 14,9$ МЕ/мл ($p < 0,001$). Уровень IgE у респондентов разного пола статистически не различался ($p > 0,05$), но коррелировал со степенью сенсибилизации по результатам кожных проб с растительными и бытовыми аллергенами, имея более

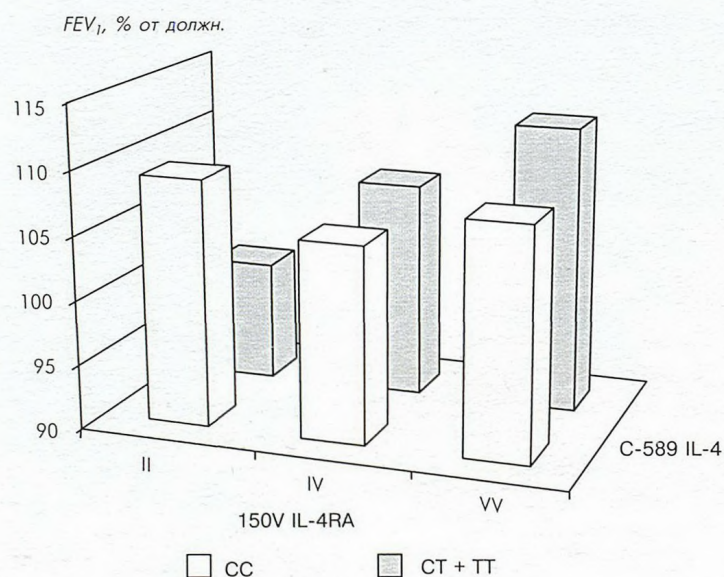


Рис. 1. Связь показателей ОФВ₁ и частот сочетаний полиморфизмов -589C/T (IL-4), 150V (IL-4RA)

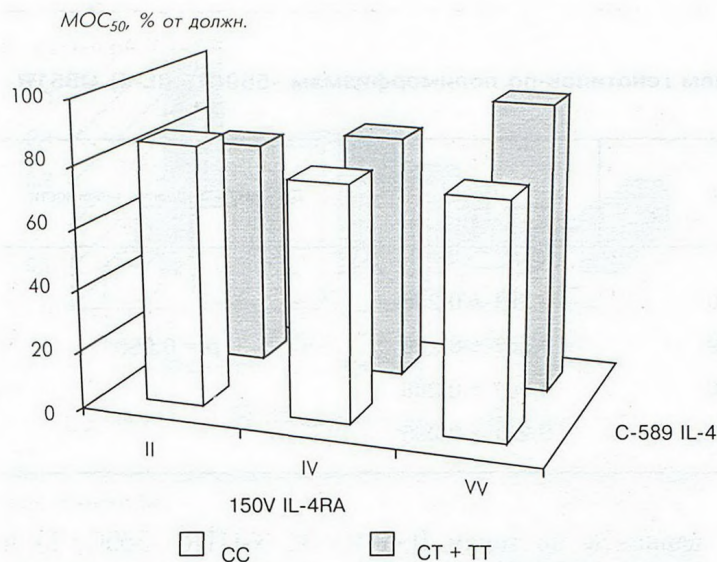


Рис. 2. Связь показателей MOC_{50} и частот сочетаний полиморфизмов -589C/T (IL-4), 150V (IL-4RA)

высокие значения при увеличении выраженности кожной реакции ($p < 0,05$).

Концентрация IgE в фазу ремиссии при любой степени тяжести БА имела тенденцию к снижению, по сравнению с обострением, но статистически значимого отличия обнаружено не было.

Исходя из цели настоящего исследования были рассмотрены ассоциации между полиморфными вариантами генов IL-4, IL-4RA, показателями ФВД, реактивностью бронхов (BHR), уровнем IgE и результатами КАП. Результаты однофакторного дисперсионного анализа не показали значимых различий между средними значениями показателей ФВД у носителей разных генотипов ($p > 0,05$ при всех сочетаниях), однако двухфакторный дисперсионный анализ выявил статистически значимый вклад комбинации полиморфных вариантов -589C/T и 150V в детерминацию изменчивости внешнего дыхания при БА. Были найдены значимые связи между определенными сочетаниями полиморфизмов -589C/T (IL-4), 150V (IL-4RA) и такими показателями вентиляции,

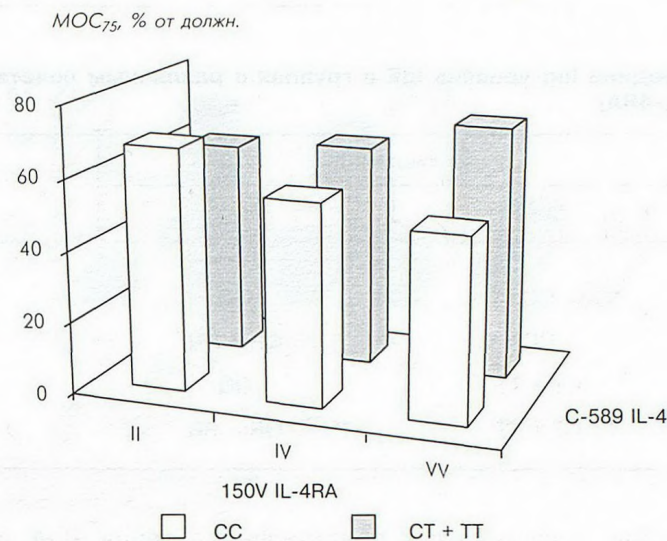


Рис. 3. Связь показателей MOC_{75} и частот сочетаний полиморфизмов -589C/T (IL-4), 150V (IL-4RA)

как ОФВ₁, MOC_{50} и MOC_{75} ($p < 0,05$) (рис. 1, 2, 3). Следует полагать, что выделенные сочетания аллелей IL-4 и IL-4RA могут определять изменчивость бронхиальной проходимости при БА. Так, респонденты с сочетанием полиморфизмов II — CT + TT имели значимо более низкую величину ОФВ₁, по сравнению с альтернативными вариантами, а при сочетании VV — CT + TT — значимо более высокую ($p < 0,05$). Показатели MOC_{50} были значимо больше при наборе VV — CT + TT, чем при наборе II — CT + TT, VV — CC, VV — CT + TT ($p < 0,05$). Величина MOC_{75} была значимо выше у носителей VV — CT + TT, чем при комбинации VV — CC ($p < 0,05$).

При рассмотрении связей между полиморфными вариантами этих же генов и гиперреактивностью бронхов, оценивавшейся по показателю $ПК_{20} \leq 8$ мг/мл, не было найдено сочетания генотипов, связанных с этим показателем ($p > 0,05$). Вероятно, кодировка BHR не связана с рассматривавшимися полиморфизмами.

Таблица 2

Средний log-уровень IgE в группах с различным сочетанием генотипов по полиморфизмам G/C 3'-UTR (IL-4) и Q551R (IL-4RA)

Генотипы		N	M ± m	Достигнутый уровень значимости
G717C	Q551R			
GC + CC	QQ	73	5,353 ± 0,295	p = 0,023
GC + CC	QR + RR	49	4,435 ± 0,287	
GG	QQ	67	4,435 ± 0,287	
GG	QR + RR	36	5,353 ± 0,295	

Таблица 3

Средний log-уровень IgE в группах с различным сочетанием генотипов по полиморфизмам -589C/T (IL-4) Q551R (IL-4RA)

Генотипы		N	M ± m	Достигнутый уровень значимости
C589T	Q551R			
CC	QQ	70	5,281 ± 0,295	p = 0,050
CC	QR + RR	39	4,507 ± 0,288	
CT + TT	QQ	70	4,507 ± 0,288	
CT + TT	QR + RR	46	5,281 ± 0,295	

При оценке связи полиморфизма генов IL-4 и IL-4RA с БА и ее патогенетическими признаками с помощью однофакторного дисперсионного анализа не выявлено статистически значимых ассоциаций. Была отмечена лишь тенденция к ассоциации между полиморфизмом Q551R и клиническим проявлением атопии ($p = 0,057$), без связи с ее маркерами (IgE, КАП, $p > 0,05$). При допущении наличия более сложных корреляционных взаимоотношений между признаками БА и полиморфизмом генов IL-4 и IL-4RA с помощью многофакторного дисперсионного анализа было проведено исследование соотношения всех возможных комбинаций выявленных полиморфизмов с фенотипическими признаками бронхиальной астмы (атопия, повышенный уровень IgE, гиперреактивность бронхов (ПК₂₀)), а также с тяжестью заболевания.

Показатели IgE и ПК₂₀ были предварительно прологарифмированы для нормализации распределений, с устранением зависимости от BHR и атопии, после чего было проведено сравнение средних величин в группах с разным сочетанием полиморфизмов.

По результатам анализа всех возможных комбинаций полиморфизмов -589C/T, G/C 3'-UTR (IL-4) и Q551, I50V(IL-4RA) были выявлены сочетания, статистически значимо связанные с уровнем IgE. Найдены

варианты по генам IL-4 (G/C 3'-UTR, -589C/T) и IL-4RA (Q551R), носители которых имели повышенные показатели IgE (табл. 2, 3).

В исследованиях корреляций между генетической изменчивостью IL-4, IL-4RA и проявлениями атопии по результатам кожных аллергологических проб, предполагая биномиальное распределение признака ("есть—нет"), был использован лог-регрессионный подход с оценкой статистики Уальда для дисперсионного анализа, где предикторные переменные — качественные признаки.

Было установлено, что частота полиморфизмов по маркерам Q551R и I50V (IL-4RA) значимо различалась у пациентов с атопией и без нее ($p = 0,018$) (табл. 4).

При исследовании ассоциаций между степенью тяжести БА и полиморфизмом генов IL-4 и IL-4RA было установлено, что степень тяжести БА связана с разными аллельными "ансамблями" генов IL-4 и IL-4RA. При каждой форме БА определялся доминирующий генотипический набор с отсутствием или малым количеством сочетаний генов, характерных для иного варианта БА. Так, при легкой БА доминировало сочетание IV (IL-4RA) и GC + CC (IL-4), при среднетяжелой — IV (IL-4RA) и GG (IL-4), при тяжелой — II (IL-4RA) и GC+CC (IL-4) ($p = 0,008$) (рис. 4).

Таблица 4

Частоты сочетаний генотипов по полиморфизмам I50V и Q551R (IL-4RA) у лиц с атопией и без нее

Сочетание генотипов	II QQ	II (QR + RR)	IV QQ	IV (QR + RR)	VV QQ	VV (QR + RR)
Отсутствие атопии (N = 99)	0,283	0,101	0,384	0,121	0,050	0,060
Атопия (N = 168)	0,173	0,125	0,298	0,184	0,131	0,089
Статистика Уальда				8,060		
df				2		
p				0,018		



Рис. 4. Частота сочетаний генотипов I50V и Q551(IL-4RA) при различной тяжести БА

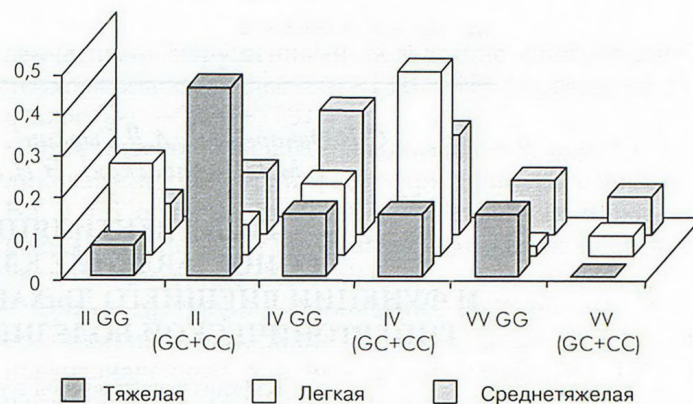


Рис. 5. Частота сочетаний генотипов G+717C (IL-4) и I50V (IL-4RA) при различной тяжести БА

Частоты сочетаний полиморфизмов IL-4RA (I50V и Q551R) также значительно различались при различных формах БА. При легкой БА преобладала комбинация IV QQ, при отсутствии VV (QR + RR), при среднетяжелой БА сочетание IV QQ также преобладало, а II (QR + RR) отмечено значительно реже. У пациентов с тяжелой БА доминировало сочетание II QQ и не найдено VV QQ, ($p = 0,031$) (рис. 5).

Таким образом, при анализе ассоциаций полиморфизмов IL-4 и IL-4RA с фенотипическими признаками БА (атопия, повышенный уровень IgE, BHR), вентиляционной функцией легких и тяжестью заболевания было обнаружено, что существуют определенные сочетания полиморфных IL-4 и IL-4RA, статистически значимо связанные с повышенным уровнем IgE ($p < 0,05$), атопией ($p < 0,05$) и функцией внешнего дыхания ($p < 0,05$), при отсутствии корреляций с уровнем реактивности бронхиального дерева ($p > 0,05$).

У пациентов с различной степенью тяжести БА были выделены доминирующие и различающиеся наборы полиморфизмов, связанные с формой БА ($p < 0,05$).

Вероятно, генетические факторы вносят определенный вклад в фенотипические проявления атопической БА. Использование генотипирования пациентов может дать новые знания относительно патогенеза и стратегии профилактики данного заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abramson M.J., Harapp S.B. The new asthma genetics and its implication for public health. Publ. Hlth Rep. 1998; 26: 127–144.

2. Demoly P. Respiratory allergic disease genes. Rev. Pneumol. Clin. 2003; 59: 67–75.
3. Freidin M., Kobayakova O., Puzyrev V. Association of polymorphisms in the human IL-4 and IL-5 genes with atopic bronchial asthma and severity of the disease. J. Comp. Funct. Genom. 2003; 4: 346–350.
4. LeSouef P. Genetics of asthma: what we need to know? Pediatr. Pulmonol. 1997; 15 (suppl.): 3–8.
5. Hershey G.K.K. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the α -subunit of the interleukin-4 receptor. N. Engl. J. Med. 1997; 337 (24): 1720–1725.
6. Fireman P. Understanding asthma pathophysiology. Allergy Asthma Proc. 2003; 24: 79–83.
7. Corry D.B., Kheradmand F. Biology and therapeutical potential of the interleukin-4/interleukin-13 signaling pathway in asthma. Am. J. Respir. Med. 2002; 1: 185–193.
8. Izuhara K., Arima K., Yasunaga S. IL-4 and IL-13: their pathological role in allergic diseases and their potential in developing new therapies. Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy 2002; 1: 263–269.
9. Kabesch M., Tzotcheva I., Carr D. et al. A complete screening of the IL-4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. J. Allergy Clin. Immunol. 2003; 112: 893–898.
10. Cui T., Wu J., Xie J. Polymorphisms in the IL-4 and IL-4R [alpha] genes and allergic asthma. Clin. Chem. Lab. Med. 2003; 41: 888–892.
11. Holgate S.T. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 1999; 104: 1139–1146.
12. Zhou Y., Fu J., Wu J., Li C. Cloning and polymorphism analysis of IL-4 proximal promoter of asthmatic children. Chin. Med. J. 2002; 115: 1624–1627.
13. Стандартизация легочных функциональных тестов. Пульмонология 1993; Прил. 1–92.
14. Spielman R.S., McGinnis R.E., Ewens W. J. TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. Am. J. Hum. Genet. 1993; 52: 506–516.

Поступила 05.05.04