

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК [616.248-06:616.155.35]-056.73

*Л.М.Огородова, В.П.Пузырев, О.С.Кобякова, Ю.А.Петровская, А.В.Дубаков,
Ф.И.Петровский, М.Б.Фрейдin, И.М.Кулманакова, Е.М.Камалтынова, О.А.Салюкова*

**ПОЛИМОРФИЗМ C-703T-ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-5
И МАРКЕРЫ ЭОЗИНОФИЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ
БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И ИХ РОДСТВЕННИКОВ**

Сибирский медицинский университет, Томск; НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН

POLYMORPHISM OF C-703T INTERLEUKIN-5 GENE AND EOSINOPHILIC INFLAMMATION
MARKERS IN BRONCHIAL ASTHMA PATIENTS AND THEIR RELATIVES

*L.M.Ogorodova, V.P.Puzyrev, O.S.Kobyakova, Yu.A.Petrovskaya, A.V.Dubakov, F.I.Petrovsky,
M.B.Freidin, I.M.Kulmanakova, E.M.Kamaltynova, O.A.Salyukova*

Summary

Markers of eosinophilic inflammation were studied in bronchial asthma patients and their relatives (bronchial hyperreactivity, eosinophils of nasal smear, total serum immunoglobulin E, interleukin-5). An association of C-703T interleukin-5 gene polymorphism and the disease was analysed. Results of our study showed a close relationship between eosinophils in nasal smear, total serum immunoglobulin E and bronchial hyperreactivity in mechanisms involved in asthma and atopy development. The statistically significant association of C-703T interleukin-5 gene polymorphism with asthma was shown.

Резюме

В выборке больных atopической бронхиальной астмой и членов их семей исследованы маркеры эозинофильного воспаления (бронхиальная гиперреактивность, эозинофилы в мазках-отпечатках со слизистой носа, общий иммуноглобулин E и интерлейкин-5 в сыворотке крови) и проведен анализ ассоциации полиморфизма C-703T-гена интерлейкина-5 с заболеванием. Показана взаимосвязь изученных маркеров эозинофильного воспаления в механизмах развития астмы и атопии. Установлена достоверная ассоциация полиморфизма C-703T-гена интерлейкина-5 с бронхиальной астмой.

Изучение наследственных основ мультифакториальных заболеваний — ведущее направление современной медицинской генетики. Бронхиальная астма (БА), механизм реализации которой определяется сложным взаимодействием медиаторов, клеток и факторов межклеточных взаимодействий (интерлейкинов), относится к группе именно таких заболеваний [2,3,5].

Современная концепция данного заболевания основывается на представлении о ключевой роли персистирующего воспаления бронхиального дерева, следствием которого являются типичные симптомы болезни — приступы экспираторного удушья, одышка, кашель [1]. Отличительной особенностью воспаления при БА является его эозинофильный характер. Биологически активные вещества, выделяемые эозинофилами, стимулируют сокращение гладкой мускулатуры бронхов, секрецию слизи, оказывают повреждающее действие на эпителий стенок дыхательных путей, вызывают дегрануляцию тучных клеток и базофилов и т.д. [11]. Иницируя позднюю фазу воспаления, эозинофилы приводят к развитию бронхиальной гиперреактивности (БГР).

Значительная роль эозинофильного воспаления в патогенезе БА привлекает внимание исследователей к доминирующему фактору дифференцировки и рекрутирования этих клеток — интерлейкину-5 (ИЛ-5). ИЛ-5 сам по себе относительно слабый хемоаттрактант, однако он эффективно и специфично направляет эозинофилы на расширение хемотактической чувствительности и пролонгирование их выживаемости в тканях-мишенях, блокируя апоптоз [4]. ИЛ-5 является ключевым медиатором в патогенезе заболеваний, характеризующихся эозинофильным воспалением.

Ген ИЛ-5 (IL5) расположен в кластере с генами других интерлейкинов на хромосоме 5q31.1. Обнаружено сцепление локуса 5q31.1 с atopической БА [6], аутомно-доминантной семейной эозинофилией [10], уровнем циркулирующих эозинофилов [7]. Известен ряд полиморфизмов гена IL5, однако ни для одного из них ассоциация с заболеваниями еще не была исследована [10]. Таким образом, изучение генетических основ детерминации уровня ИЛ-5 и анализ ассоциации кодирующего его гена с различными заболеваниями, имеющими выраженный воспалительный компонент, вероятно, дает дополнительную информацию о механизмах наследственной обусловленности мультифакториальной патологии человека.

В настоящем исследовании проведен анализ взаимосвязи признаков эозинофильного воспаления, а также представлены оценки наследуемости уровня общего ИЛ-5 и ассоциации полиморфизма C-703T-гена IL5 с БА.

Исследование проводили на выборке больных atopической БА и членов их семей, жителей Томской области. Всего было обследовано 208 человек (41 семья), среди них — больные БА (81 человек; группа 1); больные другими atopическими заболеваниями и

пациенты с уровнем общего IgE > 100 МЕ/мл (77 человек; группа 2); пациенты без atopии и БА (50 человек; группа 3). Включение пробандов (больных atopической БА) в выборку проводилось по следующим критериям: наличие анамнеза, характерного для астмы, типичных клинических симптомов БА, БГР (PC₂₀ ≤ 8 мг/мл), atopии (положительные кожные алергопробы, уровень общего IgE > 100 МЕ/мл).

Для проведения кожных алергопроб с ингаляционными и эпидермальными алергенами использовали наборы "Биомед" (Москва) с растительными и грибковыми алергенами фирмы "Immuno Tek" (Испания). Для оценки функции внешнего дыхания (ФВД) проводили анализ кривой поток-объем и показателей спирометрии. Исследование ФВД выполняли по стандартной методике [9] на аппарате *Master Lab Pro* (фирма "Erich Jaeger", Германия). Степень реактивности дыхательных путей оценивали в метахолиновом тесте (PC₂₀). Измерение уровня общего сывороточного IgE и ИЛ-5 было проведено с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием стандартных наборов в соответствии с рекомендациями производителя ("Вектор-Бест", Новосибирск; "Cytelisa", США). Количество эозинофилов исследовалось в мазках-отпечатках со слизистой носа по стандартной методике [8]. Полиморфизм C-703T-гена IL5 типировали с помощью рестрикционного анализа ПЦР-продуктов, содержащих в случае наличия аллеля С, сайт узнавания для эндонуклеазы AlwN I (*New England Biolabs*, Великобритания).

Оценку и сравнение параметров распределений уровня ИЛ-5 в группах больных БА и здоровых лиц проводили с помощью общепринятых статистических процедур. Для расчета внутрисемейных корреляций по уровню ИЛ-5 использовали коэффициент Пирсона. Оценку наследуемости получали как удвоенное значение коэффициента корреляции в парах родители — дети. Сравнение частот аллелей в выборках больных БА и здоровых лиц проводили с помощью критерия χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность. Анализ ассоциации полиморфизма C-703T с БА проводили с помощью теста на неравновесие по сцеплению (*Transmission/Disequilibrium Test — TDT*) [12].

Уровни исследованных маркеров воспаления представлены в табл.1. Установлена значительная их вариабельность в зависимости от патологического состояния обследованных пациентов, а именно:

- низкое значение PC₂₀ в группе 1 как свидетельство высокого уровня бронхиальной реактивности у больных астмой в отличие от пациентов групп 2 и 3, у которых не обнаружена БГР при PC₂₀ ≤ 8 мг/мл ($p < 0,05$);
- повышенное содержание общего IgE в группах 1 и 2 ($p < 0,05$), что отражало реализацию atopических заболеваний у обследованных пациентов этих групп преимущественно посредством IgE-зависимого механизма;
- значительно более высокий процент эозинофилов в мазках-отпечатках со слизистой носа у больных

Уровень маркеров воспаления у обследованных пациентов, $M \pm m$

Группа обследованных	Маркер			
	Ил-5, пг/мл	IgE об, МЕ/мл	Э наз, %	PC ₂₀ , мг/мл
Пациенты, страдающие бронхиальной астмой (группа 1)	194,5±62,6	310,8±52,4	8,89±3,1*	3,6±0,5*
Средний возраст 21,1 (2,4–70) года муж/жен 45/36	n=32	n=70	n=37	n=62
Пациенты с atopическими заболеваниями и IgE>100 МЕ/мл (группа 2)	164,0±42,0	330,7±40,6	2,62±1,6	18,9±2,2
Средний возраст 35,6 (6,0–78) года муж/жен 23/27	n=21	n=46	n=26	n=46
Пациенты без астмы и atopических заболеваний (группа 3)	179,6±42,6	37,5±3,6**	0,86±0,4*	26,6±5,3*
Средний возраст 39,7 (2,5–74) года муж/жен 23/27	n=25	n=41	n=41	n=41

Примечание. * — $p < 0,05$ для группы 1 в сравнении с группами 2, 3, ** — $p < 0,05$ для группы 3 в сравнении с группами 1, 2.

БА ($p < 0,05$) как доказательство эозинофильного характера воспаления.

При однофакторном дисперсионном анализе была установлена ассоциация между уровнем эозинофилов и наличием БГР ($F=5,64$; $p=0,021$). В группе пробандов отмечена тенденция к связи между числом эозинофилов в мазках-отпечатках и уровнем общего IgE ($r=0,58$; $p=0,07$). Кроме того, нами обнаружен высокий уровень значимости ассоциации между тканевой эозинофилией и atopической БА у детей ($F=4,05$; $p=0,05$). Таким образом, результаты оценки уровней маркеров воспаления в исследуемой выборке свидетельствуют о взаимосвязи эозинофилов, IgE и БГР в механизмах развития астмы и atopии.

Анализ изменчивости уровня общего ИЛ-5 в группах больных БА и здоровых выявил значительный положительный эксцесс и чрезвычайно высокую дисперсию распределений показателя, что явилось следствием существенной межиндивидуальной вариации признака (см. табл.1). В группе больных БА средний уровень ИЛ-5 был несколько выше, чем у здоровых, однако согласно результатам однофакторного дисперсионного анализа различия статистически недостоверны ($F=0,630$, $p=0,430$). Сравнение распределений между группами больных и здоровых по критерию Колмогорова–Смирнова также не показало достоверных отличий.

При оценке семейных корреляций по уровню общего сывороточного ИЛ-5 (табл.2) продемонстрирована достоверная взаимосвязь в парах мать–дочь ($p < 0,05$). Достоверные корреляции были также получены в парах мать–дети, отец–дети, родители–дети ($p < 0,05$). Недостоверные значения коэффициента корреляции в других семейных парах, возможно,

связаны с небольшими объемами исследованных групп. Отсутствие достоверной корреляции в супружеских парах свидетельствует о незначительной брачной ассортативности по этому показателю в исследованной выборке. Оценка наследуемости (H) уровня ИЛ-5 составила 74,74%, что говорит о существенном вкладе генетической составляющей в общую фенотипическую изменчивость признака.

Таблица 2

Семейные корреляции и наследуемость уровня сывороточного ИЛ-5

Семейные пары	n	$R \pm Sr$	p
Муж–жена	19	0,2719±0,2334	0,2602
Мать–сын	17	0,1817±0,2539	0,4852
Мать–дочь	18	0,5105±0,2150	0,0304
Отец–сын	13	0,4023±0,2760	0,1730
Отец–дочь	10	0,3139±0,3357	0,3771
Мать–дети	35	0,3732±0,1498	0,0179
Отец–дети	23	0,3746±0,2023	0,0783
Родители–дети	58	0,3737±0,1130	0,0016
H , %		74,74	

Примечание. $R \pm Sr$, p — коэффициент корреляции, его ошибка и достигнутый уровень значимости соответственно, H — оценка наследуемости.

Таблица 3

Распределение генотипов и частоты аллелей по полиморфизму C-703T-гена IL5

Группа	Генотип			Аллель		<i>p</i>
	СС	СТ	ТТ	С	Т	
Больные (<i>n</i> =89)	56	27	6	0,78	0,22	0,182
Здоровые (<i>n</i> =141)	72	61	8	0,72	0,28	

Примечание. *p* — достигнутый уровень значимости для сравнения частот аллелей между группами больных БА и здоровых лиц.

В связи со значительной ролью ИЛ-5 в патогенезе БА представляется важным исследование ассоциации полиморфизма кодирующего его гена с заболеванием. Полиморфизм C-703T был впервые обнаружен в анализе сцепления локуса 5q31-33 с семейной эозинофилией [10]. Поскольку этот полиморфизм расположен в промоторной области гена IL5, он, не влияя на структуру белка, может существенно изменять уровень экспрессии гена и таким образом служить основой формирования патологического фенотипа.

Обращает на себя внимание гетерогенность в распределении генотипов по полиморфизму C-703T в группах больных БА и здоровых лиц (табл.3). Так, в выборке здоровых лиц доли гомозигот СС и гетерозигот практически одинаковы, в то время как у больных БА численность СС в 2 раза выше, чем СТ. При этом частота аллеля С в выборке больных выше (соответственно частота Т ниже), чем у здоровых, хотя отличия незначительны ($p=0,182$). Тем не менее отмеченная гетерогенность в распределении генотипов в выборках с разным статусом здоровья позволяет предположить ассоциацию полиморфизма C-703T с БА.

Для точной оценки такой ассоциации использовали тест на неравновесие по сцеплению (TDT), который в общем виде проверяет предпочтительность наследования больными детьми маркерного аллеля М1 от гетерозиготных родителей М1М2. В случае наличия ассоциации аллель М1 будет наследоваться больными детьми достоверно чаще альтернативного [12].

В данном исследовании значение статистики TDT составило 4,568 ($p=0,033$). Это свидетельствует о достоверной ассоциации полиморфизма C-703T-гена IL5 с БА. Физиологической основой полученной ассоциации может быть участие данного полиморфизма в регуляции изменчивости общего уровня ИЛ-5. Это подтверждается отмеченным в настоящем исследовании отличием уровня ИЛ-5 у больных БА по сравнению со здоровыми, а также высокой генетической детер-

минацией вариабельности показателя, зафиксированной оценкой наследуемости ИЛ-5 ($H 74,7\%$).

Дальнейшее изучение полиморфизма гена IL5 и поиск его ассоциаций с клиническими признаками БА помогут пролить свет на генетические основы патогенеза этого и других заболеваний, связанных с эозинофильным воспалением. Кроме того, такие данные могут послужить основой для формирования молекулярно-генетических подходов в диагностике и генспецифической терапии БА.

Выводы

1. У больных бронхиальной астмой и их родственников установлена взаимосвязь содержания эозинофилов в мазках-отпечатках со слизистой носа с бронхиальной астмой, уровнем бронхиальной гиперреактивности и ИЛ-5 в сыворотке крови.
2. Дана оценка коэффициента наследуемости ИЛ-5 ($H 74,7\%$).
3. Впервые установлена ассоциация полиморфизма C-703T-гена IL5 с БА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мюррей Р.К. Механизм бронхоконстрикции и бронхиальная астма. В кн.: Гриппи М. (ред.) Патология легких. М.: Бином; 1997. 86–100.
2. Пузырев В.П., Огородова Л.М., Салюкова О.А. Генетическая основа этиопатогенеза бронхиальной астмы. Сиб. мед. журн. 1998; 3: 82–85.
3. Пузырев В.П., Фрейдлин М.Б. Роль генов интерлейкинов и их рецепторов в формировании предрасположенности к бронхиальной астме. Бюл. exper. биол. 1999; 127 (Прил.1): 3–6
4. Corrigan C.J. Cytokines (Interleukines). In: Kay A.B., ed. Allergy and allergic diseases. Oxford: Blackwell Science; 1997; vol.2: 340–364.
5. Hopkin J.M. Molecular genetics of the high-affinity IgE receptor. Monogr. Allergy 1996; 33: 97–108.
6. Marsh D.J., Neely J.D., Breazeale D.R. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. Science 1994; 264: 1152–1156.
7. Martinez F.D., Solomon S., Holberg C.J. Linkage of circulating eosinophils to markers on chromosome 5q. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998; 158: 1739–1744.
8. Nagayama Y., Odazima Y., Nagayama S. et al. Eosinophils and basophils cells in sputum and nasal swears taken from infants and young children during acute asthma. Pediatr. Allergy Immunol. 1995; 6 (4): 204–208.
9. Quanjer Ph. H., Tammeling G. L., Cotes J.E. et al. Lung volumes and ventilatory flows. Eur. Respir. J. 1993; 6: 4–40.
10. Rioux J.D., Stone V.A., Daly M.J. Familial eosinophilia maps to the cytokine gene cluster on human chromosomal region 5q31-q33. Am. J. Hum. Genet. 1998; 63: 1086–1094.
11. Rothenberg M.E. Eosinophilia. N. Engl. J. Med. 1998; 338: 1592–1600.
12. Spielman R.S., McGinnis R.E., Ewens W.J. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Am. J. Hum. Genet. 1993; 52: 506–516.

Поступила 24.11.2000