

УДК 61: 575.- 616.23/25

Е. Я. Гречанина^{1,2,3}, А. И. Безродная^{1,2}, Э. М. Ходош³
Украинский институт клинической генетики ХНМУ¹,
Харьковский специализированный медико-генетический центр¹,
Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина²,
Харьковская медицинская академия последипломного образования³

Иммуногенетические характеристики бронхиальной астмы

Ключевые слова: иммуногенетика, бронхиальная астма, цитокины, Th-клетки.

Введение

Согласно определениям, данным в докладах рабочей группы GINA, бронхиальная астма (БА) – хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в развитии которого принимают участие многие клетки и клеточные элементы: тучные клетки, эозинофильные гранулоциты, Т-лимфоциты и др. У предрасположенных лиц это воспаление приводит к повторяющимся эпизодам хрипов, одышки, тяжести в груди и кашля, особенно ночью и/или ранним утром. Эти симптомы обычно сопровождаются диффузной, но вариабельной обструкцией бронхиального дерева, которая, по крайней мере частично, обратима спонтанно или под влиянием лечения. Воспаление также приводит к гиперреактивности бронхов. Бронхообструктивные состояния, характеризующиеся хроническим аллергическим воспалением дыхательных путей, гиперреактивностью бронхов и обратимым ограничением воздушного потока, стали объединять термином «бронхиальная астма» [4–6, 8].

Альтернативные состояния генов, называемые аллелями и сформировавшиеся под действием механизмов эволюции, образуют широкий наследственный полиморфизм. Ген считается полиморфным, если он присутствует в популяции в виде двух и более аллелей, с частотой более редкого из них не менее 1 %. В человеческой популяции не менее 25 % (около 10 000) генов являются полиморфными [1, 2].

К настоящему времени накоплены результаты множества исследований, свидетельствующие об ассоциации аллельных вариантов генов интерлейкинов и генов ферментов детоксикации ксенобиотиков (ФДК) с патологическими состояниями БА, поскольку антигенспецифические иммунные механизмы патогенеза данного заболевания опосредованы Т-клетками [1, 2, 9, 10]. Т-хелперные клетки (Th) обычно рассматривались как

делящиеся по двум клеточным эффекторным линиям – Th1 и Th2-клетки, формирующим клеточный и гуморальный иммунитет соответственно, который основывается на экспрессируемом профиле цитокинов. Иммунологические нарушения при atopических заболеваниях выражаются в изменении соотношения популяций Th1 и Th2 в сторону Th2, соответственно с продуцируемыми цитокинами второго типа [9, 15]. Некоторые авторы [14] подчеркивают роль смешанного Th1- и Th2-ответа в деструктивных процессах, обусловленных как клеточноопосредованной, так и антителозависимой цитотоксичностью. Более поздние исследования описывают третью линию эффекторных клеток – Th17-клетки, которые антагонистически воздействуют своими цитокинами на клеточные линии Th1 и Th2, экспрессируя цитокины семейства IL-17 [7].

IL-4 – плейотропный цитокин, продуцируемый Th2-клетками, переключающий синтез изотопов иммуноглобулинов В-лимфоцитами на производство IgE. Уровень синтеза цитокина ассоциирован с определенными вариантами аллельных генов. Для гена IL-4 наличие Т в положении 589 ассоциировано с гиперпродукцией IgE [18].

IL-17F – цитокин Th17-клеток, являющийся защитой от внеклеточных патогенов, которые не могут эффективно элиминироваться Th1 и Th2. Кроме того, он часто ассоциирован с различными аллергическими реакциями [12, 13].

ФДК активно задействованы в метаболизме различных субстратов, в том числе интермедиатов процессов воспаления. Одной из характерных особенностей этой группы ферментов является широкая межиндивидуальная вариабельность изозимного спектра, обусловленная генетическим полиморфизмом [11]. Возможно, различия полиморфных вариантов генов цитокинов и ФДК

Таблиця 1

Анализ полиморфного локуса C-589T гена IL-4, Ile-462Val гена CYP1A1, His-161Arg гена IL-17F у больных БА

БА	Частота аллеля		h_{obs}	h_{exp}	D	Генотип, n (%)		
	C	T				CC	CT	TT
Все формы	0,80	0,20	0,30	0,32	-0,0625	26 (65)	12 (30)	2 (5)
	Ile	Val	0,05	0,04	0,25	Ile Ile	Ile Val	Val Val
	0,98	0,02				38 (95)	2(5)	0 (0)
	His	Arg	0,08	0,11	-0,2727	His His	His Arg	Arg Arg
	0,94	0,06				36 (89)	3 (8)	1 (3)

Примечания: n – число пар; D – относительное отклонение ожидаемой гетерозиготности от наблюдаемой.

играют определенную роль в формировании клинического фенотипа БА, который согласно GINA может быть представлен 4 формами тяжести [8].

Цель исследования – изучение генотипа и частоты аллелей IL-4 (C-589T), IL-17F (His-161 Arg), CYP1A1 (Ile462Val) у пробандов с БА различной степени тяжести.

Объект и методы

Проведение молекулярно-генетических исследований осуществлялось на базе Украинского института клинической генетики Харьковского национального медицинского университета. Анализировался полиморфизм генов IL-4 (C-589T), IL-17F (His-161 Arg), CYP1A1 (Ile462Val) с помощью тест-систем ООО НТП «Литех» (г. Москва) у 40 пациентов с БА разной степени тяжести методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Детекция результатов ПЦР проводилась в 3 % агарозном геле. Пациенты пребывали на стационарном лечении в городском пульмонологическом центре Харькова (ГКБ № 13). Разницу долей оценивали с помощью угловой трансформации ф. Сравнение рядов распределения проведено с помощью критерия χ^2 на уровне значимости 0,05. Ожидаемую гетерозиготность полиморфизма генов IL-4, IL-17F, цитохрома P450 CYP1A1 рассчитывали по опубликованным методикам [3]. Относительное отклонение ожидаемой гетерозиготности от наблюдаемой (D) рассчитывали по формуле:

$$D = (h_{obs} - h_{exp}) / h_{exp}$$

где h_{obs} и h_{exp} – ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность соответственно.

Результаты исследований и их обсуждение

В таблице 1 приведены результаты анализа распределения генотипов 589 CC, 589 CT, 589 TT гена IL-4; 462 Ile Ile, 462 Ile Val, 462 Val Val гена CYP1A1; 161 His His, 161 His Arg, 161 Arg Arg гена IL17F среди больных БА. Из полученных данных видно, что встречаются все возможные генотипы, кроме 462 Val Val. Данный феномен может объясняться тем, что представители с мутантным генотипом элиминируются. Поскольку белковые продукты указанного гена осуществляют взаимодействие с окружающей средой, детоксицируя или токсичируя чужеродные химические соединения, которые попадают в организм, в том числе лекарственные препараты [11],

а носители мутации не способны к детоксикации, чем увеличивают токсичность внутренней среды организма, как результат – они не выживают. Установлено, что IL-17 экспрессируется в биоптате легких при БА, поскольку Th17-клетки вовлекаются в иммунный ответ при бактериальном заражении, а также патогенетически связаны с развитием хронических воспалительных заболеваний. После того как инфекционный агент проникает в организм, IL-17 связывается с сигнальным рецептором IL-17RA. Такая реакция вызывает резкое увеличение нейтрофилов в организме носителя инфекции. Белые кровяные клетки нарушают работу легких и провоцируют их изменения. Свойства IL-17F наиболее хорошо изучены среди цитокинов семейства IL-17 [12, 14].

Генотип 161 His His встречается в 29,6 раза чаще среди пациентов с БА, чем генотип 161 Arg Arg, что подтверждается результатами исследований, проводимых на лабораторных мышах, поломки генома IL-17 у которых обеспечивали меньшую подверженность повреждениям легких, спровоцированным вирусной инфекцией. Кроме того, у дефектных мышей был зафиксирован пониженный уровень нейтрофилов в легких [16, 17].

В таблице 2 приведены результаты распределения пробандов в зависимости от формы (степени тяжести) БА. Среди данного контингента больных встречались все возможные степени тяжести БА согласно классификации GINA (2006): I степень – легкая интермиттирующая

Таблиця 2

Количество больных с разными степенями тяжести БА

Степень тяжести БА	Все больные		Женщины		Мужчины	
	n	%	n	%	n	%
I	24	60,0	14	58,2	10	62,6
II	4	10	4	16,7	0	0
III	3	7,5	2	8,4	1	6,3
IV	9	22,5	4	16,7	5	31,1
Σ	40	100	24	100	16	100

Примечание: n – число пар.

<i>Таблица 3</i>						
Распределение генотипов полиморфных локусов генов IL-17F (His-161 Arg), IL-4 (C-589T), CYP1A1 (Ile462Val) среди больных с разными степенями тяжести БА						
Степень тяжести БА	N, n	%	Htzg, n	%	Hmzg, n	%
IL-17F						
I	23	57,5	1	2,5	1	2,5
II	4	10	0	0	0	0
III	2	5	0	0	0	0
IV	7	17,5	2	5	0	0
Σ	36	90	3	7,5	1	2,5
IL-4						
I ст.	19	47,5	5	12,5	0	0
II ст.	2	5	1	2,5	1	2,5
III ст.	2	5	1	2,5	0	0
IV ст.	3	7,5	5	12,5	1	2,5
Σ	26	65	12	30	2	5
CYP1A1						
I ст.	22	55	2	5	0	0
II ст.	4	10	0	0	0	0
III ст.	3	7,5	0	0	0	0
IV ст.	9	22,5	0	0	0	0
Σ	38	95	2	5	0	0
Примечания: n – число пар; IL-4: N-589 CC, Htzg-589 CT, Hmzg-589 TT; IL17F: N-161 HisHis, Ht-161 HisArg, Hm-161ArgArg; CYP1A1: N-462 IleIle, Htzg- 462IleVal, Hmzg- 462Val Val; * – p < 0,05.						

форма; II – легкая персистирующая; III – среднетяжелая персистирующая; IV – тяжелая персистирующая. Значительную долю в общей выборке больных, а именно 60 %, составляли пробанды с легкой интермиттирующей формой БА, что в 6 раз больше доли больных с легкой персистирующей, в 8 раз больше доли больных со среднетяжелой персистирующей и почти в 3 раза больше доли пациентов с тяжелой персистирующей формой БА.

При сравнении в исследованной выборке пробандов в зависимости от пола достоверной разницы не выявлено ($p > 0,05$).

В таблице 3 приведены результаты анализа распределения генотипов полиморфных локусов генов IL-17F (His-161 Arg), IL-4 (C-589T), CYP1A1 (Ile462Val) среди больных с разными формами БА. Из приведенных данных видно, что у пациентов с разными формами БА не встречается генотип 462 Val Val. По всем вышеуказанным генам зафиксировано носительство нормального аллеля с большей частотой, чем полиморфного для лиц с легкой интермиттирующей БА. Носители Htzg-полиморфизма по гену IL-17F чаще встречаются среди лиц с тяжелой персистирующей формой БА. По гену IL-4 вышеуказанный полиморфизм встречается с одинаковой частотой среди больных с I и IV, а также II и III степенями тяжести заболевания.

В таблице 4 приведены результаты распределения генотипов в компаундах полиморфных локусов генов IL-4 (C-589T) – IL-17F (His-161 Arg), IL-4 (C-589T) – CYP1A1 (Ile462Val), IL-17F (His-161 Arg) – CYP1A1 (Ile462Val) среди больных БА. Нами была выявлена высокая частота (30 %) компаундов полиморфизмов Htzg-N в генах IL-4 и CYP1A1 у пробандов с БА. По указанному компаунду полиморфизмов не выявлено у 60 % пациентов. Для генов IL-4 и IL-17F частота компаунда Htzg-Htzg составляет 2,5% ($p < 0,05$). Компаунда Hmzg не было обнаружено среди пробандов с БА.

Выводы

Анализ генов БА показал следующее.

1. Можно предположить, что полиморфизм 462 Val Val гена CYP1A1 является летальным, потому не встречается среди пациентов со всеми формами БА.
2. Носители Htzg-полиморфизма по гену IL-17F чаще встречаются среди больных с тяжелой персистирующей формой БА.
3. Hmzg- полиморфизм по аллелю C-589T гена IL-4 не встречается среди больных с I и III степенями тяжести БА.

Таблиця 4								
Распределение генотипов в компаундах полиморфных локусов генов IL-4 (C-589T) – IL-17F (His-161 Arg), IL-4 (C-589T) – CYP1A1 (Ile462Val), IL-17F (His-161 Arg) – CYP1A1 (Ile462Val) среди больных БА								
IL-4 – IL-17F	n	%	IL-4 –CYP1A1	n	%	IL-17F –CYP1A1	n	%
N-N	25	62,5	N-N	24	60	N-N	34	84,22*
N-Htzg	2	5	N-Htzg	2	5	N-Htzg	2	5,26
N-Hmzg	0	0	N-Hmzg	0	0	N-Hmzg	0	0
Htzg-N	9	22,5*	Htzg-N	12	30*	Htzg-N	3	7,89*
Hmzg-N	2	5	Hmzg-N	2	5	Hmzg-N	1	2,63
Htzg-Htzg	1	2,5	Htzg-Htzg	0	0	Htzg-Htzg	0	0
Hmzg-Hmzg	0	0	Hmzg-Hmzg	0	0	Hmzg-Hmzg	0	0
Htzg-Hmzg	1	2,5	Htzg-Hmzg	0	0	Htzg-Hmzg	0	0
Hmzg-Htzg	0	0	Hmzg-Htzg	0	0	Hmzg-Htzg	0	0
Σ	40	100	Σ	40	100	Σ	40	100

Примечания: n – число пар; IL-4: N-589 CC, Htzg-589 CT, Hmzg-589 TT; IL-17F: N-161 HisHis, Ht-161 HisArg, Hm-161ArgArg; CYP1A1: N-462 llelle, Htzg- 462lleVal, Hmzg-462Val Val; * – p < 0,05.

Литература

1. Бочков, Н. П. Клиническая генетика [Текст] / Н. П. Бочков. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 480 с.: ил.
2. Гречанина, Е. Я. Медицинская генетика: учебник [Текст] / Е. Я. Гречанина. – К.: ВСИ «Медицина», 2010. – 552 с.
3. Животовский, Л. А. Популяционная биометрия [Текст] / Л. А. Животовский. – М.: Наука, 1991. – 271 с.
4. Фещенко, Ю. И. Сучасний підхід до фармакотерапії бронхіальної астми [Текст] / Ю. И. Фещенко // Мистецтво лікування. – 2003. – № 4. – С. 6–12.
5. Фещенко, Ю. И. Обструктивные заболевания легких. Образовательная программа для врачей [Текст] / Ю.И. Фещенко, Л.А. Яшина, М.А. Полянская [и др.]. – К., 2004. – 287 с.
6. Ходош, Э. М. Бронхиальная астма: эволюция взглядов в аспекте GINA [Текст] / Э.М. Ходош // Therapia. – 2008. – № 7–8 (28). – P. 23–28.
7. Bettelli, E. Th17: the third member of effector T cell Trilogy [Text] / E. Bettelli, T. Korn, K. Vijay // Immunol. – 2007. – Vol. 19, № 6. – P. 652–657.
8. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) [Электронный ресурс] / National Institutes Of Health: National Heart, Lung and Blood Institute. – 2007. – 92 p. – Режим доступа: <http://www.ginasthma.org>.
9. Hoffjan, S. Genetic variation in immunoregulatory pathways and atopic phenotypes in infancy [Text] / S. Hoffjan [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2004. – V. 113. – № 3. – P. 511–518.
10. Honkakoski, P. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors [Text] / P. Honkakoski, M. Negishi // Biochem. J. – 2000. – V. 347. – P. 321–337.
11. Ingelman-Sundberg, M. Human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms [Text] / M. Ingelman-Sundberg // Arch. Pharmacol. – 2004. – V. 369. – P. 89–104.
12. Kolls, J. Interleukin-17 family members and inflammation [Text] / J. Kolls, A. Linden // Immunity. – 2004. – Vol. 21. – P. 467–476.
13. Kurschus, F. C. Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype. / F. C. Kurschus, A. L. Croxford, A. P. Heinen [Text] // Eur. J. Immunol. – 2010. – Vol. 40. – P. 3336–3346.
14. Mariotti, S. T-cell-mediated and antigen-dependent differentiation of human monocyte into different dendritic cell subsets: a feedback control of Th1/Th2 responses [Text] / S. Mariotti, V. Sargentini, C. Marcantonio [et al.] // FASEB J. – 2008. – V. 22. – P. 3370–3379.
15. Patrick, E. Flavell Cutting Edge: Changes in Histone Acetylation at the γ IFN- and IL-4 Loci Accompany Th1/Th2 Differentiation [Text] / E. Patrick Fields, T. Kim Sean, A. Richard // J. Immunol. – 2002. – V. 169. – P. 647–650.

16. Stark, J. M. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus infection in inbred mice [Text] / J. M. Stark, S. A. Mc Dowell, V. Koenigsnecht // J. Med. Virol. – 2002. – V. 67. – P. 92–100.

17. Stark, J. M. Genomewide association analysis of respiratory syncytial virus infection in mice [Text] / J. M. Stark, M. M. Barmada, A. V. Winterberg // J. Virol. – 2010. – V. 84. – P. 2257–2269.

18. Walley, A. J. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for association with asthma and atopy [Text] / A. J. Walley, W. O. Cookson // J. Med. Genet. – 1996. – V. 33. – P. 689–692.

ІМУНОГЕНЕТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ

О. Я. Гречанина, А. І. Безродна, Е. М. Ходош

Резюме. Досліджено поширеність поліморфних варіантів генів: IL-4 C-589T, IL-17F His-161 Arg, CYP1A1 Ile462Val серед пробандів з різними ступенями тяжкості бронхіальної астми (БА). Hmzg-поліморфізм по алелю C-589T гена IL-4 не зустрічається серед хворих з I і III ступенями тяжкості БА. Поліморфізм 462 Val Val гена CYP1A1 не зустрічається серед пацієнтів з будь-якою формою БА.

Ключові слова: імуногенетика, бронхіальна астма, цитокіни, Th-клітини.

IMMUNOGENETIC CHARACTERISTICS OF ASTHMA

E. Y. Grechanina, A. I. Bezrodnaya, E. M. Hodosh

Summary. We investigated the prevalence of polymorphic variants of genes: IL4 C-589T, IL17F His-161 Arg, CYP1A1 Ile462Val among probands with varying degrees of severity of asthma. Hmzg polymorphism C-589T allele of the gene IL4 is not found among patients with I and III forms of gravity. 462 Val Val polymorphism of the CYP1A1 gene is not found among any form of asthma.

Key words: immunogenetics, asthma, cytokines, Th cells.