

ЦИТОКИНЫ И ПОЛИМОРФИЗМ ПРОМОТОРНЫХ РЕГИОНОВ ГЕНОВ (C-590T IL4, C-597A IL10) КАК МАРКЕРЫ НЕКОНТРОЛИРУЕМОГО ТЕЧЕНИЯ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ**Марина Викторовна СМОЛЬНИКОВА, Светлана Витальевна СМИРНОВА,
Ольга Сергеевна КОНОПЛЕВА***ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера (НИИ МПС)
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3 г*

Цель исследования. Изучить распределение аллельных вариантов промоторных регионов генов *IL4* (C-590T) и *IL10* (C-597A) в ассоциации с уровнем цитокинов в сыворотке крови (ИЛ-4, ИЛ-10) у детей, больных атопической бронхиальной астмой. Материал и методы. У 74 больных детей проанализированы показатели иммунного статуса и уровень цитокинов в сыворотке крови, полиморфизм генов C-590T *IL4* и C-597A *IL10*. Результаты и обсуждение. Неблагоприятным фактором развития неконтролируемого течения астмы являются наличие варианта T-590 *IL4* и гиперпродукция ИЛ-4. Пониженный уровень ИЛ-10 и наличие аллельного варианта A-597 *IL10* усиливают контроль над заболеванием у детей.

Ключевые слова: бронхиальная астма, цитокины, полиморфизм генов, ИЛ-4, C-590T, ИЛ-10, C-597A.

Бронхиальная астма является одним из самых распространенных хронических заболеваний органов дыхания в детском возрасте [2, 6, 7]. В настоящее время особого внимания требует контроль над ее течением у детей. Атопическая бронхиальная астма (АБА) – многофакторное заболевание, развитие которого в большинстве случаев связано с генетически детерминированными IgE-опосредованными (атопическими) механизмами [1, 3, 6]. Ключевую роль в процессе реализации атопических реакций играют цитокины с девиацией в сторону Th2-профиля [5, 10]. Генетической основой межиндивидуальных различий в иммунном ответе является аллельный полиморфизм генов, в том числе генов цитокинов [4, 8].

В настоящем исследовании изучены полиморфизм промоторных регионов генов противовоспалительных цитокинов *IL4* и *IL10*, уровень продукции этих цитокинов и показатели иммунитета у детей, больных АБА, с целью установления маркеров неконтролируемого течения заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы дети европеоидного происхождения, проживающие на территории Красноярского края, больные тяжелой или среднетяжелой АБА с различным уровнем контроля над течением

заболевания ($n = 74$). Диагностика АБА проведена в соответствии с рекомендациями GINA (Global Initiative for Asthma) [3]. Выделены 2 группы АБА: контролируемая (КАБА, $n = 41$) и неконтролируемая (НАБА, $n = 33$). Проведенный тип исследования – «случай – контроль». Контрольная группа – практически здоровые дети ($n = 33$), сопоставимые по полу и возрасту с больными.

Материалом исследования служила периферическая кровь. Определены показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета: содержание CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺-лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии; уровень иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG, IgE) и цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10) методом ИФА («Вектор-Бест», Новосибирск), а также полиморфизм генов C-590T *IL4* и C-597A *IL10*. Для выделения ДНК использовался набор «Silica» («Медиген», Новосибирск). Генотипирование аллельных вариантов генов проведено методом рестриктоного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ) специфических участков генома с использованием структуры праймеров и параметров температурных циклов [9, 12]. Для рестрикции участка C-590T *IL4* использовали эндонуклеазу рестрикции *Bme 18I*, участка C-597A *IL10* – *Rsa I* («Сибэнзим», Новосибирск).

Смольникова М.В. – к.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: smarinv@mail.ru

Смирнова С.В. – д.м.н., проф., врио директора, e-mail: svetvita@mail.ru

Коноплева О.С. – к.м.н., старший научный сотрудник, e-mail: olya_tyutina@mail.ru

При проведении статистической обработки материала применялись непараметрические методы, результаты представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (C_{25} – C_{75}), применялся критерий Манна – Уитни. Достоверность различий в распределении генотипов по полиморфным локусам между группами проверялась на соответствие равновесию Харди – Вайнберга (РХВ) с помощью критерия χ^2 и точного теста Фишера, определялся относительный риск (ОР).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа частот генотипов и отдельных аллельных вариантов полиморфных промоторных регионов генов *IL4* и *IL10* выявлены особенности частоты их распределения в группах больных АБА в зависимости от уровня контроля над течением заболевания. Характер распределения генотипов у обследованных детей в целом отражает частоту встречаемости генотипов в других европеоидных популяциях. Доминирующими аллельными вариантами являются *C-590 IL4* и *C-597 IL10*.

В группе АБА генотип *C/C IL4* встречался у 58,1 % больных, в группе контроля – у 48,5 % ($p > 0,05$). Частота встречаемости генотипа *T/T* в группе АБА составляет 4,1 %, в группе контроля – 3,0 % ($p > 0,05$, $OR = 1,55$). Так как величина относительного риска больше единицы, можно предположить, что генотип *T/T* имеет тенденцию к ассоциации с заболеванием. В распределении частот генотипов у больных с различным уровнем контроля над течением АБА отмечается тенденция к учащению встречаемости генотипов

C/T + T/T в группе НАБА (частота аллеля *T-590*: 0,27 – у больных НАБА, 0,20 – у больных КАБА, $OR = 1,55$, $p > 0,05$), а генотип *C/C* имеет тенденцию к ассоциации с КАБА (63,4 % у больных КАБА, 51,5 % у больных НАБА, $p > 0,05$).

Изучение частоты распределения вариантов гена *C-597A IL10* показало, что генотип *A/A* не выявлен в группе контроля, тогда как его частота в группе АБА составила 4,3 % ($p > 0,05$). Однако в контрольной группе частота генотипа *C/A* практически в 2 раза превышает таковую в группе АБА (соответственно 45,4 и 28,6 %, $OR = 0,65$, $p > 0,05$). Выявлено, что в группе КАБА частота генотипа *A/A C-597A IL10* в 2 раза больше, чем в группе НАБА (соответственно 12,2 и 6,1 %, $OR = 0,55$, $p > 0,05$). Ранее показано, что аллельный вариант *A-597 IL10* ассоциирован со сниженной экспрессией ИЛ-10 [4, 8]. В целом при анализе распределения генотипов *IL4* и *IL10* у 74 больных АБА достоверных различий между частотами в зависимости от уровня контроля над заболеванием не показано.

При изучении концентрации цитокинов в сыворотке крови и показателей иммунного статуса у индивидов с различными полиморфными вариантами *C-590T* гена *IL4* определено, что при наличии генотипа *C/C* содержание белкового продукта достоверно ниже, чем у носителей генотипов *C/T + T/T* ($p = 0,05$) (табл. 1). Статистически значимых различий в содержании ИЛ-10 не отмечено. В проведенном исследовании выявлено статистически значимое увеличение концентрации IgE у больных АБА с генотипами *C/T + T/T IL4* ($p = 0,03$). Относительное и абсолютное количество $CD4^+$ -клеток достоверно выше у детей с ге-

Таблица 1

Концентрация цитокинов и показателей иммунного статуса у детей, больных АБА, с различными генотипами полиморфизмов *C-590T IL4* и *C-597A IL10*, Me (C_{25} – C_{75})

Показатель (содержание)	<i>C-590C IL4</i>	<i>C-590T</i> и <i>T-590T IL4</i>	<i>p</i>
ИЛ-4, пг/мл	5,6 (3,6–9,7)	7,2 (3,7–14,8)	0,04
IgE, мЕ/мл	267 (184–604)	460 (221–679)	0,03
$CD4^+$, %	20 (15–26)	22 (18–30)	0,03
$CD4^+$, клеток/мкл	160 (72–261)	207 (141–266)	0,03
$CD8^+$, %	28 (20–46)	37 (28–39)	0,07
	<i>C-597C IL10</i>	<i>C-597A</i> и <i>A-597A IL10</i>	
ИЛ-4, пг/мл	4,9 (3,7–10)	6,5 (4,4–14,8)	0,04
ИЛ-10, пг/мл	38 (22,1–50,4)	35,6 (19,1–42,6)	0,04
IgE, мЕ/мл	452 (174–656)	270 (221–604)	0,05
IgG, г/л	12,9 (10,7–17,5)	14,4 (11,3–19,1)	0,08
$CD3^+$, %	56,2 (47–62)	59 (49–73)	0,04
$CD4^+$, %	19 (16–30)	20 (19–21)	0,01
$CD4^+$, клеток/мкл	160 (103–284)	187,5 (121–225)	0,01
$CD8^+$, клеток/мкл	234 (138–329)	187 (121–252)	0,05

нотипами С/Т + Т/Т полиморфизма С-590Т гена *IL4* ($p = 0,03$).

Анализ концентрации цитокинов у больных АБА, носителей различных генотипов С-597А гена *IL10*, показал ассоциативную связь аллеля А-597 *IL10* с пониженной концентрацией ИЛ-10 (см. табл. 1). Поскольку ИЛ-10 ингибирует выработку цитокинов Th1-клеток, способствуя В-клеточной активации, закономерно, что в присутствии генотипа С/С *IL10* отмечается увеличение содержания IgE ($p = 0,05$). При наличии генотипа С/С, ассоциированного с повышенной продукцией ИЛ-10, наблюдается более низкая концентрация ИЛ-4 по сравнению с носителями генотипов С/А + А/А ($p = 0,04$). При изучении уровня показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета в группе АБА в зависимости от наличия определенного генотипа полиморфизма С-597А гена *IL10* выявлено увеличение концентрации IgE у больных АБА с генотипом С/С *IL10* ($p = 0,05$). Относительное и абсолютное количество CD4⁺-клеток достоверно больше в группе АБА с генотипами С/А + А/А полиморфизма С-597А гена *IL10* ($p = 0,01$). Кроме того, процентное содержание CD3⁺-клеток выше у но-

сителей генотипов С/А + А/А, тогда как концентрация CD8⁺-клеток у этих больных меньше, чем у носителей генотипа С/С гена *IL10* ($p < 0,05$). В таблицах представлены показатели, уровень статистической значимости по которым достигает значения не более $p = 0,10$.

При анализе показателей иммунного статуса у носителей различных генотипов полиморфных участков генов *IL4* и *IL10* у больных АБА статистически значимые различия в группах КАБА и НАБА показаны только в содержании IgE в сыворотке периферической крови. Уровень IgE выше у носителей генотипов С/Т + Т/Т гена *IL4* и С/С гена *IL10* по сравнению с альтернативными генотипами обоих исследованных генов ($p \leq 0,05$). В группе контроля у детей с различными генотипами не выявлено статистически значимых различий в показателях гуморального и клеточного звеньев иммунитета.

Обнаружено статистически значимое увеличение содержания цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10 в сыворотке крови больных АБА, независимо от уровня контроля над заболеванием, и генотипов исследованных цитокинов по сравнению с контролем (табл. 2 и 3). Анализ уровня ИЛ-4 в

Таблица 2

Связь генотипов С-590Т *IL4* с концентрацией ИЛ-4 в сыворотке крови детей, больных АБА, с различным уровнем контроля над течением заболевания, Ме (С₂₅-С₇₅)

КАБА (1)		НАБА (2)		Контроль (3)		p
Генотип	Концентрация, пг/мл	Генотип	Концентрация, пг/мл	Генотип	Концентрация, пг/мл	
С/С (n = 26)	3,9 (1,7–6,1)	С/С (n = 17)	5,1 (3,6–13,9)	С/С (n = 16)	0,9 (0,3–1,3)	$p_{1,2} = 0,018$ $p_{1,3} = 0,013$ $p_{2,3} = 0,008$
С/Т + Т/Т (n = 15)	4,2 (2,5–5,5)	С/Т + Т/Т (n = 16)	8,3 (3,8–15,1)	С/Т + Т/Т (n = 17)	1,3 (0,8–1,6)	$p_{1,2} = 0,056$ $p_{1,3} = 0,031$ $p_{2,3} = 0,024$
p	0,98		0,51		0,20	

Таблица 3

Связь генотипов С-597А *IL10* с концентрацией ИЛ-10 в сыворотке крови детей, больных АБА, с различным уровнем контроля над течением заболевания, Ме (С₂₅-С₇₅)

КАБА (1)		НАБА (2)		Контроль (3)		p
Генотип	Концентрация, пг/мл	Генотип	Концентрация, пг/мл	Генотип	Концентрация, пг/мл	
С/С (n = 26)	34,8 (13,3–44,3)	С/С (n = 21)	39,1 (24,3–42,6)	С/С (n = 18)	6,2 (2,1–13,4)	$p_{1,2} = 0,004$ $p_{1,3} = 0,003$ $p_{2,3} = 0,001$
С/А + А/А (n = 15)	21,8 (5,6–39,1)	С/А + А/А (n = 12)	33,5 (19,8–39,6)	С/А + А/А (n = 15)	4,6 (2,6–14,3)	$p_{1,2} = 0,075$ $p_{1,3} = 0,019$ $p_{2,3} = 0,008$
p	0,38		0,17		0,10	

сыворотке крови у больных АБА с различным уровнем контроля над заболеванием и в зависимости от носительства того или иного генотипа *IL4* показал, что наиболее высокая концентрация ИЛ-4 выявлена у носителей генотипов С/Т + Т/Т полиморфизма *C-590T IL4* в группе НАБА, будучи значимо выше, чем у детей с КАБА и в контроле ($p \leq 0,05$). Анализ уровня ИЛ-10 в сыворотке крови у больных АБА с различным уровнем контроля над заболеванием и в зависимости от носительства того или иного генотипа *IL10* показал, что наибольшая концентрация ИЛ-10 определена у носителей генотипа С/С полиморфизма *C-597A IL10* в группе НАБА, превышающая таковую у пациентов группы КАБА и здоровых детей ($p < 0,005$). По данным литературы, именно аллельные варианты *T-590 IL4* и *C-597 IL10* ассоциированы с повышенной экспрессией соответствующего белкового продукта [4, 8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные данные о распределении полиморфных вариантов генов *IL4* и *IL10* у больных АБА с различным уровнем контроля над заболеванием, нужно отметить, что оба исследованных цитокина являются продуктами клона Th2-лимфоцитов. Полиморфные гены цитокинов способны принимать активное участие в формировании фенотипа заболевания [4, 8]. Ранее исследованиями в различных популяциях мира была показана ассоциативная связь аллельного варианта *T-590* гена *IL4* с гиперпродукцией ИЛ-4, одного из ключевых цитокинов, участвующих в патогенезе АБА: он способствует пролиферации плазматических клеток, увеличивает экспрессию низкоаффинного рецептора к IgE на В-клетках, селективно индуцирует синтез IgE. Анализ связи полиморфизма *C-597A IL10* с продукцией ИЛ-10 показал тенденцию к снижению концентрации белкового продукта при носительстве аллельного варианта *A-597*, возможно, это обстоятельство оказывает протективное действие на интенсивность воспалительного процесса в бронхах. ИЛ-10 ингибирует образование Th1-субпопуляции лимфоцитов, снижая пролиферативный потенциал, подавляя секрецию цитокинов Th1-профиля (например, ИЛ-2, ИФН- γ), контролируя, таким образом, баланс Th1/Th2, переключая иммунный ответ в Th2-зависимый [11, 13]. Одновременно он усиливает продукцию антител В-клетками, включая синтез IgE, что указывает на участие ИЛ-10 в модуляции персистенции аллергического воспаления.

Таким образом, аллельный вариант *T-590* полиморфного локуса гена *IL4*, ассоциированный

с увеличением концентрации ИЛ-4 в сыворотке крови, модулирующим усиление атопического воспаления, может играть прогностически неблагоприятную роль в течении атопической бронхиальной астмы у детей. Кроме этого, наличие полиморфного варианта *A-592* промоторного региона гена *IL10* ассоциировано с уменьшением концентрации ИЛ-10 в сыворотке крови, а генотип С/А может являться прогностически благоприятным фактором в формировании характера течения АБА у детей, предупреждая девиацию иммунного ответа в сторону Th2-клеток.

В настоящее время во всем мире отмечается гиподиагностика АБА у детей, что приводит к развитию тяжелых неконтролируемых форм течения заболевания. Проведенное нами исследование позволило установить иммунологические и генетические особенности неконтролируемого течения астмы у детей Красноярского края, что может быть экстраполировано на другие регионы России. В качестве дополнительных прогностических маркеров неконтролируемого течения АБА у детей можно рекомендовать определение концентрации ИЛ-4 и ИЛ-10 в сыворотке крови, а также полиморфизма генов *IL4* и *IL10*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Генетика бронхолегочных заболеваний / Ред. В.П. Пузырев, Л.М. Огородова. М., 2010. 160 с.
2. *Genne H.A.* Актуальность проблемы бронхиальной астмы у детей // Педиатрия. 2012. 91. (3). 76–82.
3. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (пересмотр 2007 г.) / Ред. А.Г. Чучалин. М.: Атмосфера, 2008. 108 с.
4. *Коненков В.И., Смольникова М.В.* Структурные основы и функциональная значимость аллельного полиморфизма генов цитокинов человека и их рецепторов // Медицинская иммунология. 2003. 5. (1–2). 11–28.
5. *Смирнова С.В., Зенкина Л.В., Игнатова И.А., Кадричева С.Г.* Концентрация IL-2, IL-4, IL-6 и IFN γ в периферической крови и назальных смывах при респираторной атопии и псевдоатопии // Рос. аллергологич. журн. 2005. (1). 30–33.
6. *Смирнова С.В., Пыцкий В.И.* Патогенез истинной аллергии и псевдоаллергии: учебно-методич. пособие. Красноярск; М., 2002. 21 с.
7. *Смольникова М.В., Смирнова С.В., Тютина О.С., Бычковская С.В.* Полиморфизм генов цитокинов (IL4, IL10) и особенности иммунного реагирования в зависимости от уровня контроля над течением атопической бронхиальной астмы у детей // Рос. аллергологич. журн. 2013. 2. 23–28.
8. *Bidwell J., Keen L., Gallageher G. et al.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases // Genes Immun. 1999. (1). 3–19.

9. Cantagrel A., Navaux F., Loubet-Lescoulié P. et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* 1999. 42. 1093–1100.

10. Dmitrieva-Zdorova E.V., Voronko O.E., Latysheva E.A. et al. Analysis of polymorphisms in T(H)2-associated genes in Russian patients with atopic bronchial asthma // *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2012. 22. (2). 126–132.

11. Freidin M.B., Puzryev V.P., Kobayakova O.S., Ogorodova L.M. Association of polymorphisms in the

human IL4 and IL5 genes with atopic bronchial asthma and severity of the disease // *Comp. Func. Genomics.* 2003. 4. (3). 346–350.

12. Padyukov L., Smolnikova M., Klareskog L. et al. Polymorphism in promoter region of *il10* gene is associated with rheumatoid arthritis in women // *J. Rheum.* 2004. 31. (3). 422–425.

13. Smirnova S., Smolnikova M., Tereshchenko S. Immune response and polymorphism of the cytokine genes (IL4, IL10 and IL2, TNFA) in atopic bronchial asthma in Russian children // *Allergy.* 2014. 69. 227.

CYTOKINES AND GENES POLYMORPHISM IN THE PROMOTER REGIONS (C-590T IL4 AND C-597A IL10) AS MARKERS OF UNCONTROLLED ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN

Marina Victorovna SMOLNIKOVA, Svetlana Vitalevna SMIRNOVA, Olga Sergeevna KONOPLEVA

Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak str., 3g

The aim. To study an association between the promoter polymorphisms of the *IL4* (C-590T) and *IL10* (C-597A) genes and serum cytokines level in children with atopic bronchial asthma. Material and methods. The immune status parameters, serum cytokines level and gene polymorphism C-590T *IL4* and C-597A *IL10* has been evaluated in seventy four children with asthma. Results and discussion. The occurrence of T-590 allele of the *IL4* gene and IL-4 cytokine hyperproduction is the unfavorable factor for the asthma uncontrolled course. The reduced serum level of IL-10 and A-597 allelic variant of the *IL10* gene enhance the control of asthma in children.

Key words: bronchial asthma, cytokines, gene polymorphism, IL4, IL10.

Smolnikova M.V. – candidate of biological sciences, leading researcher, e-mail: smarinv@mail.ru

Smirnova S.V. – doctor of medical sciences, professor, acting director, e-mail: svetvita@mail.ru

Konopleva O.S. – candidate of medical sciences, senior researcher, e-mail: olya_tyutina@mail.ru