

А.Э.Сазонов, Л.М.Огородова, О.С.Кобякова, И.И.Иванчук,
Ф.И.Петровский, И.С.Лещева

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА IL-5 ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Бронхиальная астма (БА) является хроническим заболеванием, характеризующимся воспалением дыхательных путей и бронхиальной гиперреактивностью. Несмотря на то, что в генерализованном процессе воспаления задействованы многие клетки, именно эозинофилы являются ключевыми, участвующими в механизмах развития БА. Накопление эозинофилов в тканях дыхательных путей сопровождается воспалением при БА, ассоциировано с гиперреактивностью бронхов; установлена положительная корреляция между содержанием эозинофилов в стенке бронхов и степенью тяжести БА [1]. Медиаторы воспаления, высвобождаемые эозинофилами после их активации в дыхательных путях, могут повреждать окружающие ткани, индуцируют констрикцию гладких мышц и супероксид-опосредованную деструкцию тканей, что приводит к долговременным структурным изменениям (ремоделинг).

Несмотря на то, что увеличение числа эозинофилов в дыхательных путях давно связывают с воспалением, растворимые медиаторы, которые влияют на структуру и функцию эозинофилов, исследуются относительно недавно. Один из них — IL-5 (как и хемокин эотаксин) — является наиболее важным в инициации и регуляции эозинофил-зависимых воспалительных процессов. IL-5 относится к индуцибельным гликопротеинам, секретируемым Т-клетками, тучными клетками, эозинофилами, базофилами и др. IL-5 обладает широким спектром биологической активности, играет ключевую роль в пролиферации, дифференцировке (включая терминальную), повышении жизнеспособности, активации и хемотаксисе эозинофилов при целом ряде патологий, в том числе при atopическом дерматите, аллергическом рините и БА [2, 3], он повышает генерацию гистамина и лейкотриена C₄ базофилами человека, обеспечивает IL-2-зависимую пролиферацию и дифференцировку цитотоксических Т-лимфоцитов человека и мышей [4]. Недавно была установлена ассоциация полиморфизма C-703T гена IL-5 с atopической БА [5], что свиде-

тельствует о нарушении генетического контроля над продукцией IL-5 при БА. Однако клиническое значение активности гена IL-5 может быть охарактеризовано только через его продукты, т. е. путем оценки вариабельности содержания IL-5 у больных с разными клиническими формами БА.

Таким образом, IL-5 является привлекательным маркером для оценки воспаления при БА, но использование этого показателя в клинических целях сегодня ограничивается отсутствием доказательной базы для выбора методов его оценки и значительной вариабельностью уровня IL-5 в биологическом материале ввиду его коммитированности с другими факторами, влияющими на активность воспаления. Возможно, изучение экспрессии гена этого цитокина было бы более перспективным, с точки зрения понимания патофизиологии и клинической интерпретации воспаления при БА.

Методы исследования

Обследованы 71 пациент с БА (21 человек — с легкой формой, 15 человек — со среднетяжелой и 35 больных тяжелой БА), средний возраст которых составил $38,4 \pm 4,1$ года. Для диагностики астмы и оценки степени тяжести использовались критерии GINA 2002 [6]. У 62 больных верифицирован экзогенный вариант БА, у 9 — эндогенный. Группу контроля составили 12 добровольцев, не страдающих БА, другими atopическими заболеваниями, гельминтозами, с отрицательными результатами кожного алерготестирования.

Atopический статус оценивали с помощью аллергологического анамнеза, проведения кожных аллергопроб, исследования уровня общего IgE сыворотки крови. Терапию назначали в соответствии со степенью тяжести заболевания: при легкой БА суточная доза флутиказона пропионата (Фликсотид, "Glaxo SmithKline", UK) составила 500 мкг, при среднетяжелой и тяжелой — использовали препарат комби-

нированной терапии Серетид, GSK, причем суточные дозы флютиказона пропионата составили 500 мкг и 1 000 мкг соответственно. Контроль лечения проводили по критериям, описанным в GINA 2002.

Объектом исследования служили кровь и индуцированная мокрота, взятые в период обострения и после 12 нед. лечения (в период медикаментозной ремиссии). Все клинические манипуляции осуществляли на базе Областного астмацентра. Активность гена IL-5 оценивали по его продуктам (уровень IL-5) в иммуноферментном анализе (ИФА), а также путем исследования степени экспрессии мРНК гена IL-5 с использованием РТ-ПЦР в сыворотке крови и в индуцированной мокроте одновременно в одних и тех же группах пациентов.

Индуцированную мокроту получали по методике, модифицированной Popov [7]. Образцы мокроты объемом до 2 мл собирали в пластиковые контейнеры, обработанные Муколизином (раствор дитиотритиола, Центральный НИИ эпидемиологии МЗ РФ, Москва) согласно приложенной инструкции и отбирали по 200 мкл суспензии клеток на анализ. Помимо этого, в клеточной суспензии подсчитывали относительное содержание эозинофилов.

Твердофазный ИФА в сыворотке крови и индуцированной мокроте проводили с использованием стандартных наборов ("Cytelisa", США) в соответствии с рекомендациями производителей.

Тотальную РНК из 200 мкл суспензии клеток или такого же количества сыворотки крови выделяли, применяя наборы "TRIZOL" ("Gibco BRL") согласно приложенной инструкции. Затем, применяя процесс обратной транскрипции тотальной РНК, получали кДНК.

Для выполнения РТ-ПЦР IL-5 использовали праймеры: прямой — 5'-GCT TCT GCA TTT GAG TTT GCT AGC T; обратный — 3'-TGG CCG TCA ATG TAT TTC TTT ATT AAG производства "R&D Systems, Inc." в финальной концентрации 7,5 мкМ каждого праймера. ПЦР-анализ выполнялся по стандартной методике набором АмплиСенс-200-н (Центральный НИИ эпидемиологии МЗ РФ, Москва). Размер ампликона составлял 271 б.р. В качестве положительного контроля была использована синтетическая двуспиральная ДНК ("R&D Systems, Inc."), размер продукта составил 340 б.р. Полуколичественную оценку экспрессии мРНК проводили в сравнении с экспрессией гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH), относящегося к постоянно экспрессирующим генам, для которого были подобраны следующие праймеры: прямой — 5'-GGG AAG CTC ACT GGC ATG GCC TTC C-3'; обратный — 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3', степень экспрессии мРНК выражали в процентах.

Форез ПЦР-продуктов проводили на 2%-ном агарозном геле и оценивали при помощи адаптированной компьютерной программы "Biotest D".

Статистическую обработку проводили с использованием программы "Statistica 5.0". Значимость раз-

личий между сравниваемыми группами устанавливали с использованием критериев Вилкоксона и Манна-Уитни. Зависимость между отдельными показателями оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и их обсуждение

Проведен сравнительный анализ результатов измерения IL-5 в сыворотке крови и индуцированной мокроте методом ИФА и оценки экспрессии мРНК IL-5 методом РТ-ПЦР. Установлено, что клиническая интерпретация содержания общего количества IL-5 методом ИФА в сыворотке крови значительно затруднена. Несмотря на то, что выявлено превышение уровня IL-5 в сыворотке крови больных БА, по сравнению с контрольной группой, при исследовании больных БА в стадии обострения не было установлено различий в содержании этого цитокина как у пациентов с различной степенью тяжести заболевания (легкая астма — $46,6 \pm 15,0$ пкг/мл, среднетяжелая — $68,9 \pm 12,4$ пкг/мл, тяжелая — $69,9 \pm 15,1$ пкг/мл), так и у больных с различной этиологией БА (экзогенная БА — $109,3 \pm 17,4$ пкг/мл, эндогенная БА — $87,8 \pm 12,7$ пкг/мл). Вероятно, это связано с тем, что IL-5 является относительно короткоживущим цитокином (период полураспада в плазме составляет менее 30 мин) [8], поэтому не удается зафиксировать изменения содержания IL-5 в сыворотке крови при долговременном исследовании. Возможно также, что проблема заключается в самом методе ИФА, поскольку все известные наборы для проведения иммуноферментного анализа IL-5 имеют значительную погрешность. Следует заметить, что в более ранних исследованиях мы регистрировали достоверные различия этого показателя в группах больных с легкой и тяжелой астмой, но число обследованных при этом превышало 300 человек.

Комментируя результаты исследований IL-5 методом ИФА в индуцированной мокроте больных БА, можно утверждать, что оценка продукции IL-5 таким методом позволяет расширить возможности использования данного маркера для клинических рекомендаций. Так, значения IL-5 в мокроте достоверно различались в группах больных с разной тяжестью заболевания (среднетяжелая и тяжелая астма и легкая), а также в стадиях обострения и ремиссии (табл. 1) и адекватно характеризовали эффективность лечения.

В дополнение к этому оценка IL-5 в мокроте, наряду с другими клиническими маркерами воспаления, может дать ценную дополнительную информацию в ситуации "сложной астмы", поскольку, как было показано в предыдущих публикациях, отсутствие снижения этого показателя в первые 4 нед. адекватного противовоспалительного лечения является неблагоприятным прогностическим фактором в плане ответа на противоастматическую терапию [9].

Таблица 1

Уровень IL-5 в мокроте больных БА различной степени тяжести до и после лечения (пг/мл)

Группы пациентов	До лечения (обострение)	После лечения (ремиссия)
Легкая астма $n = 21$	$17,2 \pm 6,4$	$15,8 \pm 9,7$
Среднетяжелая астма $n = 15$	$54,1 \pm 11,6^{**}$	$30,2 \pm 7,5^*$
Тяжелая астма $n = 35$	$98,4 \pm 17,3^{**}$	$41,6 \pm 11,9^*$
Контроль $n = 12$	$12,8 \pm 8,3$	

Примечание: * — при сравнении показателей у больных с различной степенью тяжести; ** — при сравнении показателей у больных до и после лечения ($p < 0,05$).

В ряде работ зарубежных авторов [10, 11] в качестве дополнительной характеристики продукции IL-5 используется оценка степени экспрессии мРНК гена этого цитокина. Проведенные нами исследования уровня экспрессии мРНК IL-5 в сыворотке крови этих же больных продемонстрировали недостоверные изменения у пациентов с разной тяжестью БА и в зависимости от проведенного лечения. При этом результаты оценки экспрессии мРНК IL-5 в сыворотке крови не совпадали с клиническими доказательствами эффективности лечения, такими как повышение ПСВ, снижение бронхиальной гиперреактивности (табл. 2), а также снижение относительного содержания эозинофилов в образцах мокроты ($15,3 \pm 1,4 \% \pm 0,7 \%$; ($p < 0,05$) соответственно до и после лечения — при легкой астме; $18,6 \pm 3,4 \% \pm 2,5 \%$; ($p < 0,05$) соответственно до и после лечения — при среднетяжелой астме; $18,3 \pm 2,5 \% \pm 1,8 \%$; ($p < 0,05$) соответственно до и после лечения — при тяжелой астме).

Возможно, диссоциация клинических и иммунологических данных в настоящем случае обусловлена тем, что ген IL-5 экспрессируется различными клетками крови, и общий пул мРНК IL-5 мало коррелирует с показателями БА.

Сравнительный анализ экспрессии мРНК гена IL-5 в мокроте до и после лечения позволил установить, что этот показатель достоверно различался у больных с легкой и тяжелой формами заболевания и что активность экспрессии мРНК этого цитокина значительно снижалась в период ремиссии, по сравнению с обострением, характеризуя эффективность лечения (табл. 3).

Как и в случае с оценкой самого цитокина, экспрессия мРНК IL-5 у больных БА была достоверно выше, чем у здоровых, во всех случаях, за исключением данных, полученных при ремиссии легкой астмы.

Продемонстрирована еще одна особенность этого метода оценки экспрессии IL-5: у больных тяжелой и среднетяжелой астмой показатели экспрессии мРНК гена IL-5 в мокроте не достигали контрольных значений даже в стадии ремиссии после проведенного лечения. Колебания показателей оценки уровня IL-5 и экспрессии мРНК IL-5 в целом совпадали: установлена корреляция уровня IL-5 и степени экспрессии мРНК IL-5 в мокроте больных со среднетяжелой и тяжелой астмой [12]. Кроме того, при легкой астме в стадии обострения показана корреляция степени экспрессии мРНК IL-5 и PC_{20} ($r = -0,53$, $p = 0,002$). Отсутствие корреляций при более тяжелых вариантах БА, возможно, связано с тем, что в этом случае на клинические показатели в большей степени влияют органические изменения бронхиальной стенки (ремоделинг).

Избыточная продукция мРНК IL-5 у больных среднетяжелой и тяжелой БА различными клетками воздухоносных путей, даже в случае нормальных значений самого цитокина, показывает, что у этих больных регистрируется постоянная активность гена IL-5, и это представляет риск обострения БА, поскольку процесс трансляции белка на РНК-матрице — вероятностный и сложноконтролируемый, зависящий от большого количества факторов, воздействие которых может инициировать гиперпродукцию IL-5 в любой момент. Вероятно, наличие внутриклеточного пула мРНК гена IL-5 у больных БА может быть причиной того, что контроль над болезнью при среднетяжелой и тяжелой астме затруднен.

Таблица 2

Изменение показателей пиковой скорости выдоха и гиперреактивности при проведении терапии в процентах от персонального лучшего значения

Показатели эффективности терапии	ПСВ, %		Гиперреактивность (PC_{20})	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Легкая астма $n = 21$	$89,3 \pm 3,4$	$95,6 \pm 3,6^*$	$2,8 \pm 0,7$	$5,9 \pm 1,0^*$
Среднетяжелая астма $n = 15$	$69,7 \pm 5,3$	$86,5 \pm 7,7^*$	$2,3 \pm 0,4$	$6,7 \pm 0,9^*$
Тяжелая астма $n = 35$	$53,1 \pm 2,2$	$84,6 \pm 9,3^*$	$0,12 \pm 0,03$	$2,41 \pm 0,59^*$

Примечание: * — $p < 0,05$, по сравнению с соответствующими показателями до лечения; ПСВ — пиковая скорость выдоха.

Таблица 3

Степень экспрессии мРНК IL-5 (в %) в мокроте больных БА различной степени тяжести до и после лечения

Группы пациентов	До лечения (обострение)	После лечения (ремиссия)
Легкая астма $n = 21$	$72,8 \pm 4,6^{**}$	$25,4 \pm 6,3^*$
Среднетяжелая астма $n = 15$	$72,3 \pm 7,6^{**}$	$47,6 \pm 7,4$
Тяжелая астма $n = 35$	$152,0 \pm 8,6^{**}$	$58,0 \pm 8,7$
Контроль $n = 12$	$22,6 \pm 3,2$	

Примечание: * — при сравнении показателей у больных с различной степенью тяжести БА; ** — при сравнении показателей у больных до и после лечения ($p < 0,05$).

Заключение

Индукцированная мокрота является более адекватным объектом для исследования продукции IL-5 при БА в сравнении с периферической кровью, поскольку (и это подтвердили публикации последних лет) основные патофизиологические эффекты IL-5 реализуются в воздухоносных путях. Так, эта концепция подтверждена работами по изучению действия анти-IL-5 моноклональных антител (меполизумаб) [13]. Было показано, что при введении этого препарата пациентам с atopической БА происходит значительное уменьшение количества предшественников эозинофилов в костном мозге, не изменяется содержание CD34(+)/IL-5R(+) клеток в плазме крови, но значительно снижается их количество в мокроте. Количество зрелых эозинофилов уменьшается как в крови, так и в мокроте (в БАЛ). Можно сделать вывод, что действие IL-5 в костном мозге и в ткани бронхолегочного дерева направлено на обеспечение терминальной дифференцировки тканевых эозинофилов, их активацию, повышение жизнеспособности. Тогда как в крови, по-видимому, его функция преимущественно связана с хемотаксисом эозинофилов.

Патологические эффекты IL-5 в бронхах связаны также с воздействием на гладкие мышцы. Данные *Nakonarson H. et al* и *Rizzo C.A.* [14, 15] об IL-5-опосредованной гиперчувствительности гладких мышц бронхов могут частично объяснять развитие бронхиальной гиперреактивности при БА. В отсутствие эозинофилии клетками, которые продуцируют IL-5, могут быть эпителиальные клетки дыхательных путей, в отношении которых ранее была показана возможность конститутивно экспрессировать этот цитокин [16].

Итак, IL-5 является ключевым цитокином, эффекты которого осуществляются преимущественно в дыхательных путях и связаны с основными клиническими проявлениями БА. Как показали наши исследо-

вания, определение уровня IL-5 в индуцированной мокроте больных, являясь неинвазивным методом обследования, предоставляет ценную информацию об активности воспаления (тяжесть БА, периоды обострения-ремиссии) и эффективности проведенного лечения. Оценка экспрессии гена IL-5 в индуцированной мокроте путем исследования мРНК IL-5 методом РТ-ПЦР позволяет охарактеризовать молекулярные механизмы, определяющие развитие особых фенотипов болезни (тяжелая БА) и ее неконтролируемое течение. Новые знания в области молекулярной генетики воспаления при БА сегодня довольно активно используются при разработке новых поколений лекарственных препаратов и формировании предикторов, характеризующих риск неблагоприятного течения БА. Как показали результаты данного исследования, степень экспрессии гена IL-5 (мРНК IL-5) надежно коррелирует с клиническими показателями и является более информативным методом оценки БА в отношении конкретного пациента в сравнении с иммуноферментным анализом. В целом результаты оценки уровня IL-5 и исследования экспрессии мРНК этого цитокина взаимно дополняют друг друга, и такое комплексное исследование могло бы быть рекомендовано для оценки эффективности проводимой терапии, тяжести астмы, а также для исследования молекулярных механизмов неблагоприятных фенотипов болезни, включая тяжелые неконтролируемые формы БА.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bochner B.S., Undem B.J., Lichtenstein L.M.* Immunological aspects of allergic asthma. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12: 295-335.
2. *Kay A.B., Menzies-Gow A.* Eosinophils and interleukin-5: the debate continues. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167 (12): 1586-1587.
3. *Ogawa K., Hashida R., Miyagawa M. et al.* Analysis of gene expression in peripheral blood eosinophils from patients with atopic dermatitis and in vitro cytokine-stimulated blood eosinophils. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; 131 (3): 436-445.
4. *Huston D.P.* Interleukin-5: a therapeutic target in asthma. *Int. J. Immunorehabil.* 1997; 7: 7-45.
5. *Freidin M.B., Kobyakova O.S., Ogorodova L.M., Puzyrev V.P.* Association of polymorphisms in the human IL-4 and IL-5 genes with atopic bronchial asthma and severity of the disease. *Comp. Funct. Genom.* 2003; 4: 346-350.
6. Global initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention, 2002 // www.ginasthma.com.
7. *Popov T.A., Pizzichini M.M., Pizzichini E. et al.* Some technical factors influencing the induction sputum for cells analysis. *Clin. Exp. Allergy.* 1995; 8: 559-565.
8. *Corrigan C.J.* Cytokines (interleukines). In: *Kay A.B., ed. Allergy and allergic diseases.* Oxford: Blackwell Science; 1997; vol.1: 35-41.
9. *Ogorodova L.M., Kobyakova O.S., Петровский Ф.И. и др.* Многоцентровое исследование сравнительной эффективности режимов комбинированной терапии у пациентов с тяжелой неконтролируемой бронхиальной астмой. *Качеств. клин. практика* 2002; 2: 18-26.
10. *Humbert M., Corrigan C.J., Kimmitt P. et al.* Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA expression and disease severity in atopic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 156 (3): 704-708.

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.