

Strokovni prispevek/Professional article

## POVEZAVA NEKATERIH POLIMORFIZMOV V GENIH ZA IL4, NOD2 IN CCR5 Z ASTMO PRI OTROCIH

ASSOCIATION OF SOME POLYMORPHISMS IN IL4, NOD2 AND CCR5 GENES  
WITH CHILDHOOD ASTHMA

Vojko Berce,<sup>1</sup> Uroš Potočnik,<sup>2</sup> Katja Repnik<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Otroški oddelek, Splošna bolnišnica Murska Sobota, Ulica prim. Vrbnjaka 6 Rakičan,  
9000 Murska Sobota

<sup>2</sup> Center za humano genetiko in farmakogenomiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru,  
Slomškov trg 15, 2000 Maribor

---

### Izvleček

- Izhodišča** *Astma je najpogostejša resna kronična bolezen otrok. Pri astmi gre za vnetje v dihalih neznanе etiologije. Kot pri večini kompleksnih boleznih so tudi pri patogenezi astme udeleženi genetski dejavniki in okolje. Z astmo povezujejo več kot 100 kandidatnih genov, vendar je prispevek vsakega od njih v patogenezi astme verjetno majhen.*
- Metode** *V našo genetsko študijo smo vključili 111 otrok z blago ali zmerno vztrajajočo astmo, starih od 5 do 18 let. 76 otrok je imelo atopijsko astmo in 35 neatopijsko. Pri bolnikih smo izmerili osnovne klinične in laboratorijske parametre. V kontrolni skupini je bilo 77 zdravih otrok. Opravili smo genotipizacijo za polimorfizme CCR5-delta32, IL4 C-33T in NOD2 R702W. S pomočjo testa  $\chi^2$  in Fischerjevega eksaktnega testa smo primerjali alelne frekvence med skupinami. S t-testom za dva neodvisna vzorca pa smo ugotavljali vpliv genotipa na nekatere klinične in laboratorijske parametre.*
- Rezultati** *Bolniki z neatopijsko astmo so imeli značilno nižjo (1,39 %) frekvenco alela delta32 v genu za CCR5, kot je v kontrolni skupini (10 %),  $p = 0,016$ . Pri ostalih dveh polimorfizmih pa ni bilo statistično značilnih razlik v pogostosti alelov med bolniki in kontrolami. Pri nobenem od testiranih polimorfizmov pa nismo ugotovili vpliva genotipa na klinične in laboratorijske parametre.*
- Zaključki** *Mutacija delta32 v genu za CCR5 ščiti pred neatopijsko astmo. Polimorfizma C-33T v genu za IL4 in R702W v genu za NOD2 pa ne vplivata na pogostost astme. Pri nobenem od testiranih polimorfizmov ne ugotavljamo povezave s kliničnimi ali laboratorijskimi parametri. Rezultati naše študije omogočajo nova spoznanja v patogenezi astme in prispevajo pri razvoju novih strategij obravnave astme.*

**Ključne besede** *otroška astma; genetika; polimorfizmi; patogeneza*

---

### Abstract

- Background** *Asthma is most common serious chronic disease of childhood. Asthma is inflammatory disease of respiratory tract of unknown etiology. As is usual in most complex diseases, also in asthma genetic and environmental factors participate together. More than 100 candidate genes are connected with asthma for now, but each of them has only small contribution in the pathogenesis of the disease.*

---

### Avtor za dopisovanje / Corresponding author:

Vojko Berce, dr. med., spec. pediater, Otroški oddelek, Splošna bolnišnica Murska Sobota, Ulica prim. Vrbnjaka 6 Rakičan, 9000 Murska Sobota

---

Methods	<i>We included 111 children with mild or moderate persistent asthma, aged between 5 and 18 years. 76 of them were atopics and 35 had nonatopic asthma. We measured some basic clinical and laboratory parameters. Data from 77 healthy children served as a control group. We genotyped polymorphisms CCR5-delta32, IL4 C-33T and NOD2 R702W. We compared allelic frequencies between groups with <math>\chi^2</math> and Fischer's exact test. With t test for two independent samples we studied influence of genotype on clinical and laboratory parameters.</i>
Results	<i>Patients with nonatopic asthma had significantly lower frequency of CCR5-delta32 allele (1.39%), compared with control group (10%), <math>p = 0.016</math>. In other two tested polymorphisms we didn't find any significant differences in allelic frequencies between asthmatics and controls. We revealed no influence of genotype on clinical and laboratory parameters.</i>
Conclusions	<i>Delta32 mutation in CCR5 gene protects against nonatopic asthma. Polymorphisms C-33T in IL4 gene and R702W in NOD2 gene are not associated with asthma. We didn't detect any influence of tested polymorphisms on clinical and laboratory parameters. Results of our study offer new insights into asthma pathogenesis and could contribute in the development of new strategies of asthma management.</i>
<b>Key words</b>	<i>childhood asthma; genetics; polymorphisms; pathogenesis</i>

## Uvod

Astma je najpogostejša kronična bolezen dihal pri otrocih. Pojavlja se pri več kot 10 % otrok do 18. leta.<sup>1</sup> Astma je kronična vnetna bolezen dihalnih poti. Pri astmatičnem vnetju imajo pomembno vlogo predvsem mastociti, eozinofilci in limfociti T. Vnetje v dihalnih poteh povzroča tudi preodzivnost dihal na različne dražljaje oziroma sprožilce.<sup>2,3</sup>

Že v 19. stoletju so domnevali, da sta astma in atopija tudi genetsko pogojeni. Na študijah skladnosti pri enojajčnih dvojčkih so ugotavljali 70-odstotno skladnost za atopijo in 30- do 40-odstotno skladnost za astmo.<sup>4</sup> Vpliv dednosti je večji pri otroški astmi. Pomemben del etiopatogeneze astme in atopije pa lahko pripišemo vplivom okolja. Tudi hiter porast incidence atopijskih bolezní ne more biti posledica genetskih dejavnikov, temveč predvsem sprememb v človekovem okolju. Aktualna higienska hipoteza predvideva, da je vzrok porasta atopijskih bolezní v socialnoekonomskih spremembah okolja, zaradi katerih je manjša izpostavljenost parazitom in nekaterim mikrobov.<sup>5,6</sup> Nekateri nalezljive bolezní v zgodnjem otroštvu spodbujajo razvoj imunske tolerance preko stimulacije regulacijskih celic Th3 in Tr1, ki zavirajo imunski odziv Th2.<sup>7</sup>

Polimorfizmi posameznega nukleotida (single nucleotide polymorphism – SNP) so tista mesta v človekovem genomu, kjer se posamezniki razlikujemo med sabo. V genetiki jih uporabljamo kot označevalce za genetsko analizo. Nekateri polimorfizmi lahko tudi spremenijo izražanje ali produkt posameznega gena. Z analizo genske vezave, asociacijskimi študijami in študijami ekspresije so doslej identificirali več kot 100 kandidatnih genov za astmo. Pomembni kandidatni geni za astmo se nahajajo na lokusih 2q33, 5q23-32, 6p24-21, 11q21-13, 12q24-12 in 13q14-12. Pri astmi gre torej za poligeno bolezen.<sup>8</sup>

Rezultati asociacijskih študij in s tem kandidatni geni se med populacijami močno razlikujejo. Največ kan-

Razpr.1. Najpomembnejši genetski lokusi in potencialni kandidatni geni za astmo.

Table 1. Most relevant genetic loci and candidate genes for asthma.

Genetski lokus Genetic locus	Gen Gene	Protein Protein
5q31-q33	IL4	Interlevkin 4 Interleukin 4
	IL5	Interlevkin 5 Interleukin 5
	IL9	Interlevkin 9 Interleukin 9
	IL12B	Interlevkin 12B Interleukin 12B
	IL13	Interlevkin 13 Interleukin 13
	CSF2	Stimulacijski dejavnik za kolonije granulocitov in makrofagov Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)
16p12.1	ADRB2	Beta2 adrenergični receptor Beta2 adrenergic receptor
	GCCR	Glukokortikoidni receptor Glucocorticoid receptor
	IL4RA	Skupna podenota receptorja za interlevkin 4 in interlevkin 13 Common subunit of interleukin 4 and interleukin 13 receptor
6p21.3	TNF	Faktor tumorske nekroze Tumor necrosis factor
12q13-24	NOS1	Sintaza dušikovega oksida Nitric oxide synthase
17q11-21	CCL11	Eotaksin 1 Eotaxin1
	CCL24	Eotaksin 2 Eotaxin 2
Xq28	IL9R	Receptor za interlevkin 9 Interleukin 9 receptor
11q13	FCER1B	Visokoafinitetni receptor za IgE High affinity IgE receptor
	CC16	Sekretorni protein Clara celic Clara cell secretory protein
20p13	ADAM33	Disintegrin in metaloproteinaza – domena 33 A disintegrin and metalloproteinase domain 33
4q13-q21	MUC7	Mucin sline Salivary mucin

didatnih genov se nahaja na petem kromosomu, na lokusih, ki kodirajo pomembne citokine (interlevkine) alergijskega vnetja. Pomembni so tudi lokusi na šestem kromosomu, kjer se nahajajo geni glavnega histokompatibilnostnega kompleksa MHC. Ta kodira beljakovine HLA, ki so udeležene v korenu patogeneze alergijskega vnetja, in sicer pri predstavitvi in prepoznavanju antigenov. Tudi razlike v odgovoru na zdravljenje astme so močno genetsko pogojene in povezane s polimorfizmi v genih za receptorje za zdravila – to velja predvsem za adrenergični receptor beta2.<sup>9,10</sup>

Hiperreaktivnost dihal, ki je ena izmed glavnih značilnosti astme, ni samo posledica vnetja. Ugotavljajo, da se nagnjenost k hiperreaktivnosti deduje v povezavi z geni za citokine profila Th2 in geni, ki so vpleteni v uravnavanje sinteze IgE na lokusu 5q31-q33. V tem področju so geni, ki kodirajo t. i. »proalergične« citokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-12B, IL-13 in GM-CSF. Označevalci s statistično značilno povezanostjo z astmo se nahajajo predvsem v genih za IL-4 in IL-9. Isti označevalci so povezani tudi s povečano tvorbo IgE protiteles, kar ne čudi, ker je predvsem IL-4 ključen pri preklopu sinteze imunoglobulinov v razred IgE.<sup>11,12</sup> Na lokusu 5q31-q33 se nahajata tudi gena za adrenergični receptor  $\beta_2$  ( $\beta_2$ -AR) in za receptor za glukokortikoid (GR). Polimorfizmi v genu  $\beta_2$ -AR so povezani s stopnjo astme in z vplivom dolgotrajne rabe agonistov  $\beta_2$  na astmo.<sup>13,14</sup> Alternativno izrezovanje gena GR pa določa odgovor na protivnetno zdravljenje.<sup>15</sup> Več študij ugotavlja povezavo med astmo/atopijo, povečano tvorbo IgE in polimorfizmi v genu za IL4R $\alpha$  (IL4RA na lokusu 16p12.1). IL4R $\alpha$  je skupna podenota receptorjev za interlevkina IL-4 in IL-13.<sup>16</sup> Z astmo so povezani tudi nekateri polimorfizmi v genu za TNF, ki spada med antigene HLA III in vpliva na aktiviranje adhezijskih molekul ter migracijo levkocitov (predvsem bazofilcev) v področje vnetja pri astmi.<sup>17</sup> Podobna povezava z astmo je ugotovljena tudi za polimorfizme gena za nedavno odkrit antigen HLA-G. Uvrščajo ga med antigene HLA I, izraža pa se tudi na makrofagih in dendritičnih celicah.<sup>18</sup>

Genski lokusi, povezani z astmo, so še:

- na 12. kromosomu (lokus 12q13-24) blizu gena za NOS1 (sintetaza dušikovega monoksida) ter gena za interferon gama;
- na 17. kromosomu (lokus 17q11-21) v genih za eotaxin 1 in eotaxin 2 (kemokina udeležena v aktiviranju eozinofilcev);
- v psevdosomni regiji kromosoma x (lokus Xq28) v genu za receptor za IL-9 (IL-9 izločajo celice Th in spodbuja sintezo eotaxina v gladkih mišicah dihalnih poti);
- na 11. kromosomu (lokus 11q13) v genu za  $\beta$ -verigo visokoafinitetnega receptorja za IgE – Fc $\epsilon$ R1- $\beta$ ;
- na 20. kromosomu (lokus 20p13) v genu za membransko metaloproteazo ADAM 33;
- na 11. kromosomu (lokus 11q13) v genu za sekretijski protein celic Clara CC16;
- na 4. kromosomu (lokus 4q13-q21) v genu za mucin slin MUC 7.<sup>19-25</sup>

Razpredelnica 1 podaja pregled lokusov, ki v študijah kažejo povezanost z astmo in kandidatnih genov, ki

se nahajajo na teh lokusih. Pregled vseh asociacijskih študij, ki se nahajajo v zbirki Genetic association database (<http://geneticassociationdb.nih.gov/>) za najbolj preučevane kandidatne gene za astmo, pa je prikazan v Razpredelnici 2.

## Razpr. 2. Pregled asociacijskih študij za najpogostejše kandidatne gene za astmo.

Table 2. Overview of the association studies for most common asthma candidate genes.

Gen	Protein	Število potrdilnih študij Number of positive studies	Število negativnih študij Number of negative studies
Gene	Protein		
ADRB2	Beta2 adrenergični receptor Beta2 adrenergic receptor	14	9
GSTM1	Glutation S transferaza MU-1 Glutathione S transferase MU-1	11	2
GSTP1	Glutation S transferaza P1 Glutathione S transferase P1	10	4
IL4R	Receptor za interlevkin 4 Interleukin 4 receptor	9	3
ADAM33	Disintegrin in metaloproteaza-33 Disintegrin and metalloprotease-33	8	2
GSTT1	Glutation S transferaza – theta1 Glutathione S transferase – theta1	8	2
IL4	Interlevkin 4 Interleukin 4	8	7
TNF	Faktor tumorske nekroze alfa Tumor necrosis factor alpha	8	7
CD14	Antigen diferenciacije monocitov Monocyte differentiation antigen	7	5
IL13	Interlevkin 13 Interleukin 13	7	3
LTC4S	Levkotrienska C4 sintaza Leukotriene C4 synthase	6	3
CCL5	Kemokin ligand 5 – RANTES Chemokine ligand 5 – RANTES	5	3
HLA DRB1	Humani levkocitni antigen DRB1 Human leukocyte antigen DRB1	5	1
HLA DQA1	Humani levkocitni antigen DQA1 Human leukocyte antigen DQA1	4	0
HLA DQB1	Humani levkocitni antigen DQB1 Human leukocyte antigen DQB1	4	2
IFNG	Interferon gama Interferon gamma	4	0
LTA	Limfotoksin alfa Lymphotoxin alpha	4	4
NAT2	N-acetil transferaza 2 N-acetyltransferase 2	4	0
TGFB1	Faktor transformacije rasti beta1 Transforming growth factor beta1	4	2

V naši raziskavi smo želeli preveriti povezavo nekaterih kandidatnih genov z astmo pri populaciji slovenskih otrok. Gen za IL-4 je že poznan kot kandidatni gen za astmo, vendar so si rezultati asociacijskih študij precej nasprotujoči.<sup>26</sup> V študiji smo analizirali še dva nova potencialna kandidatna gena. Gen CCR5 kodira receptor za kemokine ter nekatere viruse, ki se nahaja na Th1 celicah.<sup>27,28</sup> Gen NOD2 kodira intracelularni receptor za bakterijske produkte v monocitih in je pomemben kandidatni gen za Chronovo bolezen, njegova morebitna vloga pri astmi pa še ni bila

preverjena.<sup>29</sup> Te tri gene smo izbrali tudi zato, ker bi glede na svojo funkcijo lahko bili povezani samo z določenim fenotipom astme. Gen za IL-4 sodeluje v Th2 posredovanem imunskem odzivu in bi zato lahko bil kandidatni gen predvsem za atopijsko astmo. Gena CCR5 in NOD2 pa sodelujeta pri vnetnem odzivu na viruse (CCR5) in bakterije (NOD2), zato bi lahko bila kandidatna gena predvsem za neatopijsko astmo. V raziskavi tako nameravamo tudi opredeliti nekatere razlike med atopijsko in neatopijsko astmo na ravni genoma in s tem posredno tudi na razlike v patogenezi obeh osnovnih fenotipov astme. Pričakujemo, da se bodo frekvence posameznih genotipov in alelov za preučevane gene med skupino otrok z astmo oz. posameznimi fenotipi astme in zdravimi otroci statistično značilno razlikovale. Prav tako pričakujemo statistično značilne razlike v opazovanih kliničnih in laboratorijskih parametrih med samimi astmatiki z različnim genotipom.

## Preiskovanci, material in metode

V raziskavo smo vključili 75 otrok z atopijsko astmo in 36 otrok z neatopijsko astmo. Vključili smo vse otroke, stare od 5 do 18 let, z blago in zmerno vztrajajočo astmo, ki so se od začetka študije (1.1. 2007) zdravili v pulmološki ambulanti otroškega oddelka Splošne bolnišnice Murska Sobota. Vsem otrokom smo diagnozo astme postavili v skladu z merili ATS (American Thoracic Society).<sup>30</sup> Izključili smo vse otroke s kroničnimi vnetnimi boleznimi, razen astme in atopijskih bolezni. Otroci, starejši od 15 let, so podpisali privoljenje za sodelovanje v študiji. Za mlajše otroke so privoljenje podpisali njihovi starši. Kot kontrolno skupino smo uporabili krvne vzorce 77 oseb brez astme, alergije, bolezni dihal ali drugih kroničnih vnetnih bolezni. Študijo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko.

Vsem preiskovancem smo opravili kožno testiranje alergije z vbodno metodo (Allergopharma) na 13 najpogostejših inhalacijskih alergenov. V krvi smo določili vrednost specifičnih in celokupnih imunoglobulinov razreda E - IgE (CAP-RAST Pharmacia&Upjohn, Freiburg, Nemčija). Bolnike smo opredelili kot atopike, če so imeli premer urtike na kožnem testu vsaj 3 mm ali vrednost specifičnih IgE večjo od 0,35 kU/l za vsaj enega od testiranih alergenov.

Pljučno funkcijo smo izmerili s spirometrom Vitalograph 2150 (Compact, Buckingham, Velika Britanija) brez uporabe bronhodilatatorja. Zabeležili smo forsirano vitalno kapaciteto (FVC) in volumen v prvi sekundi forsiranega izdiha (FEV1). Izračunali smo tudi razmerje FEV1/FVC. Za namen statistične analize smo vrednost FEV1 izrazili kot odstotek predvidene glede na starost, spol in višino.

Hiperreaktivnost dihal smo ugotavljali z bronhoprovokacijskim testom z metaholinom. Test smo izvajali v skladu s smernicami ATS in ERS.<sup>31</sup> Izračunali smo kumulativni odmerek metaholina (PD<sub>20</sub>), pri katerem FEV1 pade za 20 % glede na izhodišče. Ker spremenljivka PD<sub>20</sub> v populaciji ni normalno porazdeljena, smo za statistično analizo uporabili njen desetiški logaritem (logPD<sub>20</sub>).

Večini bolnikov smo izmerili tudi vrednost dušikovega oksida v izdihanem zraku (F<sub>E</sub>NO) s pomočjo analizatorja Niox (Aerocrine, Inc. USA) po smernicah ATS/ERS.<sup>32</sup>

Vsem preiskovancem smo odvzeli 12 ml periferne venske krvi za genetsko analizo, štetje eozinofilcev v krvi ter določitev celokupnih in specifičnih IgE. Genetsko analizo smo opravili na Centru za humano genetiko in farmakogenomiko Medicinske fakultete Univerze v Mariboru.

Iz krvi bolnikov in kontrol smo osamili celokupno genomsko DNK. Najprej smo s pomočjo Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) osamili limfocite. Z reagentom TRI (Sigma) smo osamili DNK in jo raztopili v vodi v končni koncentraciji 50 µg/ml. Genotipizacijo smo izvedli s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (Polymerase chain reaction - PCR) in s pomočjo metode polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP). Analizirali smo polimorfizma IL4 C-33T v genu za interleukin 4 in NOD2 R702W v genu, ki kodira protein za aktiviranje kaspaze ter gen za CCR5 (receptor za kemokin 5 oz. RANTES) glede prisotnosti delecije 32 baznih parov mutacije CCR5delta32.

Statistično analizo smo opravili s programom SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). S testom  $\chi^2$  in Fischerjevim eksaktnim testom smo izračunali razlike med frekvencami alelov in genotipov pri astmatikih in kontrolah ter njihovo značilnost. Vpliv genotipa na posamezne klinične in laboratorijske parametre, ki imajo naravno numerične spremenljivke (število eozinofilcev, logPD<sub>20</sub>, vrednost celokupnih IgE, FENO), smo izračunali s pomočjo t-testa za dva neodvisna vzorca.

## Rezultati

Genotipizirali smo 75 otrok z atopijsko astmo, 36 otrok z neatopijsko astmo in 77 zdravih kontrol. Povprečna starost otrok z atopijsko astmo je bila 11,1 leta (SD 3,24), z neatopijsko astmo pa 9,78 leta (SD 3,23). Pri atopijski astmi je bilo 59 % moških (n = 44) in 41 % žensk (n = 31). Pri neatopijski astmi pa je bilo moških in žensk po 50 % (n = 18). Rezultati kliničnih in laboratorijskih meritev so prikazani v Razpredelnicah 3 in 4.

V genu za CCR5 je bila alelna frekvenca mutacije delta32 pri neatopijski astmi 1,39 %, kar je značilno manj kot pri zdravih kontrolah, kjer znaša 10 % (p = 0,016, razmerje obetov OR = 0,139 z 95-odstotnim intervalom zaupanja - CI 0,02 do 0,983). Ni pa bilo nobene razlike med kontrolno skupino in bolniki z atopijsko astmo, kjer alelna frekvenca delta32 mutacije prav tako znaša 10 % (p = 1,00). Pri obeh skupinah astmatikov skupaj pa znaša alelna frekvenca mutacije delta32 7,2 %, kar ni značilno različno kot pri kontrolah (p = 0,21, OR 0,721, 95-odstotni CI 0,429 do 1,212). S t-testom nismo odkrili značilnega vpliva CCR5 genotipa na klinične in laboratorijske parametre.

V genu za interleukin 4 smo analizirali polimorfizem IL4 C-33T. Pri bolnikih z neatopijsko astmo je frekvenca T alela 26 %, pri zdravih kontrolah pa 23,3 %, razlika ni značilna (p = 0,70, OR = 0,87, 95-odstotni CI od 0,43 do 1,78). Pri bolnikih z atopijsko astmo je frekvenca T alela 21,2 %, kar prav tako ni signifikantno

### Razpr. 3. Klinični in laboratorijski parametri pri bolnikih z atopijsko astmo.

Table 3. *Clinical and laboratory parameters in atopic asthmatics.*

Parameter	Število	Minimum	Maksimum	Aritmetična sredina	Standardna deviacija
Parameter	Number	Minimum	Maximum	Arithmetic mean	Standard deviation
FEV1 %	75	45	113	81,85	13,13
PD <sub>20</sub> (mg)	75	0,02	4,00	0,96	1,25
logPD <sub>20</sub>	75	-1,70	0,60	-0,42	0,66
F <sub>ENO</sub> (ppb)	50	6	119	52,04	31,43
Celokupni IgE (IU/ml)	75	11	3735	642,69	721,42
Total IgE (IU/ml)	75	11	3735	642,69	721,42
Eozinofilci/mm <sup>3</sup>	75	40	1520	555,96	347,18
Eosinophils/mm <sup>3</sup>	75	40	1520	555,96	347,18

### Razpr. 4. Klinični in laboratorijski parametri pri bolnikih z neatopijsko astmo.

Table 4. *Clinical and laboratory parameters in non-atopic asthmatics.*

Parameter	Število	Minimum	Maksimum	Aritmetična sredina	Standardna deviacija
Parameter	Number	Minimum	Maximum	Arithmetic mean	Standard deviation
FEV1 %	36	54	106	81,81	13,97
PD <sub>20</sub> (mg)	36	0,02	4,00	1,47	1,47
logPD <sub>20</sub>	36	-1,70	0,60	-0,12	0,56
F <sub>ENO</sub> (ppb)	21	5	78	18,24	16,48
Celokupni IgE (IU/ml)	36	2	715	222,59	228,03
Total IgE (IU/ml)	36	2	715	222,59	228,03
Eozinofilci/mm <sup>3</sup>	36	56	1151	446,09	309,81
Eosinophils/mm <sup>3</sup>	36	56	1151	446,09	309,81

različno od kontrol ( $p = 0,66$ , OR = 1,13, 95-odstotni CI = 0,66 do 1,92). Tudi pri vseh astmatikih skupaj je frekvenca alela T (22,4 %) neznačilno različna kot pri kontrolah ( $p = 0,84$ , OR = 1,05, 95-odstotni CI = 0,64 do 1,72). S t-testom nismo ugotovili vpliva genotipa na klinične in laboratorijske parametre.

V genu za NOD2 smo analizirali polimorfizem NOD2 R702W. Pri bolnikih z neatopijsko astmo nismo imeli nobenega bolnika z alelom minor (T). Ker pa je tudi med zdravimi frekvenca alela T nizka (1,7 %), je ta razlika neznačilna ( $p = 1,00$ ). Pri bolnikih z atopijsko astmo je frekvenca T alela 4,5 %, kar tudi ni značilno različno kot pri kontrolah ( $p = 0,27$ , OR = 0,37, 95-odstotni CI = 0,08 do 1,57). Pri vseh astmatikih skupaj je frekvenca alela T 3,6 %, kar ni značilno različno od kontrol ( $p = 0,30$ , OR = 0,46, 95-odstotni CI = 0,11 do 1,96). S t-testom tudi tukaj nismo ugotovili vpliva genotipa na klinične in laboratorijske parametre. Alelne frekvence za posamezne analizirane polimorfizme so prikazane v Razpredelnici 5.

## Razpravljanje in zaključki

V rezultatih naših genetskih študij smo dokazali nižjo frekvenco alela CCR5-delta32 pri neatopijski astmi. Gen CCR5 je udeležen kot koreceptor pri okužbi celic z virusom HIV.<sup>33</sup> Obstajajo pa tudi podatki o njegovi vlogi pri okužbi z drugimi, predvsem respiratornimi virusi in okužbi z Mikoplazmo pnevmonije.<sup>34,35</sup> Mutacija delta32 v genu za CCR5 povzroči izgubo funkcije receptorja in dokazano ščiti pred okužbo s HIV in verjetno tudi pred okužbo z nekaterimi drugimi virusi. Nekateri od teh virusov so verjetno tudi udeleženi v patogenezi astme. Predvsem to velja za neatopijsko astmo.<sup>36</sup> CCR5 se nahaja samo na limfocitih razreda Th1 in sodeluje v posredovanem imunskem odgovoru Th1.<sup>37</sup> Izguba funkcije receptorja zaradi mutacije delta32 nagne vnetni odgovor na stran Th2. Zato mutacija delta32 ne ščiti pred atopijskimi boleznimi. Tudi druge asociacijske študije ugotavljajo vlogo mutacije delta32 predvsem pri otroški astmi, kjer so pogosti sprožilci virusne okužbe in je delež atopikov nekoliko manjši kot kasneje v odraslem obdobju.<sup>38</sup>

Pri polimorfizmu IL4 C-33T v genu za interleukin 4 nismo ugotovili povezave z astmo. Interleukin 4 je citokin, ki ga izločajo limfociti Th2 in igra ključno vlogo v uravnavanju tvorbe imunoglobulinov razreda E. IL4 spodbuja proliferacijo limfocitov B, preklopa sintezo od IgM v IgE in tudi diferenciacijo limfocitov T v smeri Th2. Zato igra IL4 ključno vlogo pri patogenezi alergijskega vnetja.<sup>11,39</sup> Nekateri študije ugotavljajo povezavo polimorfizmov v genu za IL4 s povečano tvorbo IgE in s tem potencialno tudi nagnjenost k atopiji in astmi. Vendar si rezultati študij pri različnih etničnih skupinah nasprotujejo.<sup>40</sup> Povezave z astmo so ugotavljali predvsem za polimorfizme, ki se nahajajo v promotorju gena za IL4. V tem področju se nahaja tudi polimorfizem C-33T. Tovrstni funkcijski polimorfizmi so blizu mest vezave transkripcijskih dejavnikov in so lahko vpleteni v uravnavanje ekspresije gena.<sup>41,42</sup> Rezultati naše študije kažejo, da v populaciji slovenskih otrok polimorfizem C-33T ne igra pomembnejše vloge pri astmi. Morda je omenjeni polimorfizem tudi pri drugih populacijah (kjer je bila ugotovljena povezava z astmo) samo v neravnotežju vezave z drugimi, dejansko pomembnejšimi funkcijskimi polimorfizmi. Menimo, da je tudi pri naši populaciji potrebno analizirati še nekatere druge polimorfizme v genu za IL4, kot npr. polimorfizem C-590T v promotorju tega gena.

Gen NOD2 kodira znotrajcelični receptor za bakterijske produkte v monocitih, ki aktivira nuklearni faktor Kappa B (NFkB) – pomemben element signalne transdukcije številnih citokinov profila Th2.<sup>43</sup> Polimor-

### Razpr. 5. Alelne frekvence in statistična značilnost analiziranih polimorfizmov.

Table 5. *Allelic frequencies and statistical significance of analysed polymorphisms.*

Polimorfizem Polymorphism	Atopijska astma Atopic asthma	Neatopijska astma Nonatopic asthma	Astma skupaj Asthma together	Kontrole Controls
CCR5(delta32)	10 % ( $p = 1,00$ )*	1,4 % ( $p = 0,016$ )	7,2 % ( $p = 0,21$ )	10 %
IL4C-33T (T)	21,2 % ( $p = 0,66$ )	26 % ( $p = 0,70$ )	22,4 % ( $p = 0,84$ )	23,3 %
NOD2 R702W (T)	4,5 % ( $p = 0,27$ )	0 % ( $p = 1,00$ )	3,6 % ( $p = 0,30$ )	1,7 %

\* Vse vrednosti p v razpredelnici so izračunane iz primerjave frekvenc posamezne preiskovane skupine s kontrolami.

\* All p values in the table are computed from cross tabulation of frequencies between particular group of patients and controls.

fizem R702W je pomemben kandidatni gen za Chronovo bolezen.<sup>44</sup> Alel, ki je povezan s Chronovo boleznijo, negativno vpliva na delovanje receptorja in s tem prepreči prepoznavanje peptidoglikanov bakterijske stene.<sup>45</sup> Ker je način prepoznavanja in odgovora na mikrobo vpleten tudi v patogenezo astme, ki je prav tako kot Chronova bolezen kronična vnetna bolezen neznan etiologije, bi bilo možno najti tudi povezavo polimorfizma R702W z astmo. V naši študiji je frekvenca minor alela polimorfizma NOD2 R702W zelo majhna tako pri astmatikih kot tudi pri zdravih kontrolah. Zato tudi precejšnje razlike v frekvencah med skupinami v naši študiji niso bile statistično značilne. Kandidatni geni za astmo in rezultati asociacijskih študij se močno razlikujejo tako med populacijami kot tudi pri različnih fenotipih astme. Zato lahko domnevamo, da pri astmi ne gre za enotno bolezen. Tovrstna spoznanja nam s pomočjo genetike in farmakogenomike pomagajo do podrobnejšega razumevanja etiopatogeneze astme, odkrivanja novih molekularnih tarč in ukrojevanja zdravljenja po meri posameznika. Vse to pa zagotovo vodi do novih strategij na področju preprečevanja in zdravljenja astme.

## Literatura

- Castro M, Smith TF, Strunk RC. Pathophysiology. In: Murphy S, Kelly HW, eds. Pediatric asthma. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1999. p. 71-115.
- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma-from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1720-45.
- Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344: 350-62.
- Hanson B, McGue M, Roitman-Johnson B, Segal NL, Bouchard TJ, Blumenthal MN. Atopic disease and IgE in twins reared apart and together. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 873-9.
- Koepfen-Schomerus G, Stevenson J, Plomin R. Genes and environment in asthma: a study of 4-year-old twins. *Arch Dis Child* 2001; 85: 398-400.
- Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997; 275: 77-9.
- Martinez FD. Development of wheezing disorders and asthma in preschool children. *Pediatrics* 2002; 109: 362-7.
- Hoffjan S, Ober C. Present status on the genetic studies of asthma. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 709-17.
- Zhang J, Paré PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics. *Respir Res* 2008; 9: 4.
- Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun* 2006; 7: 95-100.
- Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, et al. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994; 264: 1152-6.
- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Maki T, Miyamoto T, et al. Evidence for linkage between asthma/atopy in childhood and chromosome 5q31-q33 in a Japanese population. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 156: 1390-3.
- Ramsay CE, Hayden CM, Tiller KJ, Burton PR, Goldblatt J, Lesouef PN. Polymorphisms in the beta2-adrenoreceptor gene are associated with decreased airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1195-203.
- Israel E, Chinchilli VM, Ford JG, Boushey HA, Cherniack R, Craig TJ, et al. Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial. *Lancet* 2004; 364: 1505-12.
- Leung DYM, Hamid Q, Vottero A, Szefer SJ, Surs W, Minshall E, et al. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med* 1997; 186: 1567-74.
- Howard TD, Koppelman GH, Xu J, Zheng SL, Postma DS, Meyers DA, et al. Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 230-6.
- Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, Hopkins PJ, Hall JM. Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNF-alpha-308 and risk of asthma. *Europ J Hum Genet* 2002; 10: 82-5.
- Nicolae D, Cox NJ, Lester LA, Schneider D, Tan Z, Billstrand C, et al. Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 349-57.
- Raby BA, Silverman EK, Lazarus R, Lange C, Kwiatkowski DJ, Weiss ST. Chromosome 12q harbors multiple genetic loci related to asthma and asthma-related phenotypes. *Hum Molec Genet* 2003; 12: 1973-9.
- Shin HD, Kim LH, Park BL, Jung JH, Kim JY, Chung IY, et al. Association of eotaxin gene family with asthma and serum total IgE. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1279-85.
- Holroyd KJ, Martinati LC, Trabetti E, Scherpbier T, Eleff SM, Boner AL, et al. Asthma and bronchial hyperresponsiveness linked to the XY long arm pseudoautosomal region. *Genomics* 1998; 52: 233-5.
- Green SL, Gaillard MC, Song E, Dewar JB, Halkas A. Polymorphisms of the beta chain of the high-affinity immunoglobulin E receptor (FcεRI-β) in South African black and white asthmatic and nonasthmatic individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1487-92.
- Van Eerdedewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002; 418: 426-30.
- Laing IA, Goldblatt J, Eber E, Hayden CM, Rye PJ, Gibson NA, et al. A polymorphism of the CC16 gene is associated with an increased risk of asthma. *J Med Genet* 1998; 35: 463-7.
- Kirkbridg HJ, Bolscher JG, Nazmi K, Vinall LE, Nash MW, Moss FM, et al. Genetic polymorphism of MUC7: allele frequencies and association with asthma. *Europ J Hum Genet* 2001; 9: 347-54.
- Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, Keegan AD. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science* 2003; 300: 1527-8.
- Lukacs NW, Oliveira SHP, Hogaboam CM. Chemokines and asthma: redundancy of function or a coordinated effort? *J Clin Invest* 1999; 104: 995-9.
- Lederman MM, Penn-Nicholson A, Cho M, Mosier D. Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. *JAMA* 2006; 296: 815-26.
- Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappa-B. *J Biol Chem* 2001; 276: 4812-8.
- American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 225-44.
- Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft DW, O'Byrne PM, Anderson SD, et al. Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. *Eur Respir J* 1993; 6: 53-83.
- American Thoracic Society, European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 912-30.
- Schliekelman P, Garner C, Slatkin M. Natural selection and resistance to HIV. *Nature* 2001; 411: 545-6.
- Ungvári I, Tölgyesi G, SENSEI A, Nagy A, Radosits K, Keszei M, et al. CCR5Δ32 mutation, mycoplasma pneumoniae infection, and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1545-7.
- Dawson TC, Beck MA, Kuziel WA, Henderson F, Maeda N. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am J Pathol* 2000; 156: 1951-9.
- Kimpen JLL. Viral infections and childhood asthma. *Am J Crit Care Med* 2000; 162: 108-12.
- Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391:344-5.

38. Srivastava P, Helms PJ, Stewart D, Main M, Russell G. Association of CCR5Δ32 with reduced risk of childhood but not adult asthma. *Thorax* 2003; 58: 222-6.
39. Doull IJ, Lawrence S, Watson M, Begishvili T, Beasley RW, Lampe F, et al. Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1280-4.
40. Basehore MJ, Howard TD, Lange LA, Moore WC, Hawkins GA, Marshik PL, et al. A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 80-7.
41. Rosenwasser LJ, Borish L. Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 152-5.
42. Suzuki I, Yamaguchi E, Hizawa N, Itoh A, Kawakami Y. A new polymorphism in the 5' flanking region of the human interleukin (IL)-4 gene. *Immunogenetics* 1999; 49: 738-9.
43. Ogura Y, Saab L, Chen FF, Benito A, Inohara N, Nunez G. Genetic variation and activity of mouse Nod2, a susceptibility gene for Crohn's disease. *Genomics* 2003; 81: 369-77.
44. Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
45. Chamaillard M, Philpott D, Girardin SE, Zouali H, Lesage S, Charreyre F, et al. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Nat Acad Sci USA* 2003; 100: 3455-60.

---

Prispelo 2008-05-09, sprejeto 2008-09-15

---