

Th1/Th2 genový polymorfismus cytokinů u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou

Martina Vašáková

Summary

Objectives: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a serious disease characterized with progressive scarring of the lungs in which the genetic background is supposed. The aim of our study was to investigate Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms to evaluate their possible influence on IPF development. Then we have correlated selected polymorphisms of IL-1, IL-4 and IL-12 groups (the selection was based on our previous results) with clinical parameters and high resolution computed tomography (HRCT) as a markers of disease stage and progression.

Methods: We investigated 30 patients with IPF and 103 healthy volunteers for the cytokines polymorphisms of the IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-1R, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF alpha, IFN gamma, TGF beta, IL-1 beta, IL-2, IL-4 and IL-4RA genes. The PCR-SSP method was used for measurement. Then the correlations of vital capacity(VC) and diffusing capacity for carbon monoxide(DL_{CO}), bronchoalveolar lavage (BAL) fluid cell counts and high resolution computed tomography (HRCT) alveolar and interstitial scores with different genotypes of groups of IL-1, IL-4, and IL-12 cytokines and their receptor antagonists. The HRCT results were evaluated by an experienced viewer using the interstitial and alveolar score scales, which were based on the IPF HRCT description system from Gay et al. (1998).

Results: The CT genotype of the IL-1 alpha gene promoter at position (-889) was more frequent in IPF patients ($p=0.042$, $p_{\text{corr}}=0.61$). In the IL-2, the genotypes GT at position (-330) and TT at position (+166) were more frequent in the IPF group ($p=0.015$, $p_{\text{corr}}=0.28$). Concerning the IL-4 gene promoter region at position (-1098), the GT was more frequently seen in IPF group and 97% of patients with IPF had the genotype GT or TT ($p=0.012$, $p_{\text{corr}}=0.26$). The CT genotype at position (-590) (IL-4) was more frequent in the IPF group ($p<0.0001$, $p_{\text{corr}}<0.0022$). The prevailing genotype in IPF patients for IL-4 at position (-33) was CT ($p<0.0001$, $p_{\text{corr}}<0.0022$). The carriers of CT genotype at IL-1 alpha (-889) position had higher VC at the time of diagnosis. The CC genotype at this position was more frequent in patients with higher counts of HLADR+ T lymphocytes in BAL. The GT genotype at IL-4 (-1098) position correlated with higher counts of CD4+ T lymphocytes, and inversely the TT genotype with higher counts of CD8+ T lymphocytes in BAL fluid. The HRCT alveolar score was more pronounced in IL-4 RA (+1902) AG heterozygotes. The HRCT interstitial score was less severe in the IL-12 (-1188) AA homozygotes. According to progression of the HRCT interstitial score, the CC homozygosity at IL-1 RA (mspa 111100), the AA homozygosity at IL-4 RA (+1902) and CC homozygosity at IL-4(+33) positions were more frequent in patients with stable disease compared to those with progressive disease.

Conclusion: Our results support the idea of the pathogenic role of cytokine gene polymorphisms of IL-1 and especially of IL-4 in the etiology and pathogenesis of IPF. We assume from our data that the gene polymorphisms of the promoter region of IL-4 at position (-1098) and (-33) and IL-1 alpha at position (-889) are likely to play a pathogenic role in IPF and in modification of its clinical presentation and severity. Furthermore we conclude from our data that the polymorphisms of IL-4, IL-4RA, IL-1RA and IL-12 genes (genes of cytokines with regulatory activity) might influence the phenotype of IPF as shown by measurable changes in HRCT investigations.

Úvod

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je závažným onemocněním s nepříznivou prognózou, se středním přežitím pacientů navzdory léčbě 3-5 let. Prevalence je celosvětově odhadována na 13-20/100.000 a incidence 7-11/100.000, může však být i vyšší, protože předpokládáme poddiagnostikovanost této choroby. (Grutters, 2005)

Etiopatogeneze IPF není zatím zcela úplně jasná, zdá se však, že se jedná o uniformní imunopatologickou odpověď na zevní či vnitřní stimulus. Předpokládá se převaha cytokinů T_H2 typu vedoucí k nekontrolované fibroprodukcí a destrukci plicního parenchymu. Stoupá množství důkazů o tom, že IL-4 a IL-13 u IPF podporuje růst fibroblastů a produkci kolagenu, zatímco IFN-gama potlačuje aktivitu fibroblastů. (Lukacs, 2001) IL-4 a IL-13 prokazatelně zvyšuje produkci TGF- β 2 lidskými bronchiálními epitelii, ale nikoli fibroblasty a tato funkce IL-4 a IL-13 je suprimovatelná podáním IFN- γ . (Wen, 2002)

Klinicky se projevuje progredující námahovou a posléze klidovou dušností, snadnou unavitelností, kašlem a v pozdějších fázích při nastupující hypoxémii i cyanózou. U $\frac{3}{4}$ pacientů se také vyskytují fenotypové projevy, jako jsou paličkovité prsty s nehty tvaru hodinového sklíčka a poslechový fenomen krepitu slyšitelný nad plicními bazemi

Typický radiologický nález popisuje zmnoženou plicní kresbu až retikulonodulaci na prostém zadopředním skiagramu hrudníku a obraz plicní fibrózy až s obrazem voštinovité plíce v bazích plicních s minimálními okrsky tzv. aktivních změn při vyšetření vysoce rozlišující výpočetní tomografií hrudníku (HRCT). Zvláště určení rozsahu fibrózních změn v době diagnózy ukazuje na prognózu onemocnění, tj. čím větší rozsah fibrózy, tím kratší doba přežití. (Gay, 1997) Pro lepší porovnatelnost a interpretovatelnost jednotlivých vyšetření v čase u jednoho pacienta nebo srovnání vyšetření mezi jednotlivými pacienty byly navrženy skórovací systémy, které hodnotí rozsah alveolárních a intersticiálních změn v % postižení plicního parenchymu. (Tabulka 1)

Tabulka 1. HRCT skórovací systém u IPF (dle Gay et al)

STUPĚŇ POSTIŽENÍ	ALVEOLÁRNÍ SKÓRE	INTERSTICIÁLNÍ SKÓRE
0	0	0, není voština
1	1-4%	1-4%, není voština
2	4-24%	5-24%
3	25-49%	25-49%
4	50-74%	50-74%
5	75%-100%	75-100%

% udávají rozsah postižené plicní tkáně

Stran funkčních parametrů u pacientů s IPF dominuje redukce vitální kapacity (VC) a snížení difusní kapacity (DL_{CO}) a posléze i snížení parciálního tlaku kyslíku (paO_2) v tepenné krvi.

Dalším vyšetřením v algoritmu vyšetřovacích metod u pacientů s IPF je bronchoalveolární laváž (BAL). Pro IPF je typické zvýšení zastoupení granulocytů v BAL obvykle s malou příměsí eosinofilů, lymfocyty bývají zvýšeny minimálně.

V rámci cytometrického vyšetření BAL vyšetřujeme převážně T lymfocytární markery- CD3, CD4, CD8, B lymfocytární CD19, markery NK buněk CD16/56, a aktivační marker HLA DR na T lymfocytech. (Papiros, 2005)

Pro histopatologické ověření diagnózy IPF se obvykle neobejdeme bez videothorakoskopické plicní biopsie. Patologicko-anatomický obraz u IPF je různorodý dle lokalizace odběru plicní tkáně, většina odebraných vzorků však zachycuje obraz tzv. obvyklé intersticiální pneumonitidy s převahou jizvení a destrukcí plicní architektiky.

Je důležité vědet, že finální diagnostika IPF je skutečně syntézou klinického, radiologického a histopatologického nálezu, která je dílem lékaře- klinika. Histopatologická diagnóza je hlavní oporou v těch případech, kdy manifestace onemocnění není typická. (Flaherty, 2004)

Prognóza je obecně špatná, navzdory léčbě má IPF v porovnání s ostatními typy idiopatických plicních pneumonií téměř vždy progredující zhoubný průběh. Není doposud známa žádná léčba, která by dokázala významně zpomalit progresi onemocnění. Většina těchto pacientů umírá do dvou až tří let do doagnózy pokud není indikována k transplantaci plic.

Role genových polymorfizmů v etiologii a patogenezi IPF

Doposud byly v souvislosti s IPF vyšetřovány polymorfizmy cytokinů obvykle souvisejících s akutním zánětem (TNF alfa, IL-1, 6, 8), fibroprodukcí (TGF- beta) a s regulací imunitní odpovědi (IL-10). Navzdory tomu, že se předpokládá, že vznik IPF je zřejmě podpořen nerovnováhou cytokinů ve prospěch Th2 spektra, polymorfizmy cytokinů v této oblasti u IPF doposud v širším měřítku vyšetřeny nebyly.

Genové polymorfizmy cytokinů u pacientů s IPF- vlastní pozorování

Cíl práce

Cílem naší práce bylo určit vztah genových polymorfizmů širokého spektra cytokinů ke vzniku a vývoji IPF. U genových polymorfizmů, které pravděpodobně korelovaly s onemocněním IPF, jsme ještě vyšetřovali vztah jednotlivých alel ke klinické manifestaci onemocnění reprezentované demografickými, funkčními a radiologickými parametry a v neposlední řadě i cytologickými a imunologickými parametry v BAL. Vycházeli jsme z hypotézy o nerovnováze spektra Th1 a Th2 cytokinů u IPF, která byla již zmíněna několika autory, ale doposud pro ni nebyl nalezen jednoznačný genetický podklad.

V části práce věnované korelaci genetických parametrů s parametry klinickými jsme se jako jedni z prvních opřeli v charakteristice fenotypu IPF o HRCT alveolární a inersticiální skóre, které jako jediné vystihuje závažnost onemocnění a je dobře měřitelné a porovnatelné v čase u jednoho pacienta i mezi jednotlivými pacienty navzájem.

Soubor pacientů

Všichni pacienti byli běloši z České republiky. Celkový počet pacientů byl 30, 20 bylo žen a 10 mužů. Průměrný věk pacientů byl 65 roků (36- 85 let). (Tab.2)

Kontrolní skupinu tvořilo 103 nepříbuzných jedinců kavkazské rasy z Čech (24 mužů a 79 žen) s negativní anamnézou stran plicních fibrotizujících onemocnění. Tito jedinci byli zdraví potenciální dárci kostní dřeně. Průměrný věk v kontrolním souboru byl 53 let (24-71 let). (Leslie GL, v tisku)

Tabulka 2. Demografická a klinická data (plicní funkce a BAL) u pacientů s IPF v době diagnózy

	STR. HODNOTA	SD	MIN. HODNOTA	MAX. HODNOTA
Věk (roky)	65.4	12.8	36	87
Vitální kapacita (l)	67.4	19.4	21	108
Difuzní kapacita (%)	38.4	15.3	15	69
BAL lymfocyty (%)	16.1	17.9	2	53
BAL polymorfonukleáry(%)	14.2	14.5	2	51
BAL eosinofily(%)	1.2	2.7	0	8
BAL makrofágy (%)	68.3	22.5	24	95
BAL CD4+ T lymfocyty (%)	47.8	18.5	20	80
BAL CD8+ T lymfocyty (%)	35.7	17.8	8	63
CD4+/CD8+ poměr	2.2	2.5	0.32	10
BAL HLADR+ lymfocyty (%)	49.5	27.4	3	90

SD=standardní odchylka

Materiál a metody

U pacientů byla shromážděna demografická data- rasa, věk, pohlaví. V době diagnózy bylo provedeno funkční vyšetření plic- spirometrie s určením vitální kapacity plic (VC), difusní kapacity plic (DL_{CO}) a krevní plyny s určením parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi. Dále pacienti podstoupili BAL z oblasti středního laloku pravé plice čtyřmi porcemi vlažného fyziologického roztoku po 50 ml. První 3 frakce byly vyšetřeny cytologicky se stanovením diferenciálního počtu buněk v BAL a čtvrtá frakce byla vyšetřena imunologicky s imunocytochemickým barvením povrchových molekul CD3, CD4, CD8, CD19, HLADR. (Tabulka 2) V době diagnózy bylo provedeno vyšetření plic počítačovou tomografií s vysokou rozlišovací schopností (HRCT) hrudníku a toto vyšetření bylo pro stanovení dynamiky onemocnění opakováno každých 12 měsíců.

Použili jsme hodnocení rozsahu alveolárních a intersticiálních změn podle systému Gay et al. (Tabulka 1) Co se týče změn v čase, nemoc jsme hodnotili jako stabilní pro hodnoty 0 a 1 (beze změn nebo regrese změn) a progresivní pro hodnotu 2 (progrese změn).

U pacientů byla v době diagnózy odebrána krev na genetické vyšetření po podepsání informovaného souhlasu s následným stanovením polymorfismů cytokinů v promotorové oblasti IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-1R, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-alfa, IFN-gama a v překládaných oblastech TGF- beta, IL-1 beta, IL-2, IL-4 a IL-4RA. (Tabulka 3)

Genotypizace cytokinů

Po extrakci DNA byly hodnoceny polymorfizmy 13 různých cytokinových genů s pomocí CYTOKINE GENOTYPING KIT (DynaL Biotech, Norway). Test je designován jako PCR se sekvenčně specifickými primery (SSP).

Pozitivní a negativní výsledky byly dokumentovány a interpretovány v souladu s pracovním návodem.

Tabulka 3. Seznam vyšetřovaných genových polymorfismů

POLYMORFIZMUS	GENOTYP
IL-1alfa -889	C/C C/T T/T
IL-1beta -511	C/C C/T T/T
IL-1beta +3962	C/C C/T T/T
IL-1R pst 1970	C/C C/T T/T
IL-1 RA mspa 11100	C/C C/T T/T
IL-4 RA +1902	A/A A/G G/G
IL-12 -1188	A/A A/C C/C
INF-gama UTR 5644	A/A A/T T/T
TGF beta1 codon 10	C/C C/T T/T
TGF beta1 codon 25	C/C C/G G/G
TNF alfa -308	A/A A/G G/G
TNF alfa -238	A/A A/G G/G
IL-2 -330	G/G G/T T/T
IL-2 +166	G/G G/T T/T

IL-4 -1098	G/G G/T T/T
IL-4 -590	C/C C/T T/T
IL-4 -33	C/C C/T T/T
IL-6 -174	C/C C/G G/G
IL-6 +565	A/A A/G G/G
IL-10 -1082	A/A A/G G/G
IL-10 -819	C/C C/T T/T
IL-10 -592	A/A A/C C/C

Výsledky

Ze souhrnu vyšetřovaných genových polymorfismů u řady cytokinů nebyly shledány statisticky významné rozdíly ve výskytu mezi normální populací a pacienty s IPF. Genotypy IL-1beta na pozicích (-511) a (+3962), IL-1R pst 1970, IL-4RA (+1902), IL-1RA mspa 11100, IL-12 (-1188), IFN-gamma UTR 5644, TGF-beta 1 kodon 10 a kodon 25, TNF alfa (-308) a (-238), IL-2 (-330) a (+166), IL-6 (-174) a (+565), IL-10 (-1082), (-592) a (-819) se významně v obou skupinách nelišily. (Vašáková, Tissue Antigens 2006)

V případě IL-1 alfa (-889), byl genotyp CT častěji zastoupen u pacientů s IPF oproti kontrolám ($P=0,042$), avšak po Bonferroniho korekci rozdíl přestal být významný ($P_{\text{corr}}=0,61$). Pokud jsme porovnávali oba genotypy s alelou T, t.j. CT i TT vůči CC homozygositě, byl výskyt genotypů s alelou T významně vyšší ve skupině pacientů s IPF ($P < 0,05$), ale po korekci rozdíl přestal být též významný ($P_{\text{corr}} < 0,7$). Genotyp GT na pozici (-330) a TT na pozici (+166) v oblasti genu pro IL-2 byly častější u pacientů s IPF ($P=0,015$), nicméně korigovaná hodnota P nedosáhla statistické signifikance ($P_{\text{corr}}=0,28$). (Vašáková, Tissue Antigens 2006)

V případě promotorové oblasti genu pro IL-4 na pozici (-1098) bylo u pacientů s IPF častěji GT než u zdravých kontrol ($P=0,012$) a 97% (29 z 30) pacientů s IPF mělo na této pozici genotyp GT nebo TT ve srovnání s kontrolami, nicméně po Bonferroniho korekci hodnota P nedosáhla statistické signifikance ($P_{\text{corr}}=0,23$).

Na pozici (-590) IL-4 jsme zjistili častější výskyt CT genotypu u pacientů s IPF než u zdravých jedinců ($P < 0,0001$) a rozdíl zůstal statisticky významný i po korekci ($P_{\text{corr}} < 0,0022$). (Vašáková, Tissue Antigens 2006) (Tabulka 4)

Tabulka 4. IL-4 -590. Frekvence jednotlivých genotypů u pacientů s IPF a zdravých kontrol

IL-4 (-590)	IPF	ZDRAVÉ KONTROLY
CC	3 (10%)	77 (75%)
CT	26 (87%)	20 (20%)
TT	1 (3%)	5 (5%)

$(p < 0.0001, p_{corr} < 0.0022)$

V promotorové oblasti genu pro IL-4 na pozici (-33) u pacientů s IPF převažoval genotyp CT ve srovnání se zdravými kontrolami s převahou genotypu CC ($p < 0,0001$) a hodnota P zůstala v mezích statistické významnosti i po Bonferroniho korekci ($P_{corr} < 0,0022$). (Vašáková, Tissue Antigens 2006) (Tabulka 5)

Tabulka 5. IL-4 -33. Frekvence jednotlivých genotypů u pacientů s IPF a zdravých kontrol

IL-4(-33)	IPF	ZDRAVÉ KONTROLY
CC	9 (30%)	77 (75%)
CT	20 (67%)	20 (20%)
TT	1 (3%)	5 (5%)

$(p < 0.0001, p_{corr} < 0.0022)$

V další fázi při porovnávání fenotypových znaků skupiny pacientů s IPF (klinických a paraklinických parametrů onemocnění) jsme již pracovali pouze s polymorfizmy těch cytokinů, které měly odlišné zastoupení genotypů u nemocných s IPF oproti zdravé populaci. Zvolili jsme proto genu pro skupinu cytokinů IL-4 a IL-1, v případě IL-1, kde byly v našem souboru rozdíly v zastoupení polymorfizmů statisticky méně přesvědčivé, jsme se opřeli i o předchozí práce (Whyte, Am J Resp Crit Care Med 2000) Také jsme vybrali pro porovnání s klinickými parametry jako T_H1 regulační cytokin i IL- 12, i když v našem prvotním sledování rozdílu výskytů u pacientů s IPF a kontrolní populace nebyl statisticky významný rozdíl ve frekvenci polymorfizmů mezi těmito skupinami. Předpokládali jsme však, jak již v práci bylo uvedeno výše v teoretické části práce, že cytokinové polymorfizmy mohou mít vliv nikoli na vznik onemocnění, ale pouze na modifikaci jeho průběhu.

Pacienti s genotypem CT na pozici (-889) IL-1 alfa měli vyšší vitální kapacitu ve srovnání s těmi, kteří na této pozici nesli genotyp CC. ($p < 0,05$) (Vašáková, Scandinavian Journal of Immunology 2006) (Tabulka 6)

Tabulka 6. Korelace vitální kapacity v době diagnózy a genového polymorfizmu IL-1alfa (-889) u IPF

IL-1 ALFA (-889)	STŘEDNÍ HODNOTA VC v % PV
CC(12)	57.8(21-81);SD=18.7
CT(13)	77.4(44-108);SD=16.9
TT(5)	64.2(21-92);SD=18.1

($p=0.0142$)

SD=standardní odchylka

PV=predikovaná hodnota

Nositelé genotypu CC na této pozici měli vyšší zastoupení HLADR+ T lymfocytů v BAL než nositelé CT a TT genotypů ($p < 0,05$) (Vašáková, Scandinavian Journal of Immunology 2006) (Tabulka 7)

Tabulka 7. Korelace CD3+HLADR+ T lymfocytů v BAL v době diagnózy a genového polymorfizmu IL-1alfa (-889) u IPF

IL-1 ALFA (-889)	STŘEDNÍ HODNOTA CD3+ HLADR+ T LY v %
CC(12)	69.3(11-90);SD=29.8
CT(13)	35.2(3-57);SD=18.6
TT(5)	42.8(6-64);SD=22.6

($p=0.0284$)

SD=standardní odchylka

Pacienti s GT na pozici (-1098) v promotorové oblasti genu pro IL-4 měli vyšší zastoupení CD4+ T lymfocytů v BAL, oproti těm s TT genotypem ($p < 0,06$). Naopak TT homozygoti na této pozici měli významně vyšší zastoupení CD8+ T lymfocytů v BAL ($p < 0,01$). Poměr zastoupení CD4+/CD8+ T lymfocytů v BAL byl vyšší u nosičů genotypu GT oproti TT na této pozici. ($p < 0,05$) (Vašáková, Scandinavian Journal of Immunology 2006) (Tabulka 8)

Tabulka 8. Korelace CD3+CD4+ a CD3+CD8+ T lymfocytů v BAL v době diagnózy a genový polymorfismus IL-4(-1098)

IL-4(-1098)	GG (1)	GT(14)	TT(15)	p
Mean CD3+CD4+ T LY in %	77;SD=0	54.4;SD=20.3	37.6;SD= 9.2	p=0.0598
Mean CD3+CD8+ T LY in %	16;SD=0	25.9;SD=16.8	48;SD=10.3	p=0.0068
Mean CD3+CD4+/CD3+CD8+ ratio	4.6;SD=0	3.35;SD=3.1	0.8;SD=0.2	p=0.0516

$p < 0,05$

SD= standard deviation

Co se týká porovnání HRCT změn s genotypem u pacientů s IPF, nejvyšší alveolární skóre (4+5) bylo spojeno s genotypem IL-4 RA (+1902) ve srovnání s homozygoty AA na této pozici. (Tabulka 9) Při porovnání se skupinou kontrol, AA homozygositá na této pozici se vyskytovala v obdobném zastoupení u zdravých kontrol a u pacientů s nižším stupněm alveolárního postižení (2+3) (63% vs. 55%) (Vašáková, Respir Med 2006)

Tabulka 9. Korelace HRCT alveolárního skóre v době diagnózy a genového polymorfizmu IL-4 RA (+1902)

	AS 0+1	AS 2+3	AS 4+5
AA	5 (31%)	10 (63%)	1(6%)
AG	3 (27%)	3 (27%)	5 (46%)

$P < 0,05$

HRCT intersticiální skóre bylo méně vyjádřeno u IL-12 (-1188) AA homozygotů. (Tabulka 10) Ve zdravé populaci je převažujícím genotypem na této pozici AA (55%), AC a CC genotyp je přítomen u kontrol ve 41%, ve srovnání s 89% pacientů s IPF s intersticiálním skóre 4+5. (Vašáková et al, Respir Med 2006)

Tabulka 10. Korelace HRCT intersticiálního skóre v době diagnózy a genového polymorfizmu IL-12(-1188)

	IS 2+3	IS 4+5
AA	10 (55,5%)	8 (44,5%)
AC, CC	1 (11%)	8 (89%)

$P < 0,05$

Co se týče progresu intersticiálních změn na HRCT, CC homozygosita na pozici IL-1RA(mspa 111100), AA homozygosita na pozici IL-RA (+1902) a CC homozygosita na IL-4 (-33) byly častěji zastoupeny u pacientů se stabilním onemocněním ve srovnání s těmi s progresivní nemocí. (Tabulka 11, 12, 13)

Tabulka 11. Korelace změn HRCT intersticiálního skóre v čase a genové polymorfizmy IL-1RA (mspa 111100)

	STABILNÍ ONEMOCNĚNÍ	PROGRESIVNÍ ONEMOCNĚNÍ
CC	6 (75%)	2 (25%)
CT	0	4 (100%)
TT	2 (67%)	1 (33%)

$P < 0,05$

Tabulka 12. Korelace změn HRCT intersticiálního skóre v čase a genové polymorfizmy IL-4RA (+1902)

	STABILNÍ ONEMOCNĚNÍ	PROGRESIVNÍ ONEMOCNĚNÍ
AA	8 (67%)	4 (33%)
AG	0	3 (100%)

$P < 0,08$

Tabulka 13. Korelace změn HRCT intersticiálního skóre v čase a genové polymorfizmy IL-4(-33)

	STABILNÍ ONEMOCNĚNÍ	PROGRESIVNÍ ONEMOCNĚNÍ
CC	4 (100%)	0
CT	4 (36%)	7 (64%)

$P < 0,08$

Jsme si vědomi toho, že podskupiny pacientů v těchto skupinách jsou početně malé, ale srovnáme-li frekvenci zastoupení IL-4 (-33) CC genotypu u kontrolního souboru vs. u pacientů s IPF, můžeme vidět, že 75% zdravé populace jsou CC homozygoti, na rozdíl od skupiny pacientů s progresivním onemocněním, kde tento genotyp nenesl žádný z nemocných. V případě IL-1RA(mspa111100) a IL-4RA (+1902) polymorfizmů, srovnání s výsledky u zdravé populace nepřineslo žádné rozumné vysvětlení pro vztah nosičství některé z alel a progresu onemocnění. (Vašáková, Respir Med 2006)

Diskuze

Při porovnání zdravé populace se skupinou pacientů s IPF, navzdory menší velikosti vyšetřovaného souboru pacientů s IPF (30 pacientů), se jeví role některých polymorfismů v patogenezi IPF, a to hlavně v promotorové oblasti genu pro IL-4 (IL-4 -590, IL-4 -33) velmi pravděpodobné.

V případě hodnocení vztahu T lymfocytů v BAL s genotypem vyšetřovaných cytokinů skupiny jsme našli korelaci mezi zastoupením CD4+ a CD8+ T lymfocytů v BAL a polymorfismem na pozici (-1098) IL-4. Tento výsledek svědčí o možné roli alely G na této pozici v ovlivnění CD4/CD8 T lymfocytárního profilu v BAL a může podporovat hypotézu o protektivní roli převahy CD3+CD4+ lymfocytů v BAL proti rozvoji progresivní fibrózy.

Co se týče zastoupení CD3+HLADR+ lymfocytů v BAL, přítomnost CC genotypu na pozici (-889) IL-1 alfa byla častěji pozorována u pacientů s vyšším zastoupením těchto aktivovaných T lymfocytů v BAL. Tento nálezn by mohl podporovat hypotézu o roli alely C na této pozici v aktivaci T lymfocytů u IPF, ale bude potřeba tuto hypotézu ověřit testováním na větším souboru pacientů.

U pacientů s genotypem AG na pozici (+1902) IL4RA jsme našli vyšší rozsah alveolárního skóre (tj. aktivního procesu) na HRCT hrudníku v době diagnózy. Nižší intersticiální skóre (tj. menší rozsah fibrotických změn) byl nalezen u AA homozygotů na pozici (-1188) IL-12 v porovnání s AC heterozygoty na této pozici. Co se týče progresu onemocnění při porovnávání HRCT scanů v čase, CC homozygoti na pozici (mspa 111100) IL-1RA měli menší stupeň progresu intersticiálních (tj. fibrotických) změn než CT heterozygoti a TT homozygoti. Obdobně IL-4RA (+1902) AA homozygoti měli patrnou menší progresi intersticiálního skóre v porovnání s AG heterozygoty a CC IL-4 (-33) homozygoti měli menší progresi fibrotických změn na HRCT než CT heterozygoti. (Vašáková, Respir Med 2006)

Nejslibnější se nám jeví ty výsledky z výše uvedených, kde nosičství některé alely bylo buď shodné, nebo se lišilo oproti zdravé populaci. Například v případě IL-4RA (+1902), AA homozygosita byla sledovaná jak u pacientů s vyšším alveolárním skóre (čili s více vyjádřenými aktivními změnami bez výrazných změn fibrotických) a u zdravých kontrol.

Genotyp IL-4 (-33) CC byl nacházen v našem souboru u těch pacientů, kteří měli malý sklon k progresi fibrotických změn na HRCT v čase. Zároveň CC homozygosita byla nejčastějším genotypem ve skupině zdravých dobrovolníků (u 75% vyšetřených jedinců) a tento genotyp se nevyskytl u žádného s pacientů s rychlou progresí fibrotických změn na HRCT hrudníku.

Závěrem lze říci, že navzdory omezením daným počtem pacientů v našem souboru lze říci, že IL-4 genové polymorfismy, a to zvláště v promotorové oblasti na pozici (-33) a (-590) hrají pravděpodobně roli v etiologii a potogenezi IPF. Dále je pravděpodobné, že genové polymorfismy v oblasti skupin genů IL-1, IL-1RA, IL-4, IL-4RA a IL-12 mohou ovlivňovat klinickou manifestaci IPF ve smyslu ovlivnění buněčného rozpočtu v BAL a intersticiálních a alveolárních změn zobrazených na HRCT hrudníku a tudíž i ovlivňovat prognózu onemocnění.

Literatura

Flaherty KR, King TE, Raghu G, Lynch JP, Colby TV, Travis WD, Gross BH, Kazerooni EA, Toews GB, Long Q, Murray S, Lama VN, Gay S, Martinez J. Idiopathic interstitial pneumonia. What is the effect of a multidisciplinary approach to diagnosis? *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:904-910

Gay SE, Kazerooni EA, Tows GB, Lynch JP, Gross BH, Cascade PN, Spizarny DL, Flint A, Schork MA, Whyte RI, Popovich J, Hyzy R, Martinez FJ. Idiopathic pulmonary fibrosis. Predicting response to therapy and survival. *Am J Respir Crit Care Med*;1998;157:1063-1072

Grutters JC, duBois RM. Genetics of fibrosing lung diseases. *Eur Respir J* 2005;25:915-927

Leslie GL, Silver E. W., Direskeneli G. S., et al. Worldwide variation in cytokine genes. HLA 2004” Immunobiology of the Human MHC. Processings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Congress. Hansen JA and Dupont B, eds, Volume I+III, IHWG Press, Seattle, WA, 2004. In press

Lukacs NW, Hogaboam C, Chensue SW, Blease K, Kunkel SL. Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis. *Chest* 2001;120/1S:5S-8S

Papiros SA, Kollintza A, Kitsanta P, Kapotsis G, Karatza M, Milic-Emili J, Roussos C, Daniil Z. Relationship of BAL and tissue CD4+ and CD8+ T lymphocytes, and their ratio in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2005;128/4:2971-2977

Vasakova M., Striz I., Slavcev A., Jandova S., Kolesar L., Sulc J. Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Tissue Antigens* 2006;67:229-232

Vasakova M., Striz I., Dutka J., Slavcev A., Jandova S., Kolesar L., Sulc J.: Cytokine gene polymorphisms and high-resolution-computed tomography score in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2006; accepted for publishing 20 Oct 2006

Vasakova M., Striz I., Slavcev A., Jandova S., Dutka J., Terl M., Kolesar L., Sulc J.: Correlation of IL-1 alpha and IL-4 gene polymorphisms and clinical parameters in idiopathic pulmonary fibrosis. *Scandinavian Journal of Immunology* 2006; in press

Wen FQ, Kohyama T, Liu X, Zhu Yk, Wang H, Kim HJ, Kobayashi T, Abe S, Spurzem JR, Rennard SI. Interleukin-4 and interleukin -13-enhanced transforming growth factor-beta 2 production in cultured human bronchial epithelial cells is attenuated by interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26/4:484-490