

ний / В.П. Пузырев, В.А. Степанов, М.Б. Фрейдин // Геномика – медицине / Под ред. Иванова В.И., Киселева Л.Л. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2005.

2. Пузырев В.П. Геномная медицина: подходы и достижения / В.П. Пузырев, С.А. Назаренко, О.Н. Одиноква, В.А. Степанов // Бюл. СО РАМН. – 2000. – 2: 107 – 112.

3. Петрова И.В. Ассоциация полиморфизма промоторной области генов NO-синтаз с развитием бронхиальной астмы / И.В. Петрова [и др.]. Пульмонология. – 2006. – 4: 52–55.

4. Пузырев В.П. Геномные исследования наследственной патологии и генетического разнообразия сибирских популяций / В.П. Пузырев, В.А. Степанов, С.А. Назаренко // Мол. биол. – 2004. – 38 (1): 129 – 138.

5. Дубаков А.В. Ассоциация полиморфизма генов IL-4 и IL-4RA с показателями вентиляционной функции легких и патогенетическими признаками atopической бронхиальной астмы в семьях / А.В. Дубаков [и др.] // Пульмонология. – 2004. – 4: 10–15.

6. Огородова Л.М. Генетические маркеры бронхиальной астмы у детей, больных atopическим дерматитом / Л.М. Огородова [и др.] // Пульмонология. – 2006. – 4: 37–40.

7. Cookson W.O.C. Genetics of asthma and allergic disease / W.O.C. Cookson, M.F. Moffatt // Hum. Mol. Genet. – 2000. – 9(16):2359–2364.

8. Combadiere C. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES / C. Combadiere [et al.] // J. Leukoc Biol. – 1996. – 60(1): 147–52.

9. Samson M. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene / M. Samson [et al.] // Biochemistry. – 1996 19; 35(11): 3362–7.

10. Alkhatib G. [et al.] CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor

for macrophage-tropic HIV-1 / G. Alkhatib [et al.] // Science. – 1996 28;272(5270): 1955–8.

11. Dean M. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene M. Dean / [et al.] // Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. Science. – 1996 27;273(5283): 1856–62.

12. Samson M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene / M. Samson [et al.] // Nature. – 1996 22; 382(6593): 722–5.

13. Martinson J.J. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion / J.J. Martinson [et al.] // Nat Genet. – 1997. – 16(1): 100–3.

14. Лимборская С.А. Этногеомика и геногеография народов Восточной Европы / С.А. Лимборская, Э.К. Хуснутдинова, Е.В. Балановская. – М.: Наука. – 2002.

15. Максимов В.Н. Связь наследственной отягощенности и полиморфизма некоторых генов-кандидатов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и их факторами риска в городской популяции Западной Сибири: Дис. ...д. мед. наук / В.Н. Максимов. – Новосибирск. – 2007.

16. Gonzalez P. Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infarction / P. Gonzalez // Genes Immun. – 2001;2(4):191–5.

17. Szalai C. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients / C. Szalai // Atherosclerosis. – 2001. – 158(1): 233–9.

18. Apostolakis S. Effects of polymorphisms in chemokine ligands and receptors on susceptibility to coronary artery disease / S. Apostolakis // Thromb Res. – 2006;8.

19. Орлова Ю.Ю. Полиморфизм гена хемоки-

нового рецептора CCR5 у больных рассеянным склерозом в Сибирском регионе / Ю.Ю. Орлова // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – 3: 98–104.

20. Севастьянова Н.В. Полиморфизм гена хемокинового рецептора CCR5 и его взаимосвязь с опухолевыми маркерами у больных раком легкого / Н.В. Севастьянова // Российский биотерапевтический журнал: Теоретический и научно-практический журнал. – 2004;2:39.

21. Логвиненко Н.И. Некоторые особенности этиологии, клиники, влияние генетических факторов на формирование воспаления (на модели современных пневмоний в Новосибирске): Дис. ...д-ра мед. наук / Н.И. Логвиненко. – Новосибирск, 2003.

22. Егорова Н.Е. Особенности полиморфизма некоторых макрофаг специфических генов у больных с тяжелой пневмонией в условиях Севера / Н.Е. Егорова, Н.И. Логвиненко, В.Н. Максимов // 17-й Национальный конгресс по болезням органов дыхания. – СПб., 2007.

23. Васильева М.В. Генетические и иммунологические параллели у больных раком легкого и бронхиальной астмой: автореф. дис. ...канд. мед. наук / М.В. Васильева. – Томск, 2006.

24. Пузырев В.Н. Наследственность и болезни легких: учебное пособие / В.Н. Пузырев. Томск, 2007.

25. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). Пер. с англ. – М.: Атмосфера, 2002.

26. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). Пер. с англ. – М.: Атмосфера, 2006.

27. Yudin N.S. Distribution of CCR5-delta 32 gene deletion across the Russian part of Eurasia / N.S. Yudin [et al.] // Human Genetics. – 1998. – 102 (6): 695–698.

Н.В. Тарасенко, Е.И. Кондратьева

АССОЦИИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ КАНДИДАТОВ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

УДК: 616.379-008.64-571.27

В статье приведены результаты поиска генов кандидатов сахарного диабета 1 типа и их взаимосвязи с показателями клеточного и гуморального иммунитета. Показано, что гены *NOS1* (C3392T), *NOS3* (C-691T, *VNTR*, C774T, G894T), *IL1B* (+3953), *IL1RA* (*VNTR*), *IL4RA* (A148G) ассоциированы с заболеванием, и его осложнениями. Найденные ассоциации генов кандидатов сахарного диабета 1 типа с показателями клеточного и гуморального иммунитета доказывают вовлеченность данных систем в развитие заболевания и его осложнений.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, гены-кандидаты, клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет, дети и подростки.

The results of candidate genes of type 1 diabetes search and their interaction with cellular and humoral immunity parameters are shown in this article. It is revealed, that *NOS1* (C3392T), *NOS3* (C-691T, *VNTR*, C774T, G894T), *IL1B* (+3953), *IL1RA* (*VNTR*), *IL4RA* (A148G) genes are associated with disease and its complications. These associations of candidate genes type 1 diabetes with parameters cellular and humoral immunity prove an involvement of the given systems into development of type 1 diabetes and its complications.

Keywords: type 1 diabetes, genes-candidates, cellular immunity, humoral immunity, children and teenagers.

Введение

В структуре эндокринных заболеваний сахарный диабет (СД) занимает лидирующее положение. Сахарный диабет 1 типа (СД1) – это аутоиммунное заболевание у генетически предрасположенных лиц, при котором длительно текущий хронический лимфоцитарный

инсулит приводит к деструкции инсулинпродуцирующих β -клеток островков Лангерганса с последующим развитием абсолютной инсулиновой недостаточности, приводящей к нарушению гомеостаза глюкозы и появлению клинических симптомов. Селективная органоспецифическая деструкция существенно не влияет на другие виды клеток островков Лангерганса (альфа, дельта и PP) [12]. Исследования в области эпидемиологических характеристик СД1 среди детей, проводившиеся в течение двух последних десятилетий, значительно расширили наше представление о данной проблеме. По данным International Diabetes Federation

в настоящее время в мире зарегистрировано 430.000 детей, больных диабетом. Прирост заболеваемости составляет 3% в год, ежегодно регистрируется около 65.000 новых случаев заболеваемости СД1 [8]. СД1 является многофакторным, полигенным заболеванием. Причиной СД1 не являются мутации отдельных генов, как в случае моногенных синдромов. Генетическая предрасположенность к СД1 определяется наследованием определенных аллелей обычных «здоровых» генов, которые называют этиологическими мутациями [7]. Обычно этиологические мутации широко распространены в популяции, однако каждая из мутаций

ТАРАСЕНКО Наталия Викторовна – к.м.н., м.н.с. НИИ медицинской генетики СО РАМН, e-mail: nataly.tarasenko@medgenetics.ru, natvt2003@mail.ru; **КОНДРАТЬЕВА Елена Ивановна** – д.м.н., зав. кафедрой ФПК и ППС ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, e-mail: elenafpk2003@mail.ru.

не приводит к развитию заболевания. Для возникновения заболевания необходимо взаимодействие, между до конца не изученными генетическими факторами и не известными факторами окружающей среды [7]. Одним из подходов изучения наследственной предрасположенности к СД1 является изучение ассоциации полиморфных маркеров генов кандидатов, продукт экспрессии которых (фермент, гормон, рецептор, структурный или транспортный белок) может прямо или косвенно участвовать в развитии патологии [7]. Установление ассоциации генов с заболеванием необходимо для понимания природы процессов, приводящих к развитию заболевания, и для оценки его индивидуального и популяционного генетического риска.

В литературе достаточно широко представлены исследования о состоянии клеточного и гуморального иммунитета при СД1. В большинстве случаев на всех этапах заболевания выявляется дисбаланс субпопуляции Т-лимфоцитов, а так же изменение их функциональной активности [5, 14, 16, 17]. На всех стадиях диабета имеет место специфическое нарушение Т-клеток и В-лимфоцитов. Многие исследователи отмечают изменение соотношения CD4 и CD8, особенно при манифестации СД1 [4, 5]. По мнению И.И. Дедова и соавт., наряду с общими иммунологическими феноменами для СД 1 типа характерна иммунологическая гетерогенность [9]. Во многих работах отмечено увеличение абсолютного и относительного количества В-лимфоцитов и их корреляция с антителами к островковым клеткам (ICA) поджелудочной железы [4, 5, 9]. В научных исследованиях описаны достаточно противоречивые сведения о состоянии гуморального иммунитета при СД1. В большинстве работ авторы описывают увеличение IgA и ЦИК. Отмечается их связь с ангиопатиями и инфекционно-воспалительными заболеваниями.

Целью данной работы являлся поиск полиморфных маркеров, ассоциированных с генетической предрасположенностью к СД1, на хромосомах 12q24.2-q24.3, 7q35-q36, 6p21.3, 2q14, 2q14.2, 5q31.1, 16p11.2-12.1, а также изучение показателей клеточного и гуморального иммунитета и их взаимосвязей с генами кандидатами СД1.

Материалы и методы

Клиническое обследование 102 детей и подростков больных СД1 (46 девочек и 56 мальчиков) проводилось на базе эндокринологического отделения Детской больницы № 1 г. Томска

(гл. врач – Карташев В.А.). Диагноз СД1 устанавливали после детального клинико-инструментального обследования в условиях специализированного стационара на основании Федеральной целевой программы «Сахарный диабет» (2002). Критерием диагностики нефропатии у детей служила классификация С. Mongensen и соавт., 1983 [цит. по 9]. Стадию микроальбуминурии диагностировали при уровне альбуминурии от 30 до 300 мг в сутки, стадию протеинурии - при уровне альбуминурии более 300 мг в сутки [цит. по 9]. Для диагностики диабетической ретинопатии использовали критерии E. Kohnner и M. Porta, 1992 [цит. по 9]. Диагностика диабетической нейропатии основывалась на классификации D. Nathan, 1993 [цит. по 9].

Исследование клеточного и гуморального иммунитета проводилось на базе иммунологической лаборатории (зав. лабораторией – д.м.н. Петровский Ф.И.) ЦНИЛ СибГМУ и включало определение популяций и субпопуляций лимфоцитов цитотоксическим методом. Определение иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови проводили по методу G. Manchini (1965) [13]. Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов в крови больных определяли методом Гриневич, Алфёрова (1981) [2]. Контрольную группу составили 30 здоровых детей и подростков (средний возраст 13,2±0,6).

ДНК выделяли по стандартной неэнзиматической методике из лимфоцитов периферической крови, взятой из кубитальной вены [6]. Выделенную ДНК замораживали и хранили при -20°C до проведения генотипирования.

Всего было изучено 10 полиморфных маркеров 7 генов кандидатов СД1. Анализ полиморфных вариантов исследуемых генов проводили с помощью амплификации соответствующих участков генома методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в геномной базе данных (GDB) и литературе (табл.1).

Смесь для ПЦР содержала 0,5–1,5 мкл специфической пары праймеров концентрацией 1 о.е./мл, 1–

1,5 мкл 10х буфера для амплификации с концентрацией MgCl₂ 0.5-2.0 mM 0.5-2.0 е.а. Таq ДНК-полимеразы («Сибэнзим», «Медиген», Новосибирск) и 100-200 нг геномной ДНК. Смесь помещали в 0,5 мл пробирки типа «Эппендорф», наслаивали сверху минеральное масло для предотвращения испарения и амплифицировали в автоматических минициклерах «MJ Research» (США), «БИС 108» и «Терцик» (Россия). Программа амплификации включала предварительную денатурацию при 94°C в течение 5 минут, с последующими 30-35 циклами, состоящими из отжига при специфической для каждой пары праймеров температуре (1 мин), элонгации цепи ДНК при 72°C (45 с) и ее денатурации при 94°C (45 с). Программу завершала финальная элонгация при 72°C в течение 3 минут. При ПДРФ-анализе продукты амплификации обрабатывали соответствующими рестриктазами при оптимальной для фермента температуре в течение 16-24 часов. Рестрикционная смесь включала 5-10 мкл амплификата, 1,0-1,4 мкл x10 буфера для рестрикции («Сибэнзим», Новосибирск) и 1-8 единиц активности фермента (в зависимости от эффективности его работы). Продукты рестрикции фракционировали в 3% агарозном геле при напряжении 90-120В в течение 35-70 минут или при напряжении 90-120В в течение 35-100 минут в 8-10% полиакриламидном геле. Фрагменты ДНК визуализировали в УФ-свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе «Biorad» (США).

В качестве популяционного контроля использовали группу неродственных индивидов, составивших банк ДНК ГУ НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН. Общая численность контрольной выборки составила 243 человека русской национальности, проживающих в г. Томске (средний возраст 44,3±0,7 лет).

Распределение генотипов исследованных полиморфных локусов про-

Таблица 1

Характеристика исследуемых полиморфизмов

Ген	Полиморфизм	Локализация в гене	Фермент рестрикции	Литература
NOS1	C3392T	Экзон 18	<i>Dra III</i>	Leveque et al., 2003
NOS3	C(-691)T	Промотор	<i>Fsp4H I</i>	Novoradovsky et al., 1999
	C774T	Экзон 6	<i>Fok I</i>	
	G894T	Экзон 7	<i>FriO I</i>	
	VNTR4A/B	Инtron 4	-	
IL1B	(+3953) A1/A2	Экзон 5	<i>TaqI</i>	Wilkinson et. al., 1999
IL1RN	VNTR	Инtron 2	-	Tarlow et al., 1993
IL4	G717C	3'-UTR	<i>Vne I (ApaL I)</i>	Пузырев и др., 2002
IL4RA	A148G	Экзон 3	<i>Rsa I</i>	Noguchi, 1999
TNFA	G(-308)A	Промотор	<i>Bsp19I</i>	Patel et al., 2000

веряли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера [1]. Для оценки ассоциаций полиморфных вариантов генов с патологическим фенотипом рассчитывали показатель отношение шансов (OR) [15]. Для поиска ассоциации патологии с генетическими маркерами был использован критерий, оценивающий отклонения передачи исследуемого аллеля от гетерозиготных родителей потомкам – Transmission/Disequilibrium Test (TDT) [11]. Для оценки связи количественных, патогенетически значимых для СД 1 типа признаков с исследуемыми генетическими маркерами использовали сравнение средних значений метрических показателей у носителей разных генотипов с помощью непараметрических тестов Манна-Уитни (при сравнении двух групп) и Краскела-Уоллиса (при сравнении трех групп). Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для большинства полиморфных вариантов генов *NOS1*, *NOS3*, *TNFA*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL4* и *IL4RA* распределение генотипов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга за исключением полиморфного маркера С3392Т гена *NOS1* ($\chi^2=4,210$; $p<0,05$) за счет избытка гетерозигот и полиморфного маркера *VNTR4A/B* ($\chi^2=3,106$; $p<0,05$) гена *NOS3* за счет недостатка гетерозигот. Получены ассоциации с СД1 для следующих генетических маркеров: аллель С полиморфизма С3392Т гена *NOS1* (OR=1,47; 95%CI: 1,05-2,04; $p=0,02$), аллель С полиморфизма C(691)Т (OR=1,72; 95%CI: 1,09-2,73; $p=0,02$), аллель С полиморфизма С774Т (OR=1,75; 95%CI: 1,05-2,91; $p=0,03$), аллель G полиморфизма G894Т гена *NOS3* (OR=1,49; 95%CI: 1,09-2,05; $p=0,01$), аллель А2 полиморфизма +3953 А1/А2 гена *IL1B* (OR=1,52; 95%CI: 1,02-2,26; $p=0,04$), аллель А2 *VNTR* полиморфизма гена *IL1RA* (OR=1,78; 95%CI: 1,07-2,97; $p=0,02$). С помощью TDT-теста установлены ассоциации аллеля В *VNTR4A/B* полиморфизма (3,84; $p=0,05$), аллеля С полиморфизма С774Т (4,22; $p=0,03$), аллеля G полиморфизма G894Т (3,88; $p=0,05$) гена *NOS3*, аллеля А полиморфизма А148G гена *IL4RA* (5,56; $p=0,02$) с заболеванием. Для сосудистых осложнений с помощью TDT-теста получены следующие ассоциации: аллель В полиморфизма *VNTR4A/B* (4,50; $p=0,03$) и аллель G варианта G894Т (4,32; $p=0,04$) гена *NOS3* ассоциированы с диабетической нефропатией;

аллель С полиморфизма С3392Т гена *NOS1* (4,69; $p=0,03$) и аллель В полиморфизма *VNTR4A/B* гена *NOS3* (4,50; $p=0,03$) ассоциированы с диабетической полинейропатией; аллель А полиморфного маркера А148G гена *IL4RA* ассоциируется с диабетической ретинопатией (4,22; $p=0,04$), диабетической нефропатией (4,97; $p=0,03$), диабетической полинейропатией (3,84; $p=0,05$) и с сочетанием трех осложнений (4,27; $p=0,04$).

В связи с аутоиммунным характером заболевания изучение особенностей иммунного статуса у больных с СД1 привлекает внимание исследователей на всех стадиях болезни. Нами проведено комплексное исследование иммунного статуса у 102 детей и подростков больных СД1, включающее характеристику клеточного и гуморального иммунитета. Характеристика показателей иммунного статуса у детей с СД1 представлена в табл.2. Результаты проведенного исследования показали, что у детей и подростков с СД1 зарегистрировано низкое количество Т-лимфоцитов (CD3, $p<0,05$ и CD4, $p<0,01$), тенденция к увеличению содержания CD72 и повышение их функциональной активности за счет избыточного образования циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) ($p<0,01$).

У мальчиков отмечены более высокие показатели содержания CD72 и уровня IgA, IgG и ЦИК, чем у девочек с диабетом, но без достоверно значимой разницы. В дальнейшем все дети с СД1 были объединены в одну группу (табл. 2).

Анализ иммунологических индексов у детей с диабетом выявил следующие особенности (табл. 3). Отмечалось снижение соотношения CD4/CD8 ($p<0,05$), за

счет уменьшения CD4. Лейко-Т-лимфоцитарный индекс у детей с диабетом был достоверно повышен ($p<0,05$ - для мальчиков и $p<0,01$ - для девочек), что указывало на наличие Т-клеточного дефицита. Лейко-В-клеточный индекс у больных детей достоверно не отличался от показателей контрольных групп. Соотношение содержания иммуноглобулинов к количеству CD72 у детей с СД1 было также повышено, но достоверно значимые различия зарегистрированы только для индексов IgA/CD72 и IgM/CD72.

Показатели иммунного статуса у детей с СД1 были изучены в зависимости от давности диабета, фазы заболевания и наличия осложнений. Анализ иммунного статуса у больных с СД1 в зависимости от давности заболевания выявил следующие особенности (табл.4). На первом году заболевания было понижено общее количество лейкоцитов, лимфоцитов, Т- и В-лимфоцитов. Вследствие этого повышались иммунологические индексы, что свидетельствовало о напряженной работе этих клеток в данный период. Других особенностей изучаемых показателей в зависимости от давности патологического процесса не выявлено.

Зависимости показателей иммунного статуса от степени компенсации

Таблица 2

Иммунологические показатели у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Сахарный диабет 1 типа			Контроль
	Все дети и подростки	Девочки	Мальчики	
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	5,85 $\pm$ 0,24	5,69 $\pm$ 0,36	5,97 $\pm$ 0,31	5,78 $\pm$ 0,46
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	2,22 $\pm$ 0,11	2,18 $\pm$ 0,18	2,89 $\pm$ 0,20	2,54 $\pm$ 0,32
CD ₃ ⁺ , $10^9/\text{л}$	1,02 $\pm$ 0,09*	0,82 $\pm$ 0,09*	1,10 $\pm$ 0,10	1,36 $\pm$ 0,14
CD ₄ ⁺ , $10^9/\text{л}$	0,35 $\pm$ 0,03**	0,35 $\pm$ 0,04**	0,35 $\pm$ 0,03**	0,89 $\pm$ 0,13
CD ₈ ⁺ , $10^9/\text{л}$	0,45 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,08	0,43 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,08
CD ₇₂ ⁺ , $10^9/\text{л}$	0,61 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,08	0,64 $\pm$ 0,07	0,50 $\pm$ 0,14
ЦИК, о.е.	52,70 $\pm$ 3,17**	48,79 $\pm$ 4,17**	55,69 $\pm$ 4,63**	26,37 $\pm$ 5,47
Ig A, г/л	2,03 $\pm$ 0,11*	1,97 $\pm$ 0,12	2,08 $\pm$ 0,16**	1,46 $\pm$ 0,24
Ig M, г/л	1,56 $\pm$ 0,07	1,61 $\pm$ 0,10	1,52 $\pm$ 0,09	1,11 $\pm$ 0,28
Ig G, г/л	12,30 $\pm$ 0,43	11,64 $\pm$ 1,47	12,82 $\pm$ 0,59*	10,07 $\pm$ 1,55

Примечание. В табл. 2-3 * - $p<0,05$, достоверность различия по сравнению с контролем, ** - $p<0,01$, достоверность различия по сравнению с контролем.

Таблица 3

Характеристика иммунологических индексов у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Сахарный диабет 1 типа			Контроль
	Все дети и подростки	Девочки	Мальчики	
CD4/CD8	0,97 $\pm$ 0,11*	1,04 $\pm$ 0,21*	0,92 $\pm$ 0,12*	2,26 $\pm$ 0,19
L/CD3	8,17 $\pm$ 0,54**	7,41 $\pm$ 0,50*	8,70 $\pm$ 0,88**	4,26 $\pm$ 0,97
L/CD72	12,25 $\pm$ 0,83	14,40 $\pm$ 1,36	10,71 $\pm$ 1,01	11,58 $\pm$ 0,72
IgA/CD72	4,18 $\pm$ 0,40**	4,71 $\pm$ 0,68**	3,80 $\pm$ 0,48	2,92 $\pm$ 0,91
IgM/CD72	3,37 $\pm$ 0,30**	4,27 $\pm$ 0,55**	2,75 $\pm$ 0,30	2,22 $\pm$ 0,42
IgG/CD72	24,90 $\pm$ 2,15	28,89 $\pm$ 3,79	22,44 $\pm$ 2,54	20,17 $\pm$ 2,42

Таблица 4

Состояние иммунного статуса у детей с сахарным диабетом в зависимости от давности заболевания ($X \pm m$)

Показатель	Продолжительность заболевания			
	До 1 года	От 1 до 3 лет	От 3 до 5 лет	Более 5 лет
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	3,95±0,26	6,46±0,71	5,96±0,42	6,30±0,70
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	1,30±0,36 p1-3<0,05	2,36±0,28	2,37±0,16	2,16±0,17
CD72, %	13,50±0,50 p1-2<0,05 p1-3<0,05 p1-4<0,05	25,11±2,94	26,93±2,32	25,18±1,82
CD72, $10^9/\text{л}$	0,18±0,05	0,64±0,14	0,67±0,10	0,60±0,08
CD3, %	32,75±1,18	30,16±2,89 p2-3<0,05	39,48±2,87 p3-4<0,05	33,06±1,73
CD3, $10^9/\text{л}$	0,42±0,11 p1-2<0,05 p1-3<0,01 p1-4<0,05	0,74±0,13	1,00±0,12	0,74±0,09
CD4, %	19,00±6,00	13,41±2,18	16,41±1,72	15,73±1,33
CD4, $10^9/\text{л}$	0,27±0,04	0,29±0,04	0,41±0,05	0,34±0,04
CD8, %	13,00±2,80	17,42±2,60	21,69±2,62	18,43±1,39
CD8, $10^9/\text{л}$	0,19±0,08	0,46±0,12	0,53±0,08	0,42±0,06
CD4/CD8	1,22±1,00	2,03±1,16	1,18±0,24	1,00±0,14
Лейкоциты/CD3	10,58±1,72	11,90±1,82 p2-3<0,05	8,11±0,94	11,03±0,95
Лейкоциты/CD72	26,17±4,95 p1-3<0,001 p1-4<0,05	15,79±2,46	12,15±1,23	14,65±1,47
IgA/CD72	8,60±1,95 p1-3<0,001	5,00±1,01	3,80±0,41	6,12±0,84
IgM/CD72	6,41±1,30 p1-2<0,05 p1-3<0,05 p1-4<0,05	3,66±0,69	3,71±0,52	4,49±0,54
IgG/CD72	48,24±10,01	35,70±6,70	26,76±4,30	31,60±4,08
ЦИК, ед	43,75±7,47	48,37±6,71	54,35±6,99	54,20±4,51
IgA, г/л	1,39±0,30	1,96±0,28	1,94±0,18	2,17±0,16
IgM, г/л	1,04±0,21 p1-3<0,05	1,41±0,16	1,70±0,14	1,58±0,09
IgG, г/л	12,70±2,45	12,67±1,09	11,88±0,79	12,39±0,67

Примечание: p – достоверность различия показателей между группами; p1-2 – достоверность различия показателей между группами с длительностью СД 1 до 1 года и от 1 до 3 лет; p1-3 – достоверность различия показателей от 3 до 5 лет; p1-4 – достоверность различия показателей до 1 года и более 5 лет; p2-3 – достоверность различия показателей от 1 до 3 лет и более 5 лет; p3-4 – достоверность различия показателей между группами с длительностью СД 1 от 3 до 5 лет и более 5 лет.

СД1 не установлено и, в связи с этим, статистические данные нами не приводятся. Характеристика иммунологических показателей детей и подростков с сахарным диабетом в зависимости от наличия неспецифических (бактериальных) и специфических осложнений (диабетическая нефро- и ретинопатии) представлена в табл.5. Иммунный статус у детей с неспецифическими осложнениями характеризовался достоверно низким соотношением CD4/CD8, увеличением индексов L/CD3, IgM/CD72 и IgG/CD72 ($p<0,05$ для всех по-

казателей), снижением соотношения CD4/CD8 и уровня ЦИК. Снижение уровня последних, вероятно, связано с их осаждением на сосудистой стенке.

Таким образом, для СД1 у детей характерны выраженная депрессия Т-клеточного иммунитета и повышение активности гуморального звена иммунной системы. Наиболее выраженные изменения со стороны иммунитета имели место на первом году заболевания, прогрессировали при развитии осложнений.

Дети и подростки с СД1 носители

Таблица 5

Состояние иммунного статуса у детей с сахарным диабетом 1 типа в зависимости от осложнений ($X \pm m$)

Показатель	Без осложнений	Микроангиопатии	Неспецифические осложнения
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	6,27±0,62	5,78±0,39	6,54±0,77
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	2,29±0,15	2,09±0,21	2,19±0,25
CD72, %	25,86±1,48	22,40±2,38	29,40±5,04
CD72, $10^9/\text{л}$	0,64±0,07	0,52±0,11	0,69±0,16
CD3, %	34,90±1,64	33,39±2,28	32,70±5,75
CD3, $10^9/\text{л}$	0,84±0,08	0,73±0,12	0,80±0,21
CD4, %	15,72±1,27	15,89±1,57	13,67±2,73
CD4, $10^9/\text{л}$	0,35±0,03	0,37±0,06	0,34±0,09
CD8, %	18,95±1,56	17,81±1,52	21,67±4,04
CD8, $10^9/\text{л}$	0,49±0,06	0,35±0,05	0,48±0,12
CD4/CD8	1,45±0,21 p1-2<0,05; p1-3<0,01	1,09±0,13 p2-3<0,05	0,58±0,16
Лейкоциты/CD3	9,58±0,80 p1-3<0,05	10,61±0,84	14,39±3,54
Лейкоциты/CD72	13,55±1,15	16,81±2,00	14,92±3,48
IgA/CD72	4,94±0,54	6,16±0,98	5,55±2,23
IgM/CD72	3,69±0,37 p1-3<0,05	4,63±0,62	5,89±1,58
IgG/CD72	29,57±3,09	33,07±4,55	36,18±13,66
ЦИК, ед	53,60±4,24 p1-3<0,05	44,94±4,41 p2-3<0,05	71,50±13,23
IgA, г/л	2,01±0,15	2,03±0,18	2,18±0,32
IgM, г/л	1,45±0,09 p1-3<0,001	1,54±0,11 p2-3<0,001	2,27±0,13
IgG, г/л	12,59±0,61	11,80±0,81	12,24±1,24

Примечание: p1-2 – достоверность различия показателей между группами без осложнений и с микроангиопатиями; p1-3 – достоверность различия показателей между группами без осложнений и неспецифическими осложнениями; p2-3 – достоверность различия показателей между группами с микроангиопатиями и неспецифическими осложнениями.

казателей), повышенным содержанием ЦИК ($p<0,05$) и IgM ($p<0,001$) по сравнению с показателями больных без осложнений. Развитие специфических осложнений ассоциировалось со

генотипа AA полиморфизма G(-308)A гена *TNFA* имели низкие показатели лейкоцитов по сравнению с носителями генотипов GG и GA ($p=0,032$) и контрольной группой ($p<0,05$), что отражает снижение активности клеточного звена иммунитета при диабете (табл.6). Больные СД1 носители генотипа AA полиморфизма A148G гена *IL4RA* имели повышенное содержание IgG в сыворотке крови по сравнению с носителями генотипов AG и GG (табл.6). Известно, что антитела IgG играют значительную роль в развитии сахарного диабета 1 типа [4]. В нашем исследовании аллель A полиморфизма A148G гена *IL4RA* ассоциирован с развитием СД1, его сосудистыми осложнениями (ДР, ДН, ДНП) и их сочетанием. Для полиморфизма +3953 A1/A2 гена *IL1B* получено две ассоциации: носители генотипа A2A2 имели повышенное содержание IgA ($p=0,017$) и показатель иммунологического индекса IgA/CD72 ($p=0,005$) (табл. 6). Нами

Таблица 6

Средний уровень показателей клеточного и гуморального иммунитета больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от генотипов полиморфизмов исследуемых генов кандидатов ($X \pm m$)

Ген/Полиморфизм	<i>TNFA (G(-308)A)</i>		
Генотипы	GG+GA	AA	p
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	5,32±0,27	3,98±0,09	0,032
Ген/Полиморфизм	<i>IL4RA (A148G)</i>		
Генотипы	AA	AG+GG	p
IgG, г/л	15,22±0,30	12,70±0,05	0,050
Ген/Полиморфизм	<i>IL1B (+3953 A1/A2)</i>		
Генотипы	A1A1	A1A2	A2A2
IgA, г/л	1,22±0,01	1,58±0,06	3,06±0,12
IgA/CD72	2,51±0,03	5,17±0,10	6,53±0,23
			p*
			0,017
			0,005

Примечание: p – достигнутый уровень значимости для теста Манна-Уитни; p* – достигнутый уровень значимости для теста Краскелла-Уолиса.

установлено что аллель A2 ассоциирован с СД 1 типа ($p=0,040$). Влияние полиморфизма +3953 A1/A2 гена *IL1B* (генотип A2A2) может, вероятно, приводить к изменениям функции клеточного иммунитета, что, в свою очередь, сказывается на клинической картине СД 1 типа [3].

Выводы

1. Изученные полиморфные маркеры генов синтаз оксида азота (*NOS1*, *NOS3*) и цитокинов (*IL1B*, *IL1RN*, *IL4RA*) ассоциированы с развитием СД1 и его осложнений.

2. Иммунный статус детей и подростков с СД1 характеризовался повышением активности гуморального звена иммунитета, выраженной депрессией Т-клеточного звена иммунитета, на-

го иммунитета доказывают вовлеченность данных систем в развитие заболевания и его осложнений.

Литература

1. Вейр Б. Анализ генетических данных / Б. Вейр. – М.: Мир, 1995. – 400 с.
2. Гриневич Ю.А. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных / Ю.А. Гриневич, А.Н. Алферов // Лабораторное дело. 1981. № 8. С. 493-496.
3. Громова А.Ю. Полиморфизм генов семейства *IL-1* человека / А.Ю. Громова, А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4. – № 2. – С. 3-12.
4. Иммуногенетика сахарного диабета 1-го типа / Р.М. Хаитов [и др.] // Иммунология. – 2008. – №4. – С. 233-237.
5. Крюкова Е.В. Особенности иммунитета у детей и подростков с разной продолжительностью сахарного диабета 1 типа / Е.В. Крюкова [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2000. – Т. 46. – №3. – С. 7-10.
6. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. / Т.

рушении соотношения субпопуляций Т-лимфоцитов CD4/CD8, что имеет значение для формирования микроангиопатий.

3. Найденные ассоциации генов кандидатов СД1 с показателями клеточного и гуморально-

Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.

7. Носиков В.В. Генетика сахарного диабета типа 1 / В.В. Носиков // Геномика – медицине. Научное издание / Под ред. академика РАМН В.И. Иванова и академика РАН Л.Л. Киселева. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. – С. 281-311.

8. Сахарный диабет 1-го типа у детей Российской Федерации: распространенность, заболеваемость, смертность / Л.Н. Щербачева [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2007. – Т. 53. – № 2. – С. 24-29.

9. Сахарный диабет у детей и подростков / И.И. Дедов [и др.]. – М., 2002. – 391 с.

10. Хаитов Р.М. Динамика нарушений показателей клеточного и гуморального иммунитета у больных инсулинозависимым сахарным диабетом / Р.М. Хаитов, И.И. Дедов, С.В. Брыкова // Проблемы эндокринологии. – 1992. – Т. 38. – №2. – С. 8-12.

11. Allison D.P. Transmission/Disequilibrium Test for quantitative traits / D.P. Allison // Am.J.Hum. Genet. – 1997. – V. 60. – P. 676-690.

12. Jasinski J.M. Insulin as primary auto-antigen for type 1A diabetes / J.M. Jasinski, G.S. Eisenbarth // Clin. Dev. Immunol. – 2005. – V. 12. – P. 181-186.

13. Mancini G. Immunochemical quantitation of antigens by single radial diffusion / G. Mancini // Immunochem. – 1965. – V. 2 – № 3. – P. 235-236.

14. Pakala S.V. T helper 2 (Th2) T cells induce acute pancreatitis and diabetes in immune-compromised nonobese diabetic (NOD) mice / S.V. Pakala, M.O. Kurrer, J.D. Katz // J. Exp. Med. – 1997. – V. 186. – № 2. – P. 299-306.

15. Pearce N. What does the odds ratio estimate in a case-control study? / N. Pearce // Int. J. Epidemiol. – 1993. – V. 26. – P. 1189-1192.

16. Rabinovitch A. Immunoregulation by cytokines in autoimmune diabetes / A. Rabinovitch // Adv. Exp. Med. Biol. – 2003. – V. 520. – P. 159-193.

17. Rabinovitch A. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus / A. Rabinovitch, W.L. Suarez-Pinzon // Biochem. Pharmacol. – 1998. – V. 55. – № 8. – P. 1139-1149.

18. Roep B.O. Animal models have little to teach us about type 1 diabetes: 1. In support of *th1s* proposal / B.O. Roep, M. Atkinson // Diabetologia. – 2004. – V. 47. – № 10. – P. 1650-1656.

Н.А. Соловьева, Л.Е. Николаева, Н.Р. Максимова СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-5, α- И β-ЦЕПИ ЕГО РЕЦЕПТОРА С АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ У ДЕТЕЙ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

УДК: 575.577.2.616.2

Представлены результаты анализа ассоциации полиморфных вариантов генов интерлейкина-5 (*IL5*), α- и β-цепи его рецептора (*IL5RA*, *IL5RB*) с бронхиальной астмой (БА). Исследование проведено в группе из 103 неродственных больных атопической БА, якутов по этнической принадлежности, и 223 здоровых неродственных якутов. В группе больных БА выявлено преобладание аллеля *IL5Rβ* *G1972 полиморфного варианта G1972A гена *IL5Rβ* и генотипа *IL5Rβ* *G/*G. Статистически значимые величины по повышенному риску развития БА были отмечены для генотипа *IL5Rα* *G/*A полиморфного варианта G-80A гена *IL5Rα*. Полиморфный вариант C-703T гена *IL5* с риском развития атопической БА в якутской популяции ассоциирован не был.

Ключевые слова: гены, интерлейкины, атопическая бронхиальная астма, якуты.

Results of the analysis of association of polymorphic variants of genes interleukine-5 (*IL5*), α- and β – linkage of its receptor (*IL5RA*, *IL5RB*) with bronchial asthma (BA) are presented. Research is spent in group of 103 unrelated patients with atopic BA, Yakuts on ethnicity and 223 healthy unrelated Yakuts. In group of BA patients prevalence of allele *IL5Rβ* *G1972 polymorphic variant G1972A of gene *IL5Rβ* and genotype *IL5Rβ* *G/*G is revealed. Statistically significant values on the raised risk of BA development have been noted for genotype *IL5Rα* *G/*A polymorphic variant G-80A of gene *IL5Rα*. Polymorphic variant C-703T of gene *IL5* with risk of atopic BA development in the Yakut population was not associated.

Keywords: genes, interleukines, atopic bronchial asthma, Yakuts.

СОЛОВЬЕВА Наталья Алексеевна – м.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН, sonata608@yandex.ru; **НИКОЛАЕВА Лена Егоровна** – зав.пульмонологическим отд. РБ №1 НЦМ РС(Я), тел./факс: (4112) 39-55-96; **МАКСИМОВА Надежда Романовна** – к.м.н., гл.н.с. ЯНЦ КМП СО РАМН.

Введение

Бронхиальная астма (БА) – хроническое заболевание дыхательных путей с участием таких клеток, как эозинофилы, Т-лимфоциты, тучные клетки, а также медиаторы аллергии и воспа-

ления, сопровождающееся гиперреактивностью и вариабельной активной обструкцией бронхов [1].

БА у детей принадлежит к числу распространенных аллергических болезней. За последние годы в мире, в