

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. Найдены 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

том числе и в России, отмечается тенденция к увеличению заболеваемости БА среди детей и ее более тяжелому течению. Эпидемиологические исследования последних лет свидетельствуют, что от 4 до 8% населения страдают данным заболеванием. Во взрослой популяции этот процент колеблется в пределах 5, тогда как в детской он повышается до 10. Распространенность БА у детей варьирует в различных странах и популяциях, однако среди хронических патологий она, безусловно, является одной из самых частых [2].

Факторы, определяющие развитие БА, отличаются многообразием и подразделяются на 2 большие группы – генетические и средовые. Их взаимодействие определяет начало манифестации болезни и особенности ее клинического проявления [8].

Решающая роль в развитии воспалительной реакции бронхов принадлежит цитокиновой системе. Известно, что цитокины участвуют в передаче сигналов между клетками иммунной системы и клетками других органов и тканей. Состояние стабильности системы цитокинов в организме легко нарушается такими факторами, как инфекция, радиация, УФ-облучение, гипертермия, токсины, гормоны и др. [5].

Целью данной работы было изучение ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов: интерлейкина-5 *IL5* (C703T), α -цепи рецептора интерлейкина-5 *IL5RA* (G80A) и β -цепи рецептора интерлейкина-5 *IL5RB* (G1972A) с atopической БА у детей в якутской популяции.

Материалы и методы

Клиническая часть исследования и сбор материала осуществлены на базе пульмонологического отделения Республиканской больницы №1 Национального центра медицины (г. Якутск) в период с 2004 по 2007 гг. Под наблюдением находились 103 пациента в возрасте от 6 до 15 лет ($\pm SD=9,83\pm 3,284$) с диагнозом atopическая БА, якуты по этнической принадлежности, проживающие в разных районах Республики Саха (Якутия). Пациентам проведено комплексное клиничко-функциональное обследование. Диагноз БА установлен на основании критериев, изложенных в национальных согласительных документах [3]. В контрольную выборку были включены практически здоровые дети (223 чел.), сопоставимые по возрасту ($\pm SD=17,83\pm 9,106$), этнической принадлежности и месту рождения с

группой пациентов. Протокол исследования утвержден локальным комитетом по биомедицинской этике при ЯНЦ КМП СО РАМН.

Молекулярно-генетическое исследование проведено на базе отдела молекулярной генетики ЯНЦ КМП СО РАМН. Молекулярно-генетический анализ включал исследование полиморфизмов гена *IL5* (C703T), α -цепи рецептора *IL5RA* (G80A) и β -цепи рецептора *IL5RB* (G1972A). Генотипирование индивидов осуществляли путем анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) продуктов ПЦР-амплификации специфических участков генома. Для генотипирования использовали образцы ДНК, выделенные из цельной венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции [11]. Для ПЦР использовали последовательности праймеров, описанные в литературе [4]. Смесь для ПЦР содержала 2,5 пмоль специфических праймеров; 1,2–2,0 мкл 10х буфера для амплификации; смесь dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP по 200 мкМ каждого); 0,5 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск) и 100–200 нг геномной ДНК. Программа амплификации включала денатурацию при 94°C в течение 5 мин. с последующими 30 циклами отжига при специфической для каждой пары праймеров температуре (1 мин.), элонгации цепи при 72°C (45 с) и денатурации при 94°C (45 с). Программу завершала элонгация при 72°C в течение 3 мин. Амплификат подвергали гидролизу соответствующей эндонуклеазой [4] при оптимальной для фермента температуре в течение 12–24 ч. Продукты рестрикции фракционировали в 2% агарозном геле с бромистым этидием при напряжении 120 В в течение 30–45 мин. и визуализировали в ультрафиолетовом свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе Vilber Lourmat. Статистическую обработку данных проводили при помощи программы Statistica 6.0 for Windows. Данные представлены в виде $m\pm SD$, где m – средний возраст, SD – стандартное отклонение. Сравнение частот аллелей и генотипов проводили с помощью двустороннего точного критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

В настоящее время известна только одна мутация для гена *IL5*, тесно связанная с atopической БА, – транзигация C-703T в его промоторной области [4].

Спорным остается вопрос о патологической роли замены A-80G в промоторной области гена *IL5RA*, данный полиморфизм встречался с частотой 36% у англичан [7], тогда как другие исследования [9,12] не смогли подтвердить его значимость. Что же касается гена *IL5RB*, то не так давно группой ученых была обнаружена точечная замена в данном гене приводящая к легочному альвеолярному протеинозу [6,10].

Для большинства изученных полиморфных вариантов в группе здоровых якутов наблюдаемое распределение генотипов соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга (PXB) (табл. 1). Отклонение показано лишь для варианта G-80A гена *IL5RA* ($\chi^2=3,963$, $p<0,01$) за счет недостатка гетерозигот – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность составили 0,408 и 0,472 соответственно. Так же по результатам проведенного исследования у якутов наблюдается низкая частота встречаемости аллеля C-703 гена *IL5* по сравнению с популяциями русских, таджиков и татар, данные о которых опубликованы в литературе [4], приближаясь по частотам к популяциям бурятов и тувинцев. Для полиморфных вариантов G-80A гена *IL5RA* и G1972A гена *IL5RB* на уровне аллельных частот в пределах сравниваемых популяций отмечалась низкая генетическая дифференциация (табл. 1).

По результатам проведенного нами исследования были выявлены статистически значимые отличия при анализе распределения генотипов для полиморфного варианта G1972A гена *IL5RB*. Так, у больных БА отмечалось преобладание носителей гомозиготного генотипа 1972*G/*G (94,2%; OR=6,37; $p=0,000$), низкая (5,8%) по сравнению с группой здоровых (24,2%) частота гетерозиготного генотипа *G/*A и полностью отсутствовали носители генотипа *A/*A (0%), тогда как в контрольной группе они встречались в 4,1 % случаев. Анализ частот аллелей по данному маркеру так же выявил статистически значимые отличия, у больных БА по сравнению со здоровыми отмечалась повышенная частота аллеля *IL5RB* *G1972 (OR=6,42; CI: 2,63–16,68; $p=0,000$).

Анализ частот генотипов полиморфного варианта G-80A гена *IL5RA* показал, что у больных БА в сравнении со здоровыми лицами гетерозиготный генотип *G/*A встречался в 55,3% случаев (OR=1,8; $p=0,019$), а в группе здоровых лишь в 40,8%. А так же в группе больных наблюдалась более низкая

Таблица 1

Полиморфизм генов интерлейкинов и их рецепторов в популяциях

Ген	Популяции	N	Генотипы No, %			Частота аллеля	χ^2	Ho	He	D
IL – 5 C-703T	Русские*	65	CC	CT	TT	C	0,107	0,385	0,407	0,055
			52,3	38,5	9,2	0,715				
	Таджики*	33	51,5	36,4	12,1	0,697	0,408	0,364	0,422	0,139
	Буряты*	59	8,5	55,9	35,6	0,364	2,207	0,559	0,463	-0,207
	Тувинцы*	59	20,0	47,5	30,5	0,458	0,058	0,475	0,496	0,044
	Якуты	223	7,6	49,3	43,1	0,323	3,436	0,493	0,437	-0,128
IL–5RA G-80A	Русские*	66	GG	GA	AA	G	0,090	0,379	0,359	-0,054
			57,6	37,9	4,5	0,765				
	Таджики*	33	60,6	30,3	9,1	0,758	0,662	0,303	0,367	0,175
	Буряты*	60	55,0	38,3	6,7	0,742	0,019	0,383	0,383	-0,000
	Тувинцы*	59	81,4	16,9	1,7	0,898	0,058	0,169	0,183	-0,072
	Якуты	223	41,3	40,8	17,9	0,617	3,963	0,408	0,472	-0,137
IL–5RB G1972A	Русские*	66	GG	GA	AA	G	0,076	0,154	0,142	-0,083
			84,6	15,4	0,0	0,923				
	Таджики*	33	90,9	9,1	0,0	0,955	0,490	0,091	0,087	-0,047
	Буряты*	60	95,0	5,0	0,0	0,975	1,215	0,050	0,049	-0,025
	Тувинцы*	59	86,4	13,6	0,0	0,932	0,013	0,136	0,126	-0,072
	Якуты	223	71,7	24,2	4,1	0,839	2,162	0,242	0,270	0,106

Примечание. n – численность выборок; Ho – наблюдаемая численность генотипов; критерий χ^2 использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга; He – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно; D – относительное отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой; $p < 0,05$.

*Фрейдин М.Б.-2002 г.

Таблица 2

Распределение генотипов и частот аллелей в исследуемых группах по маркерам C-703T гена IL5, G-80A гена IL5RA и G1972A гена IL5RB

Полимор- физм	Генотипы	БА, абс.(%) (n=103)	Здоровые, абс.(%) (n=223)	p
IL5 C-703T	CC	8 (7,8)	17 (7,6)	p* 0,927 p**0,829
	CT	53 (51,5)	110 (49,3)	
	TT	42 (40,7)	96 (43,1)	
	C-703	0,335	0,323	
IL5RA G-80A	GG	37 (36,0)	92 (41,3)	p* 0,021 p**0,699
	GA	57 (55,3)	91 (40,8)	
	AA	9 (8,7)	40 (17,9)	
	G-80	0,636	0,617	
IL5RB G1972A	GG	97 (94,2)	160 (71,7)	p* 0,000 p**0,000
	GA	6 (5,8)	54 (24,2)	
	AA	0 (0)	9 (4,1)	
	G1972	0,971	0,839	

*Достигнутый уровень значимости при сравнении распределения генотипов с показателями группы контроля (двусторонний точный тест Фишера).

**Достигнутый уровень значимости при сравнении частоты аллелей с показателями группы контроля (двусторонний точный тест Фишера).

частота гомозиготных генотипов *G/*G (36%) и *A/*A (8,7%) по данному полиморфному варианту в сравнении с группой здоровых (41,3%; 17,9%) соответственно. Анализ распределения частот аллелей полиморфного варианта G-80A гена IL5RA выявил, что аллель IL5RA *A80 относится к маркера пониженного риска (OR=0,59; $p=0,003$).

При анализе распределения частот

генотипов и аллелей по маркеру C-703T гена IL5 в группе больных и здоровых достоверных отличий обнаружено не было тогда, как для европеоидных популяций данный полиморфизм показал статистически значимую ассоциацию с atopической БА [4] (табл. 2).

Заключение

Таким образом, по результатам проведенного нами исследования было

выявлено, что аллель IL5RB *G1972 и генотип IL5RB *G/*G полиморфного варианта G1972A гена IL5RB являются маркерами повышенного риска развития atopической БА у якутов. Так же статистически значимые величины по повышенному риску развития БА были показаны для генотипа IL5RA *G/*A полиморфного варианта G-80A гена IL5RA. К маркерам пониженного риска в популяции якутов по результатам нашего исследования можно отнести генотип IL5RB *A/*A и аллель IL5RB *A1972 полиморфного варианта G1972A гена IL5RB, а так же генотип IL5RA *A/*A и аллель IL5RA *A80 полиморфного варианта G-80A гена IL5RA. Полиморфный вариант C-703T гена IL5 с риском развития atopической БА в якутской популяции не ассоциирован.

Литература

1. Балаболкин И.И. Бронхиальная астма у детей / И.И. Балаболкин. – М.: Медицина, 2003. – С. 5-7.
2. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхальной астмы (GINA). Национальный институт сердца, легких и крови. Пересмотр 2006 г.
3. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Диагностика, лечение и профилактика». – М.; 2004.
4. Полиморфизм генов интерлейкинов и их рецепторов: популяционная распространенность и связь с atopической бронхальной астмой / Фрейдин М.Б., Пузырев В.П., Огородова Л.М. // Генетика. – 2002. – Т.38, №12. С.1710-1718.
5. Цитокины в иммунореабилитации инфекционных больных / Ю.Е. Серебрянский [и др.] // Воен.-мед. журнал. – 1999. – Т.320, №3. – С.41-50.
6. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and beta chain shared with the receptor for GM-CSF / J. Tavernier [et al.] // Cell. 1991. V.66. P. 1175-1184.
7. A new polymorphism in the promoter of the interleukin 5 receptor alpha subunit (IL-5RA) gene / A. Kollintza [et al.] // Immunogenet. – 1998. – V. 48. – P. 65-66.
8. Cookson W. O. C. M. The alliance of genes and environment in asthma and allergy / W. O. C. M. Cookson // Nature – 1999. – V. 402 Suppl. – B5-11.
9. Familial eosinophilia maps to the cytokine gene cluster on human chromosomal region 5q31-q33 / J.D. Rioux [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 1998. – V. 63. – P. 1086-1094.
10. Human pulmonary alveolar proteinosis associated with a defect in GM-CSF/IL3/IL5 receptor common beta chain expression / Dirksen U. [et al.] // J.Clin.Invest. 1997. V.100. P.2211-2217.
11. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Methods in Molecular Biology / Ed. Walker J.M.Y.L.: Human Press.-1984.- V.2.-P.31-34
12. Mutation analysis of interleukin-5 in an asthmatic cohort / E. Pereira [et al.] // Hum. Mutation – 1998. – V. 11. – P. 51-54.