

ИММУНОГЕНЕТИКА

ДИНАМИКА МИНОРНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ НА ФОНЕ ГЕМОКОМПОНЕНТНОЙ ТЕРАПИИ

Глазанова Т.В., Чубукина Ж.В., Розанова О.Е.,
Павлова И.Е., Бубнова Л.Н.

Российский НИИ гематологии и трансфузиологии
ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

Вопрос о воздействии переливаний гемокомпонентов (ГК) на иммунную систему пациентов с различными патологическими состояниями остается не до конца выясненным.

Целью данного исследования было изучить влияние трансфузий ГК у пациентов с гемофилией А на показатели клеточного иммунитета.

Для этого методом проточной цитометрии в двухцветном анализе определяли относительное содержание в периферической крови клеток, экспрессирующих следующие антигены: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, HLA-DR⁺, CD16/CD56⁺, и их сочетания. Выделены следующие группы: 1-я (45 человек) — неоперированные пациенты в возрасте от 6 до 30 лет, получавшие немногочисленные переливания нефilterованного криопреципитата — не чаще 1-2 раз в год; 2-я (14 человек) в возрасте от 6 до 30 лет, оперированные по поводу гемофилической артропатии, которые получали переливания больших объемов криопреципитата (ежесуточно) и от 1 до 6 доз эритроцитных ГК (филтрованной эритроцитной массы); 3-я (18 человек) — неоперированные пациенты старше 30 лет, получавшие нефilterованный криопреципитат 1-2 раза в месяц, до 10 доз одномоментно; 4-я (25 человек) — оперированные пациенты старше 30 лет, получавшие большие объемы криопреципитата (до 30 доз в сутки) и от 1 до 6 доз единомоментно донорской нефilterованной эритроцитной массы.

Результаты показали отсутствие достоверных различий показателей общей популяции Т-клеток (CD3⁺) и их иммунорегуляторных субпопуляций (CD3⁺/CD4⁺ и CD3⁺/CD8⁺), а также В-клеток (CD19⁺) в группах оперированных и не оперированных пациентов различного возраста. В то же время, у пациентов 2-й группы наблюдалось возрастание относительного содержания клеток с фенотипом CD8⁺/CD3⁺ по сравнению с пациентами 1-й группы (8,2% и 4,7%, соответственно). Уровень лимфоцитов с фенотипом CD3⁺/DR⁺, CD16/CD56⁺/CD3⁺ и CD16/CD56⁺/CD3⁺ во 2-й группе был ниже по сравнению с 1-й группой. Так, показатели CD3⁺/DR⁺ составили в 1-й и 2-й группе соответственно 4,3% и 2,4%, CD16⁺/CD56⁺/CD3⁺ — 4,0% и 2,0%, а НК-клеток — 14,2% и 11,0%. Аналогичные закономерности получены и при сравнении оперированных и неоперированных паци-

ентов в возрасте старше 30 лет: возрастание содержания клеток с фенотипом CD8⁺/CD3⁺ (4,6% и 6,1%, в 3-й и 4-й группе, соответственно), и снижение уровня CD3⁺/DR⁺ (6,0% и 4,1%, соответственно) и CD16⁺/CD3⁺ (6,4% и 3,8%, соответственно). Относительное содержание НК-клеток в 3-й и 4-й группах не различалось.

Выявленные нами особенности в составе минорных популяций на фоне гемотрансфузионной терапии, при отсутствии выраженных изменений численности основных фракций иммунокомпетентных клеток, могут свидетельствовать об опосредованной иммуносупрессии, вызываемой трансфузиями ГК и обусловленной нарушением процессов Т-клеточной регуляции.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ IL-1ra, IL-1β И GST T1 У МАТЕРЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ РАЗВИТИЯ У ПЛОДА И НОВОРОЖДЕННОГО

Глушкова О.А.¹, Гордеева Л.А.¹, Шаталина И.В.¹,
Попова О.С.¹, Ермоленко Н.А.², Воронина Е.Н.²,
Гареева Ю.В.³, Симонова Т.А.³, Сутулина И.М.³,
Филипенко М.Л.²

¹ Учреждение РАН Институт экологии человека
СО РАН, г. Кемерово, Россия

² Учреждение РАН Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск,
Россия

³ МУЗ ГКБ № 3 им. М.А. Подгорбунского, Родильный дом
№1, г. Кемерово, Россия

⁴ ГОУ ВПО КеМГМА МЗ РФ, г. Кемерово, Россия

⁵ МУЗ ДГКБ № 5, г. Кемерово, Россия

Введение. Врожденные пороки развития у плода и новорожденного (ВПР) — одна из тяжелых форм репродуктивных нарушений. Генетические механизмы возникновения ВПР до сих пор остаются мало известными, несмотря на то, что современный уровень развития медицины позволяет выявлять гены ответственные за формирование патологии. ВПР относят к мультифакториальным заболеваниям, где ведущее значение имеет действие тератогена. В связи с этим особую важность приобретает поиск генетических маркеров в генах иммунной защиты от ксенобиотиков (интерлейкины) и генах метаболизма тератогенов (глутатион-S-трансферазы). До сих пор мало изученной остается связь сочетания этих генов с ВПР. Исходя из этого, с целью поиска генетических маркеров изучали ассоциации генов IL-1ra, IL-1β и GST T1 с ВПР у плода и новорожденного.

Материалы и методы. Проведено обследование 538 женщин, проживающих на территории Кемеровской области. Группу сравнения составили 298 женщин с отсут-

ствием в анамнезе спонтанных аборт и ВПР. На момент обследования 150 (50,34%) женщин были с физиологическим течением беременности в сроки 15–35 недель, а 148 (49,66%) женщин — роженицы условно «здорового» ребенка. Исследуемую группу составили 240 женщин. Из них 165 (68,75%) женщин были беременными (15–35 недель) и вынашивали плод, у которого с помощью ультразвукового исследования был установлен ВПР, а 75 (31,25%) — роженицы с диагнозом — ВПР у новорожденного. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитарной периферической крови с помощью метода фенол — хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом. Тест системы для молекулярно-генетического анализа полиморфизма IL-1ra (интрон 2, VNTR 86 н.п.), IL-1β (+3953, C- > T) и GST T1 разработаны в ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск). Полиморфизмы IL-1β и IL-6 выявляли с помощью ПДРФ ферментом Taq I (ООО «СибЭнзим», г. Новосибирск). Генотипирование IL-1ra проводили методом ПЦР, а GST T1 — мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени, как описано в ранее (Kostyukina N.A. et al, 2009). Гетерозиготы по мутации (генотип +/-) рассматривались в одной группе с носителями нормальных генов (+). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью четырехпольной таблицы сопряженности с поправкой Йетса на непрерывность вариации (χ^2). Нулевую гипотезу отвергали при $p \leq 0,05$. Ко всем экспериментально установленным значениям уровня значимости была применена поправка Бонферрони с целью исключения статистических ошибок при множественных сравнениях. Силу ассоциации анализируемых признаков определяли с помощью величины относительного риска (RR).

Результаты исследования. Сопоставление сочетаний частот генотипов IL-1ra с GSTT1 у женщин с ВПР и группы сравнения показало, что для сочетания IL-1ra 4R/4R и GSTT1 «0» была установлена значимая положительная ассоциация (41,82% против 11,68%; $\chi^2 = 27,90$, $p < 0,00001$, $p_c < 0,001$). Показатель величины относительного риска заболевания составил 5,31. Сочетание IL-1β C/C и GSTT1 «0» также значимо чаще встречалось у женщин с ВПР по сравнению с женщинами с физиологически текущей беременностью (40,67% против 14,94%; $\chi^2 = 25,85$, $p < 0,0001$, $p_c < 0,001$). Величина относительного риска составила 3,85. Также были обнаружены значимые отрицательные ассоциации сочетаний генотипов IL-1ra 4R/4R с GSTT1 «+» (58,18% против 88,32%; $\chi^2 = 27,90$, $p_c < 0,001$; RR = 0,19), и IL-1β C/C с GSTT1 «+» (59,33% против 85,06%; $\chi^2 = 25,85$, $p_c < 0,001$; RR = 0,26). Таким образом, в нашем исследовании были обнаружены маркеры предрасположенности к ВПР (сочетания генотипов IL-1ra 4R/4R и GSTT1 «0» и IL-1β C/C и GSTT1 «0»), а также маркеры устойчивости (IL-1ra 4R/4R с GSTT1 «+» и IL-1β C/C с GSTT1 «+»). Это позволяет рекомендовать молекулярно-генетический анализ данных генов для дальнейших исследований патогенеза ВПР, а также в качестве дополнительного метода ранней доклинической диагностики репродуктивных нарушений.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНЕТИКА ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ ЕВРОПЕОИДНОГО НАСЕЛЕНИЯ РОССИИ

Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Голованова О.В.

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

Иммуногенетика в своем развитии прошла период исключительного анализа генов главного комплекса гистосовместимости и существенно расширила круг генов, вариантыные продукты которых участвуют в реализации межклеточных взаимодействий. Среди последних, большое внимание уделяется анализу полиморфизма генов цитокинов, преимущественно в их нетранслируемых областях. Это связано с локализацией в этих областях гена промоторных регуляторных участков, полиморфизм структуры ДНК в которых, влияет на уровень экспрессии мРНК и интенсивность продукции самого цитокина во внеклеточное пространство. Наличие широко полиморфизма этих участков генома приводит к стратификации популяции индивидов на группы с высоким или низким уровнем спонтанной и индуцируемой продукции цитокинов с различной регуляторной активностью, что свою очередь определяет реакцию организма человека на антигенное воздействие и клиническую картину болезни.

Европеоидное население России представляет собой фенотипически кавказоидную популяцию со значительной долей монголоидной генетической компоненты ввиду известных географических и исторических условий своего формирования. Возможность аппликации полученных на различных популяциях данных о влиянии полиморфизма промоторов генов цитокинов на течение таких основополагающих функций, как: воспаление, ангиогенез, склерогенез, остеогенез, канцерогенез, иммунные процессы и т.п., требует получения данных о характере распределения единичных и комплексных генотипов цитокинов среди различных по этнической принадлежности и метизированных групп населения страны.

При исследовании значительной группы (более 500 чел.) здорового европеоидного населения по SNP промоторных регионов генов TNFα -863 C → A, TNFα -308 G → A, TNFα -238 G → A, IL-1β -511 T → C, IL-1β -31 C → T, IL-4 -590 C → T, IL-5 -703 C → T, IL-6 -174 G → C, IL-10 -1082 G → A и IL-10 -592 A → C, показано, что в популяции европеоидов Западной Сибири в основном доминирует европеоидный характер распределения аллелей и их генотипов. При анализе полиморфизма промоторного региона гена TNFα в позициях -863, -308, -238 показано значительное преобладание частоты гомозиготного варианта дикого типа над гетерозиготным, что обусловлено низкой частотой минорных аллелей. Подобное распределение является характерным как для европеоидных, так для монголоидных популяций, где гомозиготный генотип дикого типа также является преобладающим. В исследуемой группе наблюдается увеличение гетерозиготности и частоты гомозиготного варианта минорного типа -590*TT до 6,83%, что является одной из наиболее высоких среди европеоидных популяций, возможно за счет монголоидной компоненты. Выявлено достоверное сцепление двух исследуемых полиморфных локусов генов IL-1β (-511, -31) и IL-10 (-1082, -592) в исследуемой популяционной группе.

Значительный интерес представляют данные о комплексном анализе сочетаний генотипов различных цитокинов в качестве единого генетического признака. Такой популяционный анализ позволяет выявить геномные прогностические признаки долгожительства и ранней смертности; выявить критерии прогноза течения клинически полиморфных заболеваний и фармакогеномные признаки прогноза эффективности лекарственной терапии до ее назначения. Последнее тем более актуально, что в нашу практику вошли генно-инженерные антицитокиновые препараты с высокой рыночной стоимостью.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ И ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Минина В.И.¹, Мун С.А.¹, Гордеева Л.А.¹, Шаталина И.В.¹, Попова О.А.¹, Аносова Т.П.¹, Аносов М.П.¹, Савченко Я.А.¹, Баканова М.Л.¹, Акинчина Л.В.¹, Титов В.И.², Вержбицкая Н.Е.³, Вафин И.А.⁴, Рагожина С.Е.⁴, Воронина Е.Н.⁵, Филиппенко М.Л.⁵, Глушков А.Н.⁵

¹ Учреждение Российской академии наук Институт экологии человека СО РАН, г. Кемерово, Россия

² Кемеровский областной клинический онкологический диспансер, г. Кемерово, Россия

³ Кемеровское областное патолого-анатомическое бюро, г. Кемерово, Россия

⁴ ГУЗ Кемеровский областной центр крови, г. Кемерово, Россия

⁵ Учреждение Российской академии наук Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Воспаление играет ключевую роль в этиологии рака легкого (РЛ). Известно, что люди с эмфиземой, астмой, туберкулезом, ВИЧ-инфекцией или хронической инфекцией *Chlamydia pneumoniae* имеют повышенный риск РЛ. В ответ на воздействие микробных агентов или различных генотоксикантов окружающей среды макрофаги и другие клетки-триггеры запускают воспалительные реакции в эпителиальных клетках легкого путем активации сложной сети сигнальных молекул. Ограниченное воспаление может защищать клетки хозяина, но в то же время длительный или интенсивный воспалительный ответ может оказать обратный эффект и стимулировать канцерогенез. Работы, в которых бы оценивался риск РЛ в связи с полиморфизмом генов, кодирующих сигнальные молекулы воспаления (например, IL-1 β , IL-1RN, cyclooxygenase 2, TNF α) немногочисленны и их результаты противоречивы. В то же время очень большое число работ, посвящено изучению ассоциаций полиморфизмов в генах системы биотрансформации ксенобиотиков и РЛ. В связи с этим целью нашей работы стал анализ связи полиморфизмов в генах интерлейкинов (IL-1 β , IL-1RN) и генах ферментов биотрансформации ксенобиотиков (CYP1A1, CYP1A2, GSTT1 и GSTM1) с РЛ у жителей Кемеровской области.

Материалы и методы. Для выполнения поставленной цели были обследованы 452 мужчины в возрасте 45–80 лет (в среднем, 59,1 лет). Из них: 314 мужчин больных раком легкого, поступивших на лечение в Кемеровский областной клинический диспансер; группу сравнения составили 138 условно здоровых мужчин.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью метода фенол–хлороформной экстракции. Образцы ДНК растворяли в 10 mM Tris/1 EDTA, pH 8,0 и хранили при -20 °C. Генотипирование IL-1 β (C3954T), IL-1RN (VNTR), CYP1A1*2A, CYP1A2*1F, GSTT1 (del) и GSTM1 (del) проводили с помощью тест-систем, разработанных ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью четырехпольной таблицы сопряженности с поправкой Йетса на непрерывность вариации (с²). Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$. Силу ассоциации анализируемых признаков определяли с помощью величины относительного риска (RR). Для RR рассчитывали доверительный интервал (CI) при уровне значимости 95%.

Результаты. Анализ распределения частот генотипов изученных полиморфных локусов показал их соответствие ожидаемым частотам при равновесии Харди–Вайнберга.

Статистически значимые отличия были получены при сравнении частоты встречаемости генотипа CC IL-1 β (58,8% в группе РЛ против 46,9% в группе сравнения; $\chi^2 = 4,60$; $p = 0,032$; RR = 1,63; CI: 0,63–4,23 при уровне значимости 95%) и генотипа TT CYP1A1 (68,8% в группе РЛ против 47,5% в группе сравнения; $\chi^2 = 6,98$; $p = 0,008$; RR = 2,41; CI: 0,93–6,27 при уровне значимости 95%). Распределение частот генотипов IL-1RN (VNTR), CYP1A2*1F, GSTT1 (del) и GSTM1 (del) у больных РЛ и здоровых доноров статистически значимо не различалось.

Известно, что при дисбалансе ферментной системы биотрансформации в организме накапливаются аддукты реактивных метаболитов ксенобиотиков с ДНК и белками, которые могут выступать как гаптены (антигены), которые индуцируют специфический иммунный ответ. Выраженность же иммунного ответа детерминирована сложной полигенной системой, включающей в себя гены интерлейкинов. Распространенность в группе больных РЛ генотипа CYP1A1 TT, кодирующего ферменты с низкой функциональной активностью и генотипа IL-1 β CC, определяющего низкий уровень выработки интерлейкина IL-1 β , отражает подобный дисбаланс в организме онкологических больных. Генетически детерминированная сниженная активность ферментных систем детоксикации в сочетании с низкой способностью к выработке интерлейкина 1 β может служить фактором риска формирования РЛ.

Представляется перспективным использовать полученные данные при формировании групп высокого индивидуального риска рака легкого.

ГЕНОДИАГНОСТИКА ОСТЕОПОРОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Мудров В.П.¹, Нелюбин В.Н.¹, Стамм М.В.², Власенко И.В.², Донников А.Е.³

¹ ЦКБ №6 ОАО «РЖД», Москва, Россия

² 9-й ЛДЦ МО РФ, Москва, Россия

³ ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Москва, Россия

Введение. Остеопороз — метаболическое заболевание скелета, чаще поражающее население старшего возраста. Хронические дегенеративные заболевания счита-

ются, главным образом, неинфекционными. Однако накоплено значительное количество данных, свидетельствующих о том, что развитию остеопороза способствуют сопутствующие заболевания инфекционной природы. Обсуждается роль *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) и вирусов группы герпеса в развитии данной патологии. Определению предрасположенности к остеопорозу может помочь молекулярная диагностика генных мутаций маркеров костно-кальциевого обмена.

Цель и задачи. Изучить возможные мутации генов, ответственных за развитие остеопороза и сопоставить эти данные с биохимическими маркерами костного обмена, а также с наличием бактериально-вирусной инфекции.

Материалы и методы. В рамках профилактического осмотра были обследованы 58 мужчин и 33 женщины в возрасте 35-55 лет. Исследовали биохимические маркеры костного обмена: остастаза, паратгормон, кальцитонин, остеокальцин, β -CrossLaps. Было проведено обследование на антитела к *H. pylori* и герпес-вирусам (вирусы простого герпеса 1 и 2 типа, вирус Эпштейна–Барр, цитомегаловирус, вирусы герпеса человека 6 и 8 типа). Также этим пациентам были проведены исследования методом ПЦР «в реальном времени» полиморфизма рецептора витамина D, α -эстроген-рецептора, остеопротегерина, протеина-5, α 1-коллагена I типа. Результаты исследования оценивались по степени риска развития остеопороза: пониженный, популяционный, повышенный, высокий.

Результаты. У 87% обследованных были выявлены антитела к классу IgA и IgG *H. pylori*. Из них 15 человек (8 женщин и 7 мужчин) предъявили жалобы на диспептические явления со стороны ЖКТ. При анализе биохимических параметров метаболизма костной ткани у пациентов, инфицированных *H. pylori*, обнаружено повышение уровня паратгормона и β -CrossLaps. При этом у 50% женщин и 43% мужчин, связанное с титром антител к бактериальному возбудителю. А повышенный генетический риск развития остеопороза был у 63 % женщин (5 чел.) и 100 % мужчин (7 чел.). Прямой корреляционной связи между уровнем антител к вирусам герпеса и уровнем генетического риска развития остеопороза выявлено не было.

Выводы. Предварительные исследования показывают, что у пациентов, инфицированных *H. pylori* и имеющих жалобы на функцию ЖКТ, в высоком проценте случаев обнаруживаются изменения в структуре генов, контролирующих костный обмен. Количественная оценка изменений биохимических параметров метаболизма костной ткани и их связь с уровнем антител к *H. pylori* требует дальнейшего изучения. Диагностика генных мутаций маркеров костно-кальциевого обмена в сочетании с определением биохимических маркеров может оказать большую помощь врачам клиницистам в выборе схем профилактики и лечения остеопороза.

МЕЖДУНАРОДНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК И АККРЕДИТАЦИИ ЛАБОРАТОРИЙ ТКАНЕВОГО ТИПИРОВАНИЯ

Павлова И.Е., Бубнова Л.Н., Реутова Н.В.,
Беляева Е.В.

Российский НИИ гематологии и трансфузиологии
ФМБА России, Москва, Россия

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), как высокотехнологичный метод терапии, широко и успешно используется во всем мире для лечения гемобластозов и депрессий кроветворения. Одним из самых важных факторов, определяющих успех трансплантации, является совместимость донора и реципиента по антигенам Главного комплекса гистосовместимости — системе HLA. В настоящее время в случае отсутствия родственного донора поиск гистосовместимого неродственного донора для конкретного больного может проводиться не только в национальных регистрах доноров ГСК, но и в международной базе доноров (BMDW). Поэтому иммуногенетическое обследование как больного, нуждающегося в аллогенной трансплантации ГСК, так и донора ГСК целесообразно выполнять в соответствии с международными стандартами. Для учреждений здравоохранения Российской Федерации таковыми могут являться нормы Европейской федерации иммуногенетики (EFI), а также международной Ассоциации донорских регистров (WMDA), которые предъявляют дифференцированные требования к проведению иммуногенетического обследования родственного и неродственного донора, с указанием определенных методов HLA-типирования. Лаборатории, выполняющие эти исследования, должны иметь аккредитацию EFI.

В 2010 году в Республиканском центре иммуногенетического типирования тканей (РЦИТТ) Российского НИИ гематологии и трансфузиологии проводилась международная инспекция, по результатам которой был выдан сертификат, свидетельствующий о соответствии работы РЦИТТ требованиям Европейской федерации иммуногенетики.

В соответствии с требованиями EFI специалистами РЦИТТ Российского НИИ гематологии и трансфузиологии разработан и апробирован алгоритм иммуногенетического обследования больных, нуждающихся в трансплантации ГСК, и потенциальных доноров с использованием как серологического, так и молекулярно-генетического методов HLA-типирования. С 2010г. с использованием предложенного алгоритма проводится поиск как родственных, так и неродственных доноров для онкогематологических больных, нуждающихся в трансплантации ГСК. Сочетание использования различных методов HLA-типирования позволяет проводить экономически обоснованное иммуногенетическое обследование реципиентов и потенциальных доноров ГСК, отвечающее требованиям международных стандартов EFI.

АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ IL-6 И CYP1A2*1F С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ У РАБОТНИКОВ ТЕПЛОЭЛЕКТРОСТАНЦИЙ

Савченко Я.А., Минина В.И., Баканова М.Л., Акинчина Л.В., Мун С.А., Ларин С.А., Глушков А.Н.

Учреждение Российской академии наук Институт экологии человека СО РАН, г. Кемерово, Россия

Согласно экспериментальным и клиническим данным, важную роль в развитии многих заболеваний играют гены цитокинов. Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма. Среди факторов, влияющих на характер течения и прогноз заболевания в целом, пристальное внимание в последние годы уделяют изучению Th2-пути иммунного ответа и IL-6. Данный интерлейкин может действовать как провоспалительный и противовоспалительный цитокин. Кроме того, цитокины могут оказывать влияние на цитохром P450-зависимые монооксигеназы (CYP), функцией которых является окислительная биотрансформация широкого круга поступающих в организм экзогенных химических соединений. Взаимодействие IL-6 и гена CYP1A2*1F с заболеваниями органов пищеварительной системы остается малоизученным. В то же время у работников теплоэлектростанций заболевания пищеварительной и дыхательной системы были лидирующими. В связи с этим целью исследования стало изучение ассоциаций полиморфизмов генов IL-6 и CYP1A2*1F с заболеваниями пищеварительной системы у работников теплоэнергетического комплекса (ТЭК).

Материалы и методы. Для выполнения поставленной цели было обследовано 226 работников ТЭК г. Кемерово. Из них 171 человек вошли в группу здоровых доноров со стажем работы 17,6 лет. Средний возраст составил 47,9 лет. 55 человек со стажем работы 17,1 лет (средний возраст составил 44,2 лет) составили группу больных с патологией органов пищеварения: гастрит (47,3%), язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки (34,5%), панкреатит (18,2%).

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. Образцы ДНК растворяли в 10 mM Tris/1 EDTA, pH 8,0 и хранили при -20 °C. Генотипирование IL-6 и CYP1A2*1F проводили с помощью тест-систем, разработанных ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск). Полиморфизм генов IL-6 (-174 G > C) и CYP1A2*1F (-164 C > A) выявляли с использованием сайт-специфической рестрикции ферментами Taq I и Bst2U (BstNI), соответственно (НПО «СибЭнзим», г. Новосибирск). Детекцию результатов рестрикции проводили в 7% полиакриламидном геле с последующей окраской в растворе бромистого этидия. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью четырехпольной таблицы сопряженности с поправкой Йетса на непрерывность вариации (χ^2). Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$. Силу ассоциации анализируемых признаков определяли с помощью величины относительного риска (RR). Для RR рассчитывали доверительный интервал (CI) при уровне значимости 95%.

Основные результаты. Анализ распределения частот генотипов IL-6 и CYP1A2*1F у рабочих показал их соответствие ожидаемым частотам при равновесии Харди–

Вайнберга. Первоначально изучали распределение частот генотипов IL-6 и CYP1A2*1F в группах рабочих с заболеваниями органов пищеварительной системы и здоровых лиц. Были получены достоверные отличия в частоте встречаемости генотипа C/G IL-6 (67,3% против 49,1%; $\chi^2 = 4,37$; $p = 0,037$; RR = 2,10; CI 0,93–4,78 при уровне значимости 95%). По данным литературы известно, что аллель G большинство исследователей связывают с повышенной продукцией белка IL-6, что может служить причиной развития ряда патологических состояний. В нашем исследовании было показано, что генотипы CG и GG (имеющие хотя бы одну из высокоактивных G-аллелей) достоверно чаще встречаются в группе рабочих с заболеваниями пищеварительной системы, по сравнению со здоровыми донорами (85,7% против 67,8%; $\chi^2 = 5,16$; $p = 0,023$; RR = 2,70; CI 1,19–6,13 при уровне значимости 95%).

Распределение частот генотипов CYP1A2*1F у здоровых доноров и рабочих с заболеваниями органов пищеварения статистически значимо не различалось.

При рассмотрении сочетания генотипов IL-6 и CYP1A2*1F в группах больных и здоровых были выявлены достоверные отличия частоты встречаемости сочетания C/G IL-6 и C/C CYP1A2*1F (8,2% против 0,6%; $\chi^2 = 5,27$; $p = 0,022$; RR = 11,24; CI 4,95–25,53 при уровне значимости 95%). Таким образом, была установлена положительная ассоциация генотипа C/G IL-6 и C/C CYP1A2*1F с заболеваниями органов пищеварения у рабочих теплоэнергетического производства.

Таким образом, генотипирование IL-6 и CYP1A2*1F может иметь значение при разработке новых подходов к ранней диагностике и профилактике заболеваний пищеварительной системы работников теплоэлектростанций.

ВЫЯВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЧИН РАЗВИТИЯ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ У РОССИЙСКИХ БОЛЬНЫХ

Сермягина И.Г., Забненкова В.В., Поляков А.В.

ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, Россия

Первичные иммунодефициты (ПИД) являются результатом генетических дефектов, приводящих к нарушению одного или нескольких эффекторных звеньев иммунитета. Это определяет сложный характер и степень выраженности клинических проявлений. Для большинства форм ПИД характерно раннее начало заболевания и тяжелое рецидивирующее течение, требующее сложного лечения. К настоящему времени известно около 80 видов ПИД. Несмотря на относительную редкость первичных иммунодефицитов, они занимают значительное место в структуре заболеваемости и смертности в развитых странах. Ранняя диагностика ПИД и своевременное начало адекватной терапии определяют прогноз для больных с первичными иммунодефицитами. Важное значение для постановки диагноза ПИД имеет молекулярно-генетическое исследование.

Наиболее часто встречаются X-сцепленные формы врожденных иммунодефицитов, хотя известны и другие типы наследования. В лаборатории ДНК-диагностики МГНЦ РАМН разработаны методики выявления молекулярных причин таких заболеваний как: X-сцепленный гипер-IgM синдром (ген CD40LG), X-сцепленная агам-

маглобулинемия (ген BTK), X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит (ген IL-2RG), X-сцепленная хроническая гранулематозная болезнь (ген CYBB1), X-сцепленный лимфопролиферативный синдром (ген SH2D1A) и X-сцепленный синдром Вискотта–Олдрича (ген WASP). Также проводится анализ мутаций для иммунодефицитов с другими типами наследования: аутосомно-доминантным — наследственный ангионевротический отек (ген C1NH), и аутосомно-рецессивным — синдром Ниймеген (ген NBS) и атаксия-телеангиэктазия (ген ATM). В зависимости от цели исследования используется как прямая, так и косвенная ДНК-диагностика.

Проведение ДНК-анализа у больных с ПИД позволяет определить молекулярную причину заболевания и установить носительство мутации у родственников в семье пробанда. Наличие выявленной мутации делает возможным проведение пренатальной диагностики заболевания. На данный момент нами проведены 304 ДНК-диагностики для больных с различными формами первичных иммунодефицитов. Зарегистрированы 148 различных мутаций. Проведено 40 пренатальных диагностик. Результаты приведены в таблице.

На основании накапливаемых данных (спектр мутаций, наличие «горячих точек» и наиболее частых мутаций) в лаборатории ДНК-диагностики МГНЦ РАМН ведется разработка наиболее эффективных алгоритмов проведения молекулярно-генетического анализа различных форм первичных иммунодефицитов.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА IL-4 (C-590T) С ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ

Смоляникова М.В., Райкова В.Ю., Смирнова С.В.
НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН,
Красноярск, Россия

Псориатический артрит (ПА) представляет собой хронический прогрессирующий системный воспалительный процесс костно-суставной системы и развивается у 50-70% пациентов с псориазом. Предполагается, что существует генетически обусловленная предрасположенность к развитию псориатического артрита, в которой суще-

ственное значение имеют гены цитокинов, основных медиаторов иммунного ответа.

Целью настоящей работы был анализ распределения аллельных вариантов гена противовоспалительного цитокина IL-4 в популяции европеоидного населения России, оценка ассоциации некоторых показателей клеточного (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19) и гуморального (IgA, IgG, IgM) звеньев иммунитета с генотипами полиморфизма в промоторном регионе гена IL-4 (C-590T). Материалом для исследований послужили образцы ДНК и сыворотки от 79 больных псориазом в среднем возрасте 43 года, у 51 больного из общей группы был диагностирован ПА. Генотипирование проводили с помощью метода ПЦР и рестриктоного анализа. Обработку результатов генетических исследований осуществляли с использованием критерия отношения шансов OR с расчетом 95% доверительного интервала (CI). Распределение генотипов по полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга (PXB) с помощью точного теста Фишера. Анализ показателей иммунного статуса проводили с помощью непараметрического теста Манна–Уитни в программе «Statistica 6.0».

Частота распределения генотипов (62% C/C, 30,4% C/T, 7,6% T/T) и аллелей исследованного полиморфного локуса IL-4, полученная нами, в целом характерна для европеоидных популяций, различия между группой больных псориазом и здоровыми донорами статистически недостоверны. Основными результатами исследований стали достоверные различия ($p = 0,03$) в распределении генотипов полиморфизма C-590T гена IL-4 среди больных псориазом с артропатологией (ПА) и больных без изменений в костно-суставной системе (ПС): генотип C/C 72,6% и 42,9%, генотип C/T 21,6% и 46,4%, генотип T/T 5,8% и 10,7%, соответственно. Сравнение частот аллелей показало положительную взаимосвязь аллельного варианта C-590 IL-4 с псориатическим артритом — его частота у больных ПА 0,83, у больных без артрита 0,66 ($p = 0,01$; OR 2,57 CI (1,13–5,88)).

Нами получены статистически достоверные отличия в значениях клеточного и гуморального звеньев иммунитета среди больных псориазом без артропатологии (ПС), носителей генотипа C/C (CD3 $50,1 \pm 5,4\%$, CD4

ТАБЛИЦА. РЕЗУЛЬТАТЫ ДНК-ДИАГНОСТИКИ ПИД (К ТЕЗИСАМ СЕРМЯГИНОЙ И.Г. И ДР.)

ПИД	Ген	Количество больных	Обнаружено мутаций	Пренатальная диагностика
X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит	IL-2RG	24	14	6
X-сцепленный гипер-IgM синдром	CD40LG	17	11	5
X-сцепленная хроническая гранулематозная болезнь	CYBB1	26	18	2
X-сцепленный синдром Вискотта–Олдрича	WASP	37	30	7
X-сцепленный лимфопролиферативный синдром	SH2D1A	32	6	1
X-сцепленная агаммаглобулинемия	BTK	53	31	1
Синдром Ниймеген	NBS1	55	33	4
Атаксия-телеангиэктазия	ATM	54	-	14
Наследственный ангионевротический отек	C1NH	6	5	-
	Общее количество	304	148	40

36,1±8,4%, ЦИК 54,8±10,9) и генотипа С/Т (CD3 42±7,3, CD4 45,8±6,1, ЦИК 40,5±6,7), а также среди больных ПА, носителей генотипа С/С (IgA 3,4±1) и носителей генотипа С/Т (IgA 2,7±1,1) ($p = 0,03$). У носителей генотипа С/С достоверно увеличено процентное содержание CD3 и CD4 в группе ПС по сравнению с группой ПА ($p = 0,03$ и $p = 0,0001$), тогда как содержание CD8 клеток достоверно повышено в группе ПА относительно ПС ($p = 0,002$).

Таким образом, полученные нами результаты говорят об ассоциации полиморфизма промоторного региона IL-4 (C-590T) с псориазом. Известно, что изучаемая нами точечная замена ассоциирована с уровнем продукции IL-4, одного из основных цитокинов, участвующих в развитии иммунного ответа при аутоиммунных заболеваниях. Нами показаны достоверные различия показателей клеточного и гуморальных звеньев иммунитета у больных с различными генотипами полиморфизма гена IL-4. Полученные данные показывают, что аллельный вариант C-590 IL-4 достоверно чаще встречается среди больных псориазическим артритом по сравнению с больными псориазом без артропатологии. Это предполагает, что носители аллеля C-590 имеют высокий риск развития более тяжелой формы псориаза по сравнению с носителями другого аллеля.

ВЗАИМОСВЯЗЬ HLA DRB1* ГЕНОТИПА С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ ТУБЕРКУЛЕЗА У ДЕТЕЙ

Старшинова А.А.¹, Павлова М.В.¹, Довгалюк И.Ф.¹, Павлова И.Е.², Бубнова Л.Н.²

¹ ФГУ «СПбНИИ фтизиопульмонологии»
Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург,
Россия

² Российский НИИ гематологии и трансфузиологии
ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Доказано влияние аллелей гена HLA-DRB1* на течение и прогноз туберкулезной инфекции у взрослых, однако исследований по изучению влияния HLA-DRB1* у детей в настоящее время практически нет. Возможность прогнозирования характера течения инфекции в детском возрасте благодаря выявлению иммуногенетических маркеров является актуальным в современной эпидемиологической ситуации.

Цель исследования. Определить взаимосвязь HLA-DRB1* генотипа с особенностями структуры клинических форм туберкулезной инфекции у детей.

Материал и методы. За период с 2008-2011 гг. обследовано 187 ребенка (96 мальчиков и 94 девочки) из них в возрасте от 1 до 6 лет — 93 (49,7%) пациента, от 7 до 14 — 94 (50,3%) человека с различными проявлениями туберкулезной инфекции. Проведен полный комплекс фтизиатрического обследования, который дополнен постановкой Диаскинтеста, углубленной туберкулинодиагностикой, лучевыми методами (МСКТ и МСКТ-ангиография). Проведено исследование аллелей гена HLA-DRB1*. Определение HLA-DRB1* генов проводили методом PCR-SSP, контрольную группу составили 346 здоровых жителей Северо-Запада России. Статистическую обработку проводили по программе Statistika 6.0 с определением значения критерия Пирсона — хи-квадрат.

Основные результаты. Проведенный сравнительный анализ аллелей гена HLA-DRB1* общей группы наблю-

дения ($n = 187$) и группы сравнения ($n = 346$) достоверных отличий не выявил.

После комплекса фтизиатрического обследования пациенты были разделены на две группы: I группа ($n = 89$) — инфицированные МБТ (здоровые), II группа ($n = 98$) с различными проявлениями туберкулезной инфекции.

Проведенный сравнительный анализ генотипов детей с туберкулезной инфекцией и группой контрольной группой в I группе достоверно часто определялся аллель DRB1*11 (33,7% против 22,3%, $\chi^2 = 5,01$, $p < 0,05$), во II группе достоверно часто встречается DRB1*04 (34,7% против 21,1%, $\chi^2 = 7,7$, $p < 0,01$). Сравнивая результаты типирования аллелей гена HLA-DRB1* в I и II группах наблюдения достоверно чаще во II группе определяется DRB1*04 (34,7% против 17,9%, $\chi^2 = 6,7$, $p < 0,01$), что подтверждает возможное влияние данного аллеля на развитие заболевания туберкулезом в детском возрасте.

Таким образом, наличие аллеля DRB1*04 в генотипе ребенка может свидетельствовать о предрасположенности к заболеванию туберкулезом, а аллеля DRB1* 11 защищать от его развития.

Выводы. Полученные результаты позволяют говорить о возможности влияния генетического статуса ребенка, в частности DRB1*04 и DRB1*11, на развитие заболевания туберкулезом. Начатое в данном направлении исследование является результативным и требует дальнейшего изучения.

ИММУНОГЕНОМИКА И ИММУНОФЕНОМИКА ГОСПИТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Тутельян А.В.¹, Писарев В.М.²

¹ ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, Москва, Россия

² Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, Россия

Предлагаются подходы к разработке стратегии снижения осложнений внутрибольничных инфекций (ВБИ), опасных для жизни (сепсис, синдром системного воспалительного ответа), на основе учета информативных маркеров иммуногенома и иммунофеномных биомаркеров, характеризующих функциональную активность клеток системы врожденного иммунитета. Группы потенциальных биомаркеров, отобранных для проспективных исследований, включают: (1) генетически полиморфные маркеры NKG2D, TLR2, TLR4, IL-6, IL-10 и другие (иммуногеномные маркеры), (2) иммунофеномные маркеры моноцитарных и миелоидных клеток (HLA-DR, CD88, CD14, CD33). Предполагается, что определение качественного (иммуногеном) и количественного (иммунофеном) профилей биомаркеров у больных поможет уточнить имеющийся риск развития осложнений ВБИ и выявить больных с наибольшим риском. После клинической валидации, такая стратегия может быть положена в основу персонализированного подхода для оптимизации применения специализированных или дорогостоящих высокотехнологичных профилактических/ранних терапевтических мероприятий с учетом риска развития смертельных осложнений ВБИ у конкретного больного.