

На правах рукописи

КАРПОВА
Анна Валерьевна

**СОЧЕТАННЫЙ АНАЛИЗ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА
ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ *TNFA*, *IL4*, *IL5* и HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ
АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА.**

14.00.36 - Аллергология и иммунология
14.00.11 - Кожные и венерические болезни

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск - 2009

Работа выполнена в Учреждении РАМН Научно-исследовательском институте клинической и экспериментальной лимфологии и Учреждении РАМН Научно-исследовательском институте клинической иммунологии Сибирского отделения РАМН

Научные руководители:

академик РАМН, профессор,
доктор медицинских наук

Владимир Иосифович Коненков

доктор медицинских наук

Наталья Николаевна Свечникова

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Константин Валентинович Гайдунь

доктор медицинских наук, профессор

Александр Иванович Новиков

Ведущая организация: Сибирский государственный медицинский университет

Защита состоится 24 декабря 2009 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 при НИИ клинической иммунологии СО РАМН по адресу: 630099, г.Новосибирск, ул.Ядринцевская, 14

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ клинической иммунологии СО РАМН (630099, г.Новосибирск, ул.Ядринцевская, 14)

Автореферат диссертации разослан " _____ " _____ 2009 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук

Ольга Тимофеевна Кудаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: Атопический дерматит – хроническое заболевание, начинающееся в раннем детском возрасте, продолжающееся в течение всей жизни или до пубертатного периода и характеризующееся стадийностью развития воспалительного процесса кожи. Болезнь сопровождается поражением не только кожи, но и многих других органов и систем, существенно влияет на качество жизни больных (Lewis–Jones M.S. et al., 2001, Hanifin J.M., 2002).

Уровень заболеваемости атопическим дерматитом остается высоким. Возросло количество больных тяжелыми, инвалидизирующими формами (Торопова Н.П., и др., 1997, 2000, Hanifin J.M., 2002).

В последние годы появились работы, характеризующие состояние опорно-двигательного аппарата у детей, больных атопическим дерматитом, тогда как у взрослых больных состояние опорно-двигательного аппарата и причины его изменений остаются мало изученными (Торопова Н.П., 2000).

В последнее десятилетие подробно освещена роль цитокинов в возникновении клинических проявлений атопического дерматита. Различными исследователями изучались ассоциации полиморфизма аллельных вариантов генов цитокинов с атопическим дерматитом. Выявлены как положительные ассоциации (Tanaka K. et al., 2001, Novak N. et al., 2002, Wilkowska A. et al., 2003, Oiso N. et al., 2000), так и их отсутствие (Reich K., 2003, Elliot K. et al., 2001, Oiso N., et al. 2000). В связи с этим целесообразно проанализировать аллельный полиморфизм генов цитокинов, принимающих непосредственное участие в развитии атопического дерматита - *IL4*, *IL5*, *TNFA*.

Обнаружена связь атопических заболеваний с определенными антигенами главного комплекса гистосовместимости, в частности

установлена положительная ассоциация атопического дерматита с антигенами HLA A24, -B5, -B9, -B12 и -B27 (Leung D.Y.M, 1996).

Цель исследования: Оценить информативность сочетанного выявления аллелей генов цитокинов *IL4*, *IL5*, *TNFA* и HLA-комплекса для прогноза развития различных вариантов течения атопического дерматита.

Задачи исследования:

1. Изучить характер распределения аллельных вариантов генов цитокинов *IL4*, *IL5*, *TNFA* среди больных атопическим дерматитом и среди здоровых лиц.
2. Определить ассоциированность аллельных вариантов регуляторных участков генов цитокинов *IL4*, *IL5*, *TNFA* с признаками дисплазии соединительной ткани системного характера и вариантами клинического течения у больных атопическим дерматитом .
3. Исследовать характер распределения HLA–антигенов среди больных атопическим дерматитом и степень их ассоциированность с вариантами клинического течения заболевания.
4. Оценить значимость выявления аллелей промоторных участков генов цитокинов *IL4*, *IL5*, *TNFA* и HLA-комплекса в прогнозе течения атопического дерматита.

Научная новизна: Впервые получены данные о распределении аллельных вариантов промоторных регионов генов *TNFA*, *IL4*, *IL5* в точках полиморфизма *TNFA* G-308A, *IL4* C-590T, *IL5* C-703T в популяции сибирских европеоидов и проведён сравнительный анализ характера их распределения с другими европеоидными популяциями по данным литературы, осуществлён анализ неравновесного сцепления аллелей генов *TNFA* и генов HLA-DRB1, -DQA1 и -DQB1, расположенных на одном участке короткого плеча хромосомы 6q.

Установлено, что генетические факторы риска развития atopического дерматита ассоциированы не только с аллелями генов HLA-комплекса, но и с SNP полиморфизмами промоторных регионов генов цитокинов с про- и противовоспалительной активностью.

Выявлены ассоциации клинического полиморфизма atopического дерматита, вариантов его течения, связанных с наличием или отсутствием дисплазий соединительной ткани, с развитием в коже морфологических элементов пролиферативного характера, с уровнем IgE с аллельными вариантами исследованных генов и их комбинаций.

Практическая значимость: Полученные данные об ассоциированности аллельных вариантов генов цитокинов и HLA-комплекса с atopическим дерматитом позволяют использовать их в качестве дополнительных скрининговых тестов для выявления генетических факторов риска развития болезни в педиатрической практике и в семейной медицине.

Наличие ассоциированности аллельных вариантов исследованных генов с вариантами течения atopического дерматита может быть использовано в дерматологии для прогноза варианта течения болезни на ранних этапах возникновения заболевания.

Положения, выносимые на защиту:

1. Носительство генотипа -590ТТ *IL4* является важным фактором генетической предрасположенности к развитию atopического дерматита. Аллель -308 G гена *TNFA* ассоциирован с тяжелым характером течения atopического дерматита, тогда как носительство «мутантного» аллеля 308А гена *TNFA* играет протективную роль в развитии тяжелого характера течения atopического дерматита.
2. Выявленные признаки неравновесного сцепления ряда генов *DRB1*, *DQA1*, *DQB1* и гена *TNFA* в позиции -308, характерные для здоровых

лиц, значительно реже выявляются среди пациентов с атопическим дерматитом, для которых достоверно наличие иных двухлокусных гаплотипов.

3. Значительные изменения в частотах встречаемости как отдельных аллелей генов *TNFA*, *IL4*, *IL5* и *HLA-DRB1*, *-DQA1*, *-DQB*, так и их 2-х и 3-х локусных гаплотипов, позволяет использовать разработанные на этой основе иммуногенетические критерии в прогнозе вариантов клинического течения атопического дерматита.

Объем и структура диссертации: Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с изложением материалов и методов исследования с описанием клинической характеристики обследуемых больных, главы результатов собственных исследований, обсуждения результатов и выводов. Список литературы включает 218 источников (из них 81 отечественных и 137 зарубежных). Работа изложена на 118 страницах машинописного текста.

Апробация работы и публикации: По материалам диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 2 статьи в журналах, определённых ВАК РФ для опубликования результатов соискателей учёной степени кандидата медицинских наук.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика обследованных групп. Обследовано 120 больных атопическим дерматитом, находившихся на лечении в городе Новосибирске, из них 55 мужчин и 65 женщин. В группе исследованных при оценке анамнеза получены данные о характере и начале течения заболевания, частоте обострений, наличии сопутствующих заболеваний.

Группу контроля составили 210 здоровых европеоидов, проживающих в Западной Сибири, в возрасте от 18 до 45 лет, средний возраст составил 31 год.

Методы клинического анализа пациентов с атопическим дерматитом. Клинико-диагностические критерии установления диагноза соответствовали общепринятым методам. Интенсивность поражения кожи оценивалась по бальной системе SCORAD и вносили в индивидуальную карту.

Больные были разделены на 3 группы в соответствии с тяжестью поражения кожи: в 1-ой группе интенсивность поражения кожи составила до 30 баллов SCORAD (36 человек). Во 2-ой группе - от 30 до 50 баллов (56 человек), в 3-ей группе - более 50 баллов (28 человек).

Клинические формы в зависимости от преобладания отдельных морфологических элементов определяли по классификации Т.А. Гариной и К.Н. Суворовой и соавт. (1989). Эритематосквамозная без лихенификаций встретилась у 32, эритематосквамозная с лихенификациями – у 28, лихеноидная – у 37, и пруригинозная – у 23 пациентов.

По степени тяжести больных атопическим дерматитом разделили на 3 группы - легкого течения (36 пациентов), средней тяжести (56 пациентов) и тяжелого течения (28 человек).

По уровню IgE в сыворотке крови больных атопическим дерматитом разделили на две группы - 1 группа – с нормальным уровнем IgE (65 человек), 2 группа – с повышенным IgE (55 человек).

По степени выраженности дисплазии соединительной ткани больных разделили на две группы: первая – имеющих 1-2 признаков дисплазии соединительной ткани (53 человека) и вторая – больше двух признаков (67 человек).

Методы исследования иммуноглобулина Е в сыворотке крови

Для количественного определения общего IgE в сыворотке человека использовали набор «Тест-система для определения общего IgE».

Метод выделения ДНК из периферической крови

Геномную ДНК выделяли из цельной венозной крови методом высаливания с протеиназой К (Green E.D., 1990, Savage D., 1993).

Методы исследования аллельного полиморфизма генов цитокинов. Исследованы полиморфные варианты генов цитокинов: *IL4* C-590T, *IL5* C-703T, и *TNFA* G-308A. Генотипирование аллельных вариантов осуществляли методом рестриктоного анализа продуктов амплификации (ПДРФ - анализ), используя последовательности праймеров и параметры температурных циклов, описанные в литературе и учитывая рекомендации производителя использованного в работе амплификатора “i-Cycler“ (“BioRad”, США) (табл.1).

Таблица 1.

Характеристики исследованных полиморфизмов.

Ген	Полиморфизм	Структура праймеров	Фермент рестрикции	Литература
<i>IL4</i>	C-590T	5'-actaggcctcacctgatacg-3' 5'-gttgtaatgcagtcctcctg-3'	Bsm FI ¹	Cantagrel A. et al, 1999.
<i>IL5</i>	C-703T	5'-caggagagccaatcagt-3' 5'-atgatgtccagactccaggatct-3'	Alw NI ¹	Rioux J. D., 1998.
<i>TNFA</i>	G-308A	5'-ggcaataggtttgagggccat-3' 5'-acactccccatcctcccggct -3'	Bsp19 I ²	Patino-Garcia A. et al, 1999.

Примечания: 1- производство “New England Biolabs”, Великобритания; 2 – производство “СибЭнзим”, Новосибирск.

Методы исследования полиморфизма HLA-комплекса.

Генотипирование DRB1, DQA1, DQB1 осуществляли методом аллель-специфической амплификации с сиквенс-специфическими праймерами (PCR-mSSP) (Alexeev A. et al. 1996), с использованием тест-систем АО "ДНК-технология", Москва. Панели позволяют тестировать 13 аллелей гена DRB1, 12 аллелей гена DQB1 и 8 аллелей гена DQA1.

Статистические методы обработки данных. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга (РХВ) с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали критерий χ^2 . Уровень статистической значимости принимали $p \leq 0,05$.

Обработка результатов генетических исследований осуществлялась с использованием критерия отношения шансов OR [Mehta C.R., 1985]. Все расчеты проводили с помощью программ «STATISTICA for Windows 6.0» и «Microsoft Excel XP».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение аллелей гена TNFA в позиции G-308A среди здоровых лиц и больных atopическим дерматитом.

Исследование проведено среди 120 здоровых европеоидов Западной Сибири (55 мужчин, 65 женщин).

Выявлено преобладание частоты гомозиготного варианта GG (84,2%) над гетерозиготным AG (14,2%) и гомозиготным AA (1,6%).

Полученные нами результаты исследования характера генотипов TNFA у здоровых лиц отражает закономерности, полученные как в европеоидных, так и в монголоидных популяциях, среди которых генотип GG также является преобладающим.

Исследование проведено у 52 больных атопическим дерматитом (22 мужчины, 30 женщин).

Среди больных атопическим дерматитом выявлено преобладание лиц, имеющих гомозиготный вариант GG гена *TNFA*, гетерозиготный вариант GA имели 5,75% больных, гомозиготный вариант – AA имели 5,75% пациентов. Выявлена близкая к достоверной ($p=0,06$) тенденция к снижению частоты встречаемости гетерозиготного варианта GA у пациентов с атопическим дерматитом за счёт увеличения обоих гомозиготных вариантов гена *TNFA*.

Характеристики распределения аллелей и генов TNFA в позиции G-308A среди пациентов с различными вариантами клинического течения атопического дерматита.

Исследование проведено в группе 52 больных атопическим дерматитом (22 мужчин и 30 женщин).

Таблица 2.

Частота встречаемости генотипов и аллелей G-308A *TNFA* среди больных атопическим дерматитом с легким и тяжелым вариантами течения.

Полиморфизм генов интерлейкинов	Аллель/генотип	Частота аллелей и генотипов в долях единицы при различных вариантах течения		OR	DK	P
		Лёгкий (N=13)	Тяжёлый (N=18)			
<i>TNFA</i> -308 (G→A)	G	0.77	0.972	-10,50	-1,0	0,0168
	A	0.23	0.028	10,5	9,2	0,0168
	GG	0.692	0.944	-7,55	-1,3	0,0757
	AG	0.154	0.056	3,09	4,4	0,3123
	AA	0.154	0	8,04	8,4	0,1677

Примечание: достоверные отличия результатов при $p < 0, 05$.

Выявлена ассоциированность аллеля -308 G гена *TNFA* с тяжелым вариантом течения атопического дерматита (табл.2), в то время как

носительство «мутантного» аллеля 308А гена *TNFA* играет протективную роль в развитии тяжелого характера течения атопического дерматита.

Распределение аллельных вариантов гена IL4 в позиции С-590Т среди здоровых лиц и больных атопическим дерматитом.

Анализ распределения генотипов *IL4* в позиции С-590Т среди 140 здоровых лиц европейского происхождения, проживающих в Новосибирской области, выявил преобладание гомозиготного СС варианта (61.42%) над гетерозиготным СТ (34.29%). Аллель -590Т (h=0.2143) встречается в данной группе в 3,5 раза реже, чем аллель -590С (h=0.7857).

Исследование проведено среди 31 больных атопическим дерматитом (14 мужчин и 17 женщин).

Выявлено статистически значимое снижение частоты аллеля -590С в группе больных атопическим дерматитом по сравнению с контрольной группой. Частота аллеля -590Т среди больных атопическим дерматитом более чем в 2,5 раза превосходит частоту данного аллеля в группе практически здоровых лиц.

Установлено статистически значимое преобладание гомозиготного генотипа ТТ (32,26%) и достоверное снижение частоты гомозиготного генотипа СС среди больных атопическим дерматитом (22,58%), по сравнению с контрольной группой.

Таблица 3.

Частота встречаемости генотипов и аллелей С-590Т *IL4* в группах больных атопическим дерматитом и здоровых европейцев Западной Сибири.

Полиморфизм генов	Аллель/генотип	Частота аллелей и генотипов в долях единицы	OR	DK	P
-------------------	----------------	---	----	----	---

интерлейкинов		Больные атопическим дерматитом (N=31)	Здоровые лица (N=140)			
<i>IL4</i> -590 (C→T)	C	0.4516	0.7857	-4,45	-2,4	0,0001
	T	0.5484	0.2143	4,45	4,1	0,0001
	CC	0.2258	0.6142	-5,46	-4,3	0,0001
	CT	0.4516	0.3429	1,54	1,2	0,0846
	TT	0.3226	0.0429	10,63	8,8	0,0001

Примечание: достоверные отличия результатов при $p < 0, 05$.

Можно предположить, что ассоциированность аллельного варианта T в данной точке полиморфизма регуляторной зоны гена *IL4* с высоким уровнем внутриклеточной экспрессии самого *IL4* и высоким уровнем его продукции во внеклеточную среду, приводит к тому, что носители данного аллельного варианта являются лицами с высоким содержанием в тканях этого Th2 цитокина с противовоспалительной активностью.

Распределение аллельных вариантов гена IL5 в позиции C-703T среди здоровых лиц и больных атопическим дерматитом.

Среди 137 здоровых европеоидов Западной Сибири, из них 65 мужчины и 72 женщины установлено преобладание генотипа CC(55%), CT составил 38%, и 7% - TT. Подобное соотношение генотипов выявлено в европеоидных популяциях.

Исследование распределения C-703T промоторного участка гена *IL5* проведено в группе 35 больных атопическим дерматитом (18 мужчин и 17 женщин).

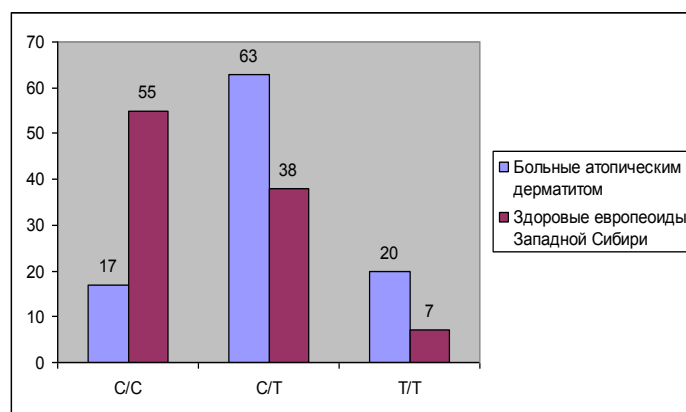


Рисунок 1. Частота встречаемости генотипов С-703Т *IL5* среди больных атопическим дерматитом и здоровых лиц.

Результаты сравнительного анализа показали высоко достоверное снижение частоты выявления гомозиготных генотипов СС (17%) среди больных атопическим дерматитом по сравнению со здоровыми лицами (55%). Наряду с этим у пациентов достоверно чаще встречался гетерозиготный вариант СТ (63%). Выявлена тенденция к повышению частоты встречаемости гомозиготного варианта ТТ по сравнению с контрольной группой, однако, выявленные различия не достоверны.

Характеристика распределения гена *IL5* в позиции С-703Т среди пациентов с различными вариантами клинического течения атопического дерматита.

Проведен сравнительный анализ частоты встречаемости генотипов и аллелей С-703Т *IL5* среди 35 больных атопическим дерматитом с различными вариантами тяжести течения заболевания. В группе больных с лёгким течением (12 человек) заболевания по сравнению со среднетяжёлым течением (10 человек) достоверно чаще встречался генотип СТ ($p=0,0433$), и достоверно реже генотип ТТ ($p=0,0287$).

Распределение аллельных вариантов HLA-комплекса среди здоровых лиц и больных atopическим дерматитом.

Изучены особенности распределения аллельных вариантов HLA-комплекса 88 пациентов (42 мужчины и 46 женщин). Контрольную группу составили 210 здоровых европеоидов Западной Сибири (102 мужчины и 108 женщины).

Выявлены достоверные различия в частоте встречаемости указанных генов в группе больных atopическим дерматитом и доноров: HLA-DQB1*0201 достоверно чаще встречали в группе доноров. Среди больных atopическим дерматитом и доноров выявлены следующие различия: аллели DQA1*0102, DQB1*0302, DR13, DQA1*0301, DQA1*0501 и генотипы DQB1*0301-DQB1*0302, DRB1*01-DRB1*11 достоверно чаще обнаруживали в группе больных atopическим дерматитом (таблица 4).

Анализ частоты встречаемости показал, что двухлокусные гаплотипы DRB1*04-DQB1*0302, DQA1*0103-DQB1*0602-8 и DQA1*0301-DQB1*0302 встречаются достоверно чаще в группе больных atopическим дерматитом. Напротив, частота встречаемости ассоциации DRB1*15-DQA1*0102 была достоверно выше в группе доноров.

Гаплотипы DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302 и DRB1*15-DQA1*0103-DQB1*0602-8 достоверно чаще выявляли среди больных atopическим дерматитом по сравнению с группой здоровых доноров, тогда как гаплотип DRB1*15-DQA1*0102-DQB1*0602-8 доминировал в группе здоровых лиц.

Таблица 4.

Частота встречаемости (%) гаплотипов HLA локусов DRB, DQA, DQB в группах больных atopическим дерматитом и здоровых европеоидов Западносибирского региона.

HLA гаплотип :	Частота (h) в группе больных atopическим дерматитом (n=88)	Частота (h) в группе здоровых доноров (n=210)	p	OR	DK
DRB1*15-DQA1*0102	0,045	0,128	0,015	-3,10	-4,5
DRB1*04-DQB1*0302	0,102	0,043	0,033	2,54	3,8
DQA1*0103-DQB1*0602-8	0,170	0,090	0,024	2,07	2,8
DQA1*0301-DQB1*0302	0,102	0,043	0,033	2,54	3,8
DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302	0,102	0,043	0,033	2,54	3,8
DRB1*15-DQA1*0102-DQB1*0602-8	0,045	0,116	0,024	-2,84	-4,2
DRB1*15-DQA1*0103-DQB1*0602-8	0,068	0,016	0,018	5,05	6,8

Примечание: достоверные отличия результатов при $p < 0,05$

Сравнительный анализ распределения генов HLA-комплекса II класса среди пациентов с различными вариантами клинического течения atopического дерматита.

Изучены распределения генов HLA-комплекса II класса у 30 больных atopическим дерматитом. Эритематосквамозная форма заболевания без лихенификаций встречалась у 15 больных, эритематосквамозная с лихенификациями встретилась у 7 человек, лихеноидная – у 5 и пруригинозная – у 3 больных. Группы были объединены по выраженности пролиферативных процессов в эпидермисе на эритемато-сквамозную и пруригинозно-лихеноидную формы заболевания.

Анализ полученных результатов показал, что аллели HLA-A3, DR11; генотип DR11/DR16; гаплотипы A2/B49, A3/B7, A9/B27, A0/DR11, A2/DR11, A3/DR16, A9/DR2, A9/DR11, B7/DR2, B27/DR11 достоверно чаще выявляются у больных с эритематосквамозной формой заболевания по сравнению с лихеноидной и пруригинозной. Определение у больного

аллелей HLA-A3, DR11, а также генотипов DR11/DR16; гаплотипов A2/B49, A3/B7, A9/B27, A0/DR11, A2/DR11, A3/DR16, A9/DR2, A9/DR11, B7/DR2, B27/DR11 свидетельствует о том, что у него будет эритематосквамозная форма заболевания. Напротив, клинические формы атопического дерматита, сопровождающиеся появлением на коже морфологических элементов, связанных с пролиферативными процессами в коже, ассоциированы с HLA-гаплотипами A0/B13, A2/DR3.

Проанализирован характер распределения HLA-антигенов и их различных комбинаций у 81 больного с различной тяжестью течения заболевания. Выявлена следующая закономерность: для больных с легким течением болезни характерно достоверное увеличение частоты встречаемости HLA-антигена B13 (RR=7.0); гаплотипов A3/B7 (RR=2.10), A3/DR2 (RR=2.71), B7/DR2 (RR=2.53), B7/DR6 (RR=3.48) и уменьшение частоты встречаемости, по сравнению с контролем, антигена DR3 (RR=-6.25). Тяжелое течение заболевания негативно ассоциировано с такими комбинациями антигенов как A2/DR3 (RR=-4.02) и B7/DR5 (RR=-6.12).

Сочетание HLA-антигена B7 с антигеном DR2 или DR6 характерно для легкого течения атопического дерматита, тогда как сочетание данного антигена с HLA-DR5 - для тяжелого течения.

Проведён анализ ассоциированности HLA II с IgE у 34 больных атопическим дерматитом (18 женщин и 16 мужчин). Выделены две группы – первую группу с нормальным уровнем IgE составили 16 человек (12 женщин и 4 мужчин), вторую группу, с повышенным уровнем IgE составили 18 человек (6 женщин и 12 мужчин). При сравнительном анализе частоты встречаемости антигенов HLA-A, и -B достоверных ассоциаций выявлено не было. Для HLA -DR локусов в группе больных атопическим дерматитом выявлена достоверно значимая ассоциация HLA-

антигена DRB1-0602-8 и повышенного уровня IgE -, а также HLA DQ B1 0602-8 - 31,25 и 64,71.

В группах с минимальными и максимальными проявлениями дисплазий соединительной ткани отмечены следующие достоверные отличия: аллель HLA-DR2 и HLA-генотип DR2/DR3; HLA-гаплотипы A9/B15, A2/DR2, A2/DR3, A9/DR15, B13/DR2 чаще выявляются у больных с выраженными проявлениями дисплазии соединительной ткани. Отмечено достоверное преобладание HLA-DR7 и HLA-гаплотипов A2/B0, A2/DR7, A10/DR7, B0/DR5 , B13/DR5 у больных с минимальными проявлениями дисплазии соединительной ткани, что позволило рассматривать наличие указанных генов и гаплотипов как признаки благоприятного течения атопического дерматита.

Неравновесное сцепление аллелей гена TNFA в позиции G-308A с аллелями генов HLA- DRB1, DQA1 и -DQB1 среди здоровых сибирских европеоидов и больных атопическим дерматитом.

Анализ частоты встречаемости четырёхлокусных гаплотипов DRB1-DQA1-DQB1- TNFA показал, что частота гаплотипов DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201- TNFA -308 А и DRB1*15-DQA1*0102-DQB1*0602-8- TNFA -308 G выше в контрольной группе по сравнению с группой больных атопическим дерматитом, что указывает на протективное значение данных гаплотипов в отношении развития атопического дерматита.

Таблица 5

Частота встречаемости (h) гаплотипов HLA генов DRB1, DQA1, DQB1 и TNFA (-308) в группах больных атопическим дерматитом и здоровых европеоидов Западной Сибири.

HLA-TNF гаплотипы	Больные	Здоровые	Р	ОР	ДК
-------------------	---------	----------	---	----	----

DRB1*13- TNFA(-308)G	0,159	0,083	0,023	2,15	2,9
DQA1*0101- TNFA(-308)A	0,062	0,005	0,008	7,61	8,5
DQB1*0201- TNFA(-308)G	0,087	0,161	0,041	-1,93	-2,5
DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201- TNFA(-308)A	0,011	0,048	0,028	-9,27	-9,5
DRB1*15-DQA1*0102-DQB1*0602-08- TNFA(-308)G	0,045	0,116	0,031	-2,71	-4,0

Примечание: ОР – относительный риск заболевания, ДК – диагностический коэффициент.

Прогностическая значимость выявления в генотипе пациентов с атопическим дерматитом аллельных вариантов генов цитокинов TNFA, IL4, IL5 и генов HLA-комплекса.

Исследование генотипа аллельных вариантов генов цитокинов TNFA, IL4, IL5 и генов HLA-комплекса может служить прогностическим признаком того или иного варианта течения заболевания.

Выявление аллеля -308 G гена TNFA свидетельствует о высокой вероятности тяжелого варианта течения атопического дерматита.

Тестирование аллеля -590T IL4 у потомков больных атопическим дерматитом может свидетельствовать о наличии или отсутствии предрасположенности к данному заболеванию.

Наличие HLA- антигенов DRB1-0602-8, HLA DQ B1 0602-8 - 31,25 и 64,71 свидетельствует о развитии варианта атопического дерматита с повышенным уровнем IgE.

Ранним прогностическим признаком лёгкого характера течения атопического дерматита является сочетание HLA- антигена B7 с антигеном DR2 или DR6, а сочетание HLA-антигена B7 с антигеном DR5 характерно для тяжелого течения атопического дерматита.

Наличие аллеля HLA-DR7 и HLA-гаплотипов A2/B0, A2/DR7, A10/DR7, B0/DR5, B13/DR5 следует рассматривать как ранние прогностические признаки развития диспластических процессов в соединительной ткани, не сопровождающихся системностью. Таким образом, выявление этих генов позволит прогнозировать и более благоприятное течение atopического дерматита, не сопровождающегося диспластическими процессами во внутренних органах.

Сочетание гаплотипов DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201- *TNFA* -308 А и DRB1*15-DQA1*0102-DQB1*0602-8- *TNFA* -308 G напротив, свидетельствует о малой вероятности развития atopического дерматита.

ВЫВОДЫ

1. Факторами риска развития atopического дерматита в популяции сибирских европеоидов являются наличие в геноме пациента генотипа AA в промоторной зоне гена *TNFA* G -308A, ассоциированного с высоким уровнем продукции этого провоспалительного цитокина, аллеля T и генотипа TT в полиморфной позиции C-590T гена *IL4*, аллеля T и генотипа TT полиморфного участка C-703T гена *IL5*, генотипов DRB1*04-DQB1*0302 и DRB1*15-DQA1*0103-DQB1*0602-8 генов HLA комплекса.

2. Протективную роль в развитии atopического дерматита играют: наличие в геноме пациента генотипа AG в промоторной зоне гена *TNFA* G -308A, аллеля C и генотипа CC полиморфного участка C-590T гена *IL4*, аллеля C и генотипа CC полиморфного участка C-703T гена *IL5*, генотипов DRB1*15-DQA1*0102 и DRB1*15-DQA1*0102-DQB1*0602-8 генов HLA комплекса.

3. Вариант длительного тяжелого течения atopического дерматита ассоциируется с наличием в геноме пациента аллеля G и генотипа GG в промоторной зоне гена *TNFA* G -308A, сцепленного с низким уровнем продукции этого провоспалительного цитокина, генотипа TT

полиморфного участка С-703Т гена *IL5* и HLA-специфичностей -A9, -DR3, A2-DR3, В7-DR5.

4. Среди пациентов с atopическим дерматитом в значительной части выявляются клинические проявления дисплазии соединительной ткани, ассоциированной с наличием в геноме генотипа ТТ полиморфного участка С-703Т гена *IL5* и HLA-специфичностей - DR2, A2-DR3, A9-DR15, В13-DR2.

5. Среди пациентов с atopическим дерматитом установлено наличие неравновесного сцепление аллелей гена *TNFA* в позиции G-308А с аллелями генов HLA - DRB1, DQA1 и -DQB1, расположенными на одном участке хромосомы 6q по аллелям DRB1*13-*TNFA*-308G и DQA1*0101-*TNFA* -308, не характерное для здоровых лиц.

6. Комплексное типирование генов цитокинов с про- и противовоспалительной активностью и генов главного комплекса гистосовместимости позволяет выявить генетическую предрасположенность к развитию atopического дерматита и развития болезни.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В педиатрической практике и в семейной медицине при появлении начальных признаков системных нарушений состояния кожных покровов целесообразно проводить генотипирование пациента по участкам полиморфизма генов *TNFA*, *IL4*, *IL5* и HLA-комплекса для выявления генетических факторов риска развития atopического дерматита.

2. На начальных этапах установлении диагноза atopического дерматита рекомендуется проводить генотипирование исследованных полиморфизмов генов цитокинов и главного комплекса гистосовместимости для установления дальнейшего варианта его клинического течения и предрасположенности к дисплазиям соединительной ткани.

3. Лечение атопического дерматита рекомендуется проводить с учетом генетических данных о преимущественном характере его клинического течения и выраженности диспластических нарушений соединительной ткани.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Коненков В.И., Свечникова Н.Н., Карпова А.В. Роль аллельного полиморфизма генов цитокинов в развитии атопического дерматита Система цитокинов. Теоретические и практические аспекты / Под ред. В.А.Козлова, С.В.Сенникова. – Новосибирск: Наука, 2004. – 324 с. –С.49-61.
2. Свечникова Н.Н., Карпова А.В. Отдаленные результаты наружной терапии больных атопическим дерматитом элиделом. IX Всероссийский съезд дерматовенерологов. Тезисы научных работ. Т.1. Москва. - 2005– С.34.
3. Карпова А.В., Коненков В.И., Свечникова Н.Н. Ассоциированность аллелей С-590Т IL-4 с различной тяжестью течения атопического дерматита/ Материалы научных трудов I Международного форума медицины и красоты 17-19 ноября 2006 года – Москва – С.131-132.
4. Коненков В.И., Карпова А.В., Свечникова Н.Н., Голованова О.В., Прокофьев В.Ф Ассоциированность аллелей гена фактора некроза опухоли (G- 308 А) с HLA-антигенами локусов DRB1, DQA1, DQB1 у больных атопическим дерматитом. Иммунология. – 2007. - №6. – С.331-335
5. Коненков В.И., Свечникова Н.Н., Карпова А.В., Прокофьев В.Ф. Ассоциированность аллелей (G-308) гена *TNFA* с пролиферативными и диспластическими процессами при атопическом дерматите. Генетика человека и патология // Сборник научных трудов под редакцией В.П. Пузырева. Выпуск 8 - Томск. - Издательство «Печатная Мануфактура» - 2007 – С.85 – 88.

6. Карпова А.В., О.В.Голованова Свечникова Н.Н., В.Ф.Прокофьев, В.И.Коненков Ассоциированность аллелей гена фактора некроза опухолей *TNFA* с HLA- антигенами у больных атопическим дерматитом/ Генетика человека и патология // Сборник научных трудов под редакцией В.П. Пузырева. Выпуск 8 - Томск. - Издательство «Печатная Мануфактура» - 2007 – С.84 – 85.
7. Карпова А.В., Н.Н.Свечникова, В.Ф.Прокофьев, В.И.Коненков Генотипы и аллели G – 308A *TNFA* у больных атопическим дерматитом с различным характером течения заболевания //Российский иммунологический журнал – 2008 – том 2 (11), № 2-3 – С.216
8. Карпова А.В., Н.Н.Свечникова, В.Ф.Прокофьев, В.И.Коненков Иммуногенетическая характеристика больных атопическим дерматитом с разной степенью выраженности диспластических процессов //Российский иммунологический журнал – 2008 – том 2 (11), № 2-3 –С.225.
9. Карпова А.В., Н.Н.Свечникова, В.Ф.Прокофьев, В.И.Коненков Иммуногенетические особенности атопического дерматита при разной степени выраженности пролиферативных и диспластических процессов. // Тезисы международной конференции "Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии" - 2008.- С.164-167.
10. Коненков В.И., Голованова О.В., Дортман В.В., Шевченко А.В., Карпова А.В. Полиморфизм гена *TNFA* и неравновесное сцепление *TNFA* и HLA-генов II класса (*DRB1*, *DQA1* и *DQB1*) в популяции сибирских европеоидов // Иммунология - 2008 – N 1. - С.6-10.