

# Анализ ассоциаций полиморфизма *C1159A* гена интерлейкина *12B* с сахарным диабетом 1 типа в этнических группах Башкортостана

Ж.Р. Балхиярова, Т.В. Моругова\*, Д.Ш. Авзалетдинова\*, О.Е. Мустафина

Институт биохимии и генетики УНЦ РАН;

\*Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

Сахарный диабет 1 типа (СД 1) – одна из наиболее острых научных и медико-социальных проблем. Существуют различные точки зрения на этиологию и патогенез заболевания. Известно, что СД 1 развивается при воздействии факторов окружающей среды на генетически предрасположенный организм, при этом вклад наследственности в развитие заболевания составляет 60–80% [1]. Заболевание развивается в результате аутоиммунной деструкции  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. Критическую роль в инициации их гибели играют цитокины. При СД 1 происходит увеличение выработки интерлейкина 12 (ИЛ-12) активированными макрофагами. Этот процесс провоцирует дифференцировку  $T_0$ -хелперов в  $T_1$ -хелперы, которые посредством цитокинов активируют макрофаги и цитотоксические Т-лимфоциты, а последние, в свою очередь, способствуют гибели  $\beta$ -клеток и развитию абсолютного дефицита инсулина.

На лабораторных животных была показана роль ИЛ-12 в развитии СД 1. В исследованиях, которые проводили на изолированной поджелудочной железе крыс и мышей, выявлено, что ИЛ-12 подавляет выработку инсулина у здоровых животных [2]. А. Davoodi-Semigomi и соавт. продемонстрировали взаимосвязь между уровнем экспрессии гена *ИЛ12* и степенью деструкции инсулинпродуцирующих клеток у NOD-мышей (non-obese diabetic mice – экспериментальная модель аутоиммунного диабета) [3].

ИЛ-12 состоит из двух полипептидных цепей, соединенных между собой дисульфидными связями: тяжелая цепь р40 (40кДа) и легкая цепь 35р (35кДа). Ген, кодирующий субъединицу р40 (*ИЛ12B*), локализован на хромосоме 5q31.1–q33.1 и ограничен регионом 30 кб, а ген субъединицы р35 (*ИЛ12A*) – на хромосоме 3 (3p12–q13.2).

При обследовании семей больных СД 1 показано строгое неравновесие по сцеплению для аллеля А полиморфизма *C1159A*. Однако выявлена взаимосвязь аллеля С и генотипа АС с поздним началом заболевания [4, 5]. Согласно результатам отдельных работ, аллель А ассоциирован с более высоким уровнем экспрессии мРНК гена *ИЛ12* [6, 7, 8]. В частности,

уровень экспрессии мРНК клеточной линии с генотипом АА выше, чем линии с генотипом СС [6]. В связи с этим полагают, что полиморфизм *C1159A* гена *ИЛ12B* имеет функциональное значение. Однако такая точка зрения не подтверждается результатами другого исследования [9].

Цель настоящего исследования заключалась в анализе ассоциаций полиморфизма *C1159A* гена *ИЛ12B* с развитием СД 1 в трех этнически однородных группах (русские, башкиры, татары), проживающих на территории республики Башкортостан.

## Объект и методы исследования

В исследовании приняли участие 313 пациентов в возрасте от 7 до 71 года (татар – 127, русских – 110, башкир – 66), в том числе мужчин – 155, женщин – 158. Возраст начала заболевания варьировал от 2 до 61 года. Выборка была сформирована из больных СД 1, находящихся на диспансерном учете в поликлиниках города Уфы и районов республики Башкортостан. В группу сравнения были включены практически здоровые лица, не родственные между собой и не имеющие родственников больных СД.

ДНК выделяли методом фенольно-хлороформной экстракции [10]. У всех пациентов, включенных в исследование, а также у всех лиц группы сравнения был исследован полиморфизм *C1159A* гена *ИЛ12B*. Анализ полиморфизма *C1159A* гена *ИЛ12B* осуществляли методом полимеразной цепной реакции, последовательности праймеров, условия ПЦР и процедура анализа продуктов амплификации соответствовали приведенным ранее [11]. Статистическую обработку материалов проводили с использованием программ Microsoft Excel 2000, Statistica (v 5.5). Соответствия эмпирического распределения частот генотипов теоретически ожидаемому распределению оценивали по критерию  $\chi^2$  [12, 13]. Сравнение групп по частотам аллелей и генотипов проводили с использованием точного двустороннего критерия Фишера. Относительный риск заболевания рассчитывали как отношение шансов (OR – odds ratio) [14].

Таблица 1

Результаты анализа ассоциаций полиморфизма *C1159A* гена *IL12B* с сахарным диабетом 1 типа у этнических татар, русских и башкир

Этническая принадлежность	Генотип	Контроль		Больные		p
		n	$p_i \pm s_{pi}$ , CI, %	n	$p_i \pm s_{pi}$ , CI, %	
Татары	AA	166	58,04±0,64 (0,03–0,52)	74	58,27±0,67 (0,04–0,49)	1,000
	AC	109	38,11±0,44 (0,03–0,32)	49	38,58±0,48 (0,04–0,30)	1,000
	CC	11	3,58±0,07 (0,01–0,02)	4	3,15±0,08 (0,01–0,02)	1,000
	A	441	77,1±0,8 (0,02–0,73)	197	77,56±0,83 (0,03–0,72)	0,928
	C	131	22,9±0,27 (0,02–0,2)	57	22,44±0,28 (0,03–0,18)	0,928
Русские	AA	227	65,99±0,7 (0,02–0,60)	80	68,38±0,77 (0,04–0,59)	0,652
	AC	99	28,78±0,34 (0,02–0,24)	28	23,93±0,33 (0,04–0,17)	0,340
	CC	18	5,23±0,08 (0,01–0,03)	9	7,69±0,14 (0,02–0,04)	0,362
	A	553	80,38±0,83 (0,02–0,77)	188	80,34±0,85 (0,03–0,75)	1,000
	C	135	19,62±0,23 (0,02–0,17)	46	19,66±0,25 (0,03–0,15)	1,000
Башкиры	AA	92	66,2±4,01 (57,68 – 73,99)	39	60,0±6,07 (47,1–72,0)	0,434
	AC	40	28,78±3,83 (21,42–37,06)	26	40,0±6,07 (28,0–52,9)	0,148
	CC	7	5,04±1,85 (2,04–10,1)	0	–	0,100
	A	224	80,58±2,37 (75,43– 85,06)	104	80,0±3,5 (72,08–86,5)	0,894
	C	54	19,42±2,37 (14,94–24,57)	26	20,0±3,5 (13,5–27,2)	0,894

Примечание. Здесь и в табл. 2: n – численность,  $p_i$  – частота генотипа или аллеля;  $s_{pi}$  – ошибка частоты; CI, confidence interval – 95% доверительный интервал; p – вероятность нулевой гипотезы.

## Результаты и их обсуждение

Результаты типирования по полиморфизму *C1159A* гена *IL12B* здоровых лиц и больных СД 1 представлены в табл. 1. Статистически значимых различий по распределению частот аллелей и генотипов между группами больными СД 1 и практически здоровых лиц не выявлено.

В предыдущих исследованиях показаны гендерные различия в распределение частот генотипов по полиморфизму *DRB1* гена HLA класса II [15]. Согласно результатам нашего исследования, по частотам аллелей и генотипов полиморфизма *C1159A* гена *IL12B* выборки мужчин и женщин не различались (данные не приводятся).

С учетом возраста манифестации заболевания выборка больных СД 1 была разделена на 2 группы: группу пациентов, у которых заболевание манифести-

ровало в возрасте до 16 лет, и группу пациентов, заболевших в возрасте старше 16 лет (табл. 2). Как оказалось, в группе этнических русских аллель С чаще встречается у больных с поздней манифестацией СД 1 (30,5% против 17,1% в подгруппе пациентов с началом диабета в возрасте до 16 лет,  $p=0,047$ ). Более высокая частота генотипа СС в подгруппе пациентов с поздним началом заболевания по сравнению с лицами, заболевшими в возрасте до 16 лет, недостоверна, но имеет характер выраженной тенденции (14,6% и 2,3% соответственно,  $p=0,052$ ).

В этнической группе башкир среди пациентов с поздним началом заболевания по сравнению с другими пациентами с большей частотой обнаруживается генотип АС (53,6% и 33,3% соответственно,  $p=0,074$ ).

Анализ литературных данных показал, что наблюдается выраженная дифференциация популяций народов мира по полиморфизму *C1159A* гена

Таблица 2

Результаты анализа ассоциаций полиморфизма <i>C1159A</i> гена <i>IL12B</i> с сахарным диабетом 1 типа у этнических татар, русских и башкир в зависимости от возраста манифестации заболевания						
Этническая принадлежность	Генотип	Возраст манифестации				p
		до 16 лет		после 16 лет		
		n	$p_i \pm s_{p_i}$ , CI, %	n	$p_i \pm s_{p_i}$ , CI, %	
Русские	AA	30	68,18±7,02 (52,42–81,39)	22	53,66±7,79 (37,42–69,34)	0,190
	AC	13	29,55±6,88 (16,76–45,20)	13	31,71±7,27 (18,08–48,09)	1,000
	CC	1	2,27±2,25 (0,06–12,02)	6	14,63±5,52 (5,57–29,17)	0,052
	A	73	82,95±4,01 (73,45–90,13)	57	69,51±5,08 (58,36–79,20)	0,047
	C	15	17,05±4,01 (9,87–26,55)	25	30,49±5,08 (20,8–41,64)	0,047
Татары	AA	21	52,5±7,9 (36,13–68,40)	35	64,81±6,50 (50,62–77,32)	0,200
	AC	19	47,5±7,9 (31,51–63,87)	16	29,63±6,21 (17,98–43,61)	0,100
	CC	0	–	3	5,56±3,12 (1,16–15,39)	0,260
	A	61	76,25±4,76 (65,42–85,05)	86	79,63±3,88 (70,8–86,77)	0,600
	C	19	23,75±4,76 (14,95–34,58)	22	20,37±3,88 (13,23–29,20)	0,600
Башкиры	AA	14	66,67±10,29 (43,03–85,41)	13	46,43±9,42 (27,51–66,13)	0,740
	AC	7	33,33±10,29 (14,59–56,97)	5	53,57±9,42 (33,87–72,49)	0,074
	CC	0	–	0	–	–
	A	35	83,33±5,75 (68,64–93,03)	31	86,11±5,76 (70,5–95,33)	0,760
	C	7	16,67±5,75 (6,97–31,36)	5	13,89±5,76 (4,67–29,50)	0,760

*IL12B*. Распределение частот генотипов полиморфизма *C1159A* гена *IL12B* в популяциях русских, башкир и татар Башкортостана схоже с таковым в большинстве европеоидных популяций и отличается от спектра частот генотипов в популяциях негроидов и монголоидов. По изучаемому полиморфному локусу структура популяций русских и башкир, а также башкир и татар одинакова, тогда как татары и русские достоверно различаются между собой ( $\chi^2=6,353$ ,  $p=0,044$ ).

Ген *IL12B*, кодирующий один из ключевых медиаторов аутоиммунного воспаления, представляет особый интерес при изучении СД 1. В ходе проведения широкомасштабного геномного сканирования в странах Европы, его включили в число генов-кандидатов СД 1 (IDDM18). Установлено, что полиморфизм *C1159A* гена *IL12B* влияет на уровень экспрессии субъединицы  $p40$  *IL12*, уменьшается синтез инсулина и ускоряется развитие СД 1 у экспериментальных животных.

В результате проведения скандинавского геномного скрининга не было найдено связи СД 1 с полиморфизмом *C1159A* гена *IL12B*. Установлено, что у норвежцев, северных ирландцев, итальянцев, испанцев, шведов СД 1 не ассоциирован с полиморфным локусом *C1159A* гена *IL12B* [9]. Однако в данных исследованиях не учитывался возраст манифестации заболевания. Вместе с тем многими авторами показана генетическая гетерогенность СД 1 в зависимости от возраста дебюта. В настоящем исследовании в этнической группе русских выявлена стойкая тенденция к увеличению частоты генотипа *CC* и аллеля *C* в выборке пациентов с поздней манифестацией заболевания по сравнению с заболевшими в возрасте до 16 лет.

В эксперименте была показана роль ИЛ-12 в патогенезе СД 1, в частности продемонстрировано увеличение выработки ИЛ-12 активированными макрофагами. Более высокий уровень экспрессии мРНК гена *IL12* ассоциирован с аллелем *A*, а пониженный – с аллелем *C*, в чем и заключается функциональное значение

полиморфизма *C1159A* гена *ИЛ12В*. Можно предположить, что генотип *СС* и аллель *С* предрасполагают к менее агрессивному течению диабета, что проявляется в отсроченности манифестации заболевания. Соответственно, при воздействии одних и тех же средовых факторов, СД 1 развивается позднее у носителей генотипа *СС* и аллеля *С*.

Биологически активным ИЛ-12 является гетеродимер р70 или р75. При усилении экспрессии гена *ИЛ12В*, описанном некоторыми авторами, образуется избыток свободной р40 цепи. При этом возможно не только ее сочетание с *ИЛ12А*, но и самостоятельное функционирование или объединение с подобной субъединицей. Биологические эффекты свободной субъединицы р40 не достаточно изучены. Известно, что гомодимер р40 и в меньшей степени мономер р40 являются антагонистами рецептора ИЛ-12 [20]. Таким образом, в результате конкуренции субъединиц за соединение с рецептором, биологическое действие ИЛ-12 может изменяться.

Наряду с образованием гомодимера р40 и ИЛ-12 (р35р40), изучаемая субъединица входит в состав ИЛ-23 (р19р40), что также влияет на проявление функциональной активности полиморфизма гена, кодирующего субъединицу р40. Таким образом, изменение уровня экспрессии субъединицы р40 может неоднозначно сказываться

на изменениях в цитокиновом каскаде организма, и этим отчасти можно объяснить противоречивость данных разных исследователей об ассоциации полиморфизма *C1159A* гена *ИЛ12В* с СД 1.

Для понимания сложных взаимодействий между полиморфизмом *C1159A* гена *ИЛ12В*, биологическими эффектами ИЛ-12 и генетической предрасположенностью к СД 1 требуется продолжить исследование.

Таким образом, нами охарактеризован полиморфизм *C1159A* гена *ИЛ12В* у этнических русских, татар и башкир (республика Башкортостан). Распределение частот генотипов по полиморфизму *C1159A* гена *ИЛ12В* в популяциях русских, башкир и татар Башкортостана схоже с таковым в большинстве европеоидных популяций и отличается от спектра частот генотипов в популяциях народов негроидной и монголоидной групп.

У этнических татар и башкир полиморфизм *C1159A* гена *ИЛ12В* не ассоциирован с СД 1.

У этнических русских наблюдается выраженная тенденция к возрастанию частоты генотипа *СС* и достоверно большая частота аллеля *С* среди больных с поздней манифестацией СД 1. Необходимы дополнительные исследования для подтверждения ассоциации полиморфизма *C1159A* гена *ИЛ12В* с СД 1 с поздней манифестацией у этнических русских.

## Литература

1. Дедов И.И., Кураева Т.Л., Петеркова В.А. и др. // Сахарный диабет у детей и подростков – Москва 2002.
2. Sternesjo J., Sandler S. // Effects of interleukin-12 in vitro on pancreatic islets isolated from normal rodents and from non-obese diabetic mice // J. Endocrinol. – 1998. - Vol. 158. - p. 69-75.
3. Davoodi-Semiromi A., Yang J., She J. // IL-12p40 Is Associated With Type 1 Diabetes in Caucasian-American Families. // Diabetes – 2002. - Vol. 51. – p. 2334-2336.
4. Morahan G., Huang D., Ymer S.I. et al. // Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele // Nature genetics – 2001. - Vol. 27. – p. 218-221.
5. Windsor L., Morhan G., Huang D. et al. // Alleles of the IL12B 3'UTR associate with late onset of Type 1 diabetes // Human Immunol. – 2004. – Vol. 65. – p. 1432-1436
6. Wen Y., Gu J., Li S., Reddy M., Natarajan R., Nadler J. // Elevated Glucose and Diabetes promote Interleukin 12 Cytokine Gene Expression in Mouse Macrophages // Endocrinology- 2006. – Vol. 2. – p. 2518-2525.
7. Wolf S.F. et al. // Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells // J. Immunol. – 1991. - Vol. 146. – p. 3074–3081
8. Gubler U. et al. // Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1991. - Vol. 88. – p. 4143–4147.
9. Bergholdt R., Ghandil P., Johannesen J. // Genetic and functional evaluation of an interleukin-12 polymorphism (IDDM18) in families with type 1 diabetes // J. Med. Genet. – 2004. – Vol. 4.
10. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory press – 1989. - p.479.
11. Rigat B., Hubert C., Corvol P., Soubreir F. // PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (depeptidyl-carboxypeptidase 1) // Nucl Acids. Res. - 1992. – Vol. 20. - P. 1433.
12. Roff P.A., Bentzen P. // The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms chi 2 and the problem of small samples // Mol. Biol. Evol. – 1989. - Vol.6. - P.539-545.
13. Животовский Л.А. // Популяционная биометрия // Москва. Наука 1991., с. 120-137.
14. Bland J. M., Altman D.G. The odds ratio. // BMJ. 2000 - Vol. 320. - P. 1468.
15. Авзалетдинова Д.Ш., Моругова Т.В., Аглямова А.Н., Еlicheва З.М., Хуснутдинова Э.К., Мустафина О.Е. // Полиморфизм гена главного комплекса гистосовместимости класса II DRB1 и риск развития сахарного диабета типа 1 в этнических группах Башкортостана // Сахарный диабет. – 2005. - № 1. – С. 2-4.
16. Nistico L. et al. // IL12B polymorphism and type 1 diabetes in the Italian population: a case-control study // Diabetes – 2002. – Vol. 51(5) – p.1649-1650.
17. Latsi P., Pantelidis P., Vassikakis D. et al. // Analysis of IL12 p40 subunit gene and IFN- G5644A polymorphisms in Idiopathic pulmonary Fibrosis // Respiratory Research - 2003. – Vol.4.
18. Ma X, Reich R., Gonzalez O., Pan X. et al. // No evidence for association between the polymorphism in the 3' untranslated region of interleukin-12B and human susceptibility to tuberculosis // J. Infect Dis. – 2003. – Vol. 188(8). – p.1116-1118.
19. Litjens N., van der Plas M., Ravensbergen B. Et al.// Psoriasis is not associated with IL-12p70/IL-12p40 production and IL12B promoter polymorphism // J. Of Investigative Dermatology – 2004. - Vol. 122 – p. 923-926.
20. Robertson M., Ritz J. // Interleukin 12: Basic Biology and Potential Applications in Cancer Treatment // The Oncologist – 1996. - Vol. 1. - p.88 - 97.