

СПОСОБ РОДРАЗРЕШЕНИЯ КАК ФАКТОР РИСКА РЕАЛИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К АТОПИИ У ДЕТЕЙ ЯКУТИИ

Соловьева Н.А.¹, Павлова Н.И.¹, Куртанов Х.А.¹, Дьяконова А.Т.¹, Александрова Т.Н.¹,
Борисова У.П.¹

¹ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», Якутск, sonata608@yandex.ru

В статье представлены результаты впервые проведенного в якутской популяции исследования, посвященного оценке влияния способа родоразрешения на реализацию генетической предрасположенности к atopическим изменениям у детей в зависимости от аллельных вариантов генов интерлейкинов *C589T*, *G/C3'UTR* гена *IL4* и *Q551* гена рецептора *IL4RA*. В настоящей работе было проанализировано 103 образца ДНК детей с диагнозом «атопическая бронхиальная астма» (БА), средний возраст выборки составил $9,9 \pm 0,2$ года. Все участники проживали на территории Республики Саха (Якутия), по этнической принадлежности были якутами и не являлись родственниками, этническая принадлежность учитывалась до третьего поколения. В результате проведенного анализа установлено, что оперативный способ родоразрешения как фактор риска возникновения дисбаланса микробиоты для детей – носителей гомозиготного генотипа *GG* гена *IL4 (G/C3'UTR)* и генотипа *RR*, а также аллеля *R* гена рецептора *IL4RA(Q551R)* в значительной степени повышает риск развития более тяжелых форм течения бронхиальной астмы. Полученные результаты могут быть использованы в качестве генетических маркеров повышенного риска при прогнозировании формирования бронхиальной астмы, а также при прогнозировании особенностей ее течения у детей-якутов с целью проведения своевременных и адекватных профилактических мероприятий и определения тактики лечения.

Ключевые слова: способ родоразрешения, микробиота, атопия, интерлейкины, якуты.

METHOD OF PERMIT RESOLUTION AS A RISK FACTOR OF IMPLEMENTATION OF A GENETIC POSITION FOR ATOPIA IN CHILDREN OF YAKUTIA

Solovyova N.A.¹, Pavlova N.I.¹, Kurtanov Kh.A.¹, Dyakonova A.T.¹, Aleksandrova T.N.¹,
Borisova U.P.¹

¹Federal public budgetary scientific institution "Yakut science center of complex medical problems", Yakutsk, sonata608@yandex.ru

The article presents the results of a study conducted for the first time in the Yakut population devoted to assessing the effect of the delivery method on the realization of a genetic predisposition to atopic changes in children, depending on allelic variants of the interleukin genes *C589T*, *G / C3'UTR* of the *IL4* gene and *IL4RA* receptor gene *Q551*. In the present work, 103 DNA samples of children with a diagnosis of atopical bronchial asthma (BA) were analyzed, the average age of the sample was 9.9 ± 0.2 years. All participants lived on the territory of the Republic of Sakha (Yakutia), by ethnicity were Yakuts and were not relatives, ethnicity was taken into account until the third generation. As a result of the analysis, it was found that the operative delivery method, as a risk factor for microbiota imbalance for children, carriers of the homozygous *GG* genotype of the *IL4* gene (*G / C3'UTR*) and the *RR* genotype, as well as the *R* allele of the *IL4RA* receptor gene (*Q551R*) significantly increases the risk of developing more severe forms of bronchial asthma. The results can be used as genetic markers of increased risk in predicting the formation of bronchial asthma, as well as predicting the features of its course in Yakut children in order to conduct timely and adequate preventive measures and treatment tactics.

Keywords: delivery method, microbiota, atopy, interleykins, yakuts.

Высокий уровень социально-экономического развития и передовых высокотехнологичных отраслей сегодня является одним из предрасполагающих факторов риска развития аллергической патологии. Согласно последним данным от 30 до 60% взрослого населения страдают различными аллергическими заболеваниями [1-3]. Такая же

неблагоприятная тенденция отмечается и для детского населения планеты [4-6]. ВОЗ назвала 2018 год годом пандемии аллергии.

Активному росту аллергических заболеваний способствуют как развитие промышленных предприятий, деятельность которых связана с техногенными аэрополлютантами, вызывающими повреждение респираторного эпителия, так и развитие современной пищевой промышленности, активно использующей большое количество всевозможных консервантов, ароматизаторов и красителей. Кроме того, немаловажную роль в увеличении количества страдающих аллергическими заболеваниями играет и сама медицина. Так, например, принимая во внимание, что в последнее время во всем мире отмечается рост числа оперативных родов путем кесарева сечения, активно проводятся исследования, направленные на изучение влияния способа родоразрешения на качественный состав кишечной микробиоты у детей, изменения которого являются предрасполагающим фактором развития аллергических заболеваний [7, 8].

Установлено, что видовой состав микробиоты детей, рожденных с помощью кесарева сечения, в значительной степени отличается от микробиоты детей, рожденных через естественные родовые пути. Исследователями установлено, что во время естественных родов ребенок проходит через родовые пути и «знакомится» с бактериями своей матери, тогда как дети, рожденные оперативным путем, не контактируют с материнскими родовыми путями, что впоследствии приводит к ограничению возможности заселения кишечника новорожденного бактериями рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* [9]. Результатами нескольких исследований убедительно доказано, что низкое количество бифидобактерий способствует повышению проницаемости эпителиального барьера кишечника для макромолекул пищи, в результате чего развиваются пищевая сенсibilизация и дефицит секреторного иммуноглобулина А (sIgA), что в свою очередь также способствует развитию atopических болезней [10, 11]. Параллельно с этим замедление колонизации кишечника обуславливает изменение ответа Т-хелперов и развитие их по Th2-пути, что также способствует развитию atopии и утяжелению ее течения. В ряде исследований в отношении взаимосвязи микробиоты и atopического дерматита установлено, что снижение количества лактобактерий в толстом кишечнике может приводить к повышению уровня *S.epidermidis* на коже, что также является дополнительным источником алергизации детского организма [12, 13]. Сравнительные исследования в отношении бактерий группы *Bacteroides fragilis* установили, что дети, рожденные путем кесарева сечения, имели выраженный дефицит данного вида бактерий по сравнению с детьми, рожденными через естественные родовые пути [9]. Кроме того, авторами этого исследования было выявлено, что нарушения видового состава кишечной микробиоты у детей, рожденных путем кесарева сечения, могут

сохраняться в течение первого полугодия жизни, а также наблюдаться и в более старшем возрасте. Согласно некоторым результатам исследований, опубликованным ранее, кесарево сечение не является существенным фактором риска развития собственно аллергических заболеваний, таких как поллиноз, аллергический ринит, экзема, но способно увеличивать число аллергий, вызываемых пищевыми продуктами [14], что согласуется с результатами исследований в отношении роли бифидобактерий и их влияния на проницаемость кишечного эпителия [10].

С учетом мультифакториального механизма формирования atopического процесса актуальными остаются исследования в отношении генов предрасположенности из группы интерлейкинов, а именно полиморфных вариантов гена *IL4*, контролирующей экспрессию одноименного цитокина – интерлейкина 4 (ИЛ4), поскольку он является ключевым цитокином Th2-иммунного ответа. Данный цитокин индуцирует дифференцировку CD4+ Т-лимфоцитов в Th2-хелперные клетки и отвечает за переключение изотипов тяжелых цепей иммуноглобулинов с μ на ϵ , обеспечивая тем самым синтез антител IgE. Также определенный интерес представляет цитоплазматический вариант гена α -цепи рецептора к *IL4*. Одна из форм рецептора обладает пониженным сродством к внутриклеточной тирозинфосфатазе SHP-1, что приводит к потере возможности супрессии синтеза ИЛ4 [15].

Целью настоящего исследования является оценка влияния способа родоразрешения на реализацию генетической предрасположенности к atopическим изменениям у детей в якутской популяции.

Материалы и методы исследования

Выборку составили дети с диагнозом «атопическая бронхиальная астма». Данный диагноз верифицировался на основании анамнеза, клинических симптомов заболевания, данных ФВД, наличия атопии. Также учитывались акушерский анамнез и способ родоразрешения. В исследуемую выборку были включены 103 ребенка-якута с диагнозом «атопическая бронхиальная астма» (БА), средний возраст детей составил $9,9 \pm 0,2$ года, из которых 65% ($n=67$) были мальчиками и 35% – девочками ($n=36$). Все участники исследования прошли клиническое обследование с консультацией необходимых специалистов, в том числе аллерголога, дерматолога и лор-врача.

Молекулярно-генетическая часть исследования выполнялась в отделе молекулярной генетики ЯНЦ КМП. Для исследования использовались образцы ДНК из коллекции биоматериала ЯНЦ КМП с применением УНУ «Геном Якутии» (рег. № USU_507512). Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом при ЯНЦ КМП. Молекулярно-генетический анализ включал исследование 3 полиморфных вариантов 2 генов интерлейкинов *C589T*, *G/C3'UTR* гена *IL4* и *Q551* гена *IL4RA*. Для проведения анализа

полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) продуктов амплификации полимеразной цепной реакции (ПЦР) специфических участков генома использовали образцы геномной ДНК, выделенной из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Характеристика исследованных полиморфных вариантов генов интерлейкинов представлена в таблице 1 [15].

Статистическую обработку проводили при помощи пакета программы «Statistica for Windows 8.0». Данные представлены в виде $X \pm x$, где X – среднее арифметическое, x – ошибка среднего. Для сравнения частот аллелей между различными группами применяли критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. Для оценки вероятности развития события использован метод отношения шансов. Разницу значений считали значимой при $p < 0,05$.

Таблица 1

Характеристика исследованных полиморфных вариантов генов интерлейкинов

Ген, полиморфизм		Локализация в гене	Продукты рестрикции, п.н.	Клинико-функциональный эффект
<i>IL 4</i>	<i>C589T</i>	5'-UTR	252; 192; 60	Усиление экспрессии ИЛ4 с последующей гиперпродукцией IgE В-клетками, что сопровождается значительным повышением уровня общего IgE у якутов
	<i>G717C</i>	3'-UTR	601; 332; 269	
<i>IL4RA</i>	<i>Q551R</i>	12-й экзон	87; 64; 23	Обладает пониженным сродством к SHP1, включающей сигнал терминации транскрипции гена ИЛ4, что приводит к потере способности супрессии синтеза ИЛ4 и обуславливает более тяжелое течение БА

Результаты исследования и их обсуждение

Все женщины были разделены на две группы: беременные, наблюдавшиеся в городских женских консультациях, и беременные, наблюдавшиеся районных женских консультациях. Согласно данным анамнеза лишь 13 (12,62%) женщин из 103 имели отягощенный аллергологический анамнез, 5 из них страдали поллинозом, у остальных отмечалась полисимптоматическая аллергическая реакция на бытовые и пищевые аллергены. Случаев лекарственной аллергии выявлено не было. Анализ исходов родов по способу родоразрешения установил преобладание естественных родов, они составили 70,87% из общего количества родов. Распределение внутри групп также продемонстрировало преобладание естественных родов, данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика исследуемой выборки

Общий объем выборки, n =103		<i>P</i>
	Женская консультация	

Способ родоразрешения, n (%)	Городская n = 51	Районная n = 52	
Оперативные роды (кесарево сечение), n = 30 (29,13%)	12 (40%)	18 (60%)	p^* – не достигнут
Естественные роды, n = 73 (70,87%)	39(53,42%)	34(46,58%)	p^{**} – не достигнут

Примечание. p^* – уровень достоверности различий по способу родоразрешения в зависимости от места наблюдения беременности; p^{**} – уровень достоверности различий по способу родоразрешения для каждой из групп.

Учитывая, что способ родоразрешения, а именно оперативные роды посредством кесарева сечения, является фактором риска возникновения дисбаланса микробиоты у детей, который в последующем может приводить к развитию аллергических заболеваний, в настоящем исследовании был проведен анализ сочетания БА с другими заболеваниями атопического генеза (табл. 3).

Таблица 3

Сочетание БА с другими аллергическими заболеваниями у детей-якутов

Сочетание БА с аллергическими заболеваниями	Естественные роды, (группа 1), n = 73, абс.(%)	Оперативные роды (группа 2), n = 30, абс.(%)
БА/БА + иные аллергические заболевания	44 (60,27%) / 29 (39,73%)	9 (30%) / 21 (70%)
БА+АД	17 (23,29%)	17 (56,67%)
БА+АК	3 (4,11%)	0 (0%)
БА+АР	6 (8,22%)	1 (3,33%)
БА+АД+АР	2(2,71%)	2 (6,67%)
БА+АР+АК	0 (0%)	0 (0%)
БА+АД+АР+АК	1(1,37%)	1 (3,33%)

Примечание. АД – атопический дерматит, АК – аллергический конъюнктивит, АР – аллергический ринит.

Результаты анализа сочетания БА с атопическим дерматитом (АД), аллергическим ринитом (АР) и аллергическим конъюнктивитом (АК) показали, что в группе детей, рожденных в естественных родах (группа 1), изолированная БА встречалась в 60,27% случаев, тогда как в группе детей, рожденных посредством кесарева сечения (группа 2), изолированная БА встречалась лишь у 30% больных ($p=0,03$). Также установлено, что группы характеризовались преобладанием БА в сочетании с АД, при этом в группе 2 это сочетание в разных вариациях наблюдалось в 2 раза чаще, чем в группе 1, и составило 56,67%. Согласно данным анамнеза обострение АД чаще всего возникало в ответ на употребление пищи, содержащей животные белки крупного рогатого скота и северных популяций рыб, что может быть связано с недостаточным формированием кворума бактерий внутренней стенки кишечника, в результате которого эпителий кишечника теряет барьерные свойства в отношении крупных молекул белка [9-11].

Результаты анализа распределения детей по степени тяжести БА в зависимости от способа родоразрешения представлены в таблице 4.

Таблица 4

Распределение детей по степени тяжести БА в зависимости от способа родоразрешения

Степень тяжести БА	Общее количество, n=103	Естественные роды (группа 1), n=73	Оперативные роды (группа 2), n=30	P
Тяжелая	11(10,68%)	5 (6,85%)	6 (20%)	$p>0,05$
Средняя	29 (28,16%)	14 (19,18%)	15 (50%)	$p^* 0,003$
Легкая	63 (61,17%)	54 (73,97%)	9 (30%)	$p^{**} 0,00005$

Примечание. p^* – уровень достоверности различий между группами 1 и 2 у детей с БА средней степени; p^{**} – уровень достоверности различий между группами 1 и 2 у детей с БА легкой степени.

Установлено, что в целом исследуемая выборка детей (группа 1 и группа 2) характеризовалась преобладанием БА легкой степени тяжести, она встречалась в 61,17% случаев, при этом в группе детей, рожденных в естественных родах (группа 1), легкое течение БА наблюдалась достоверно чаще и составило 73,97%. В группе детей, рожденных посредством оперативных родов (группа 2), достоверно чаще наблюдалась БА средней степени тяжести, она встречалась в 50% случаев. Тяжелое течение БА встречалось лишь в 10,68%, анализ его распределения по группам не выявил достоверных отличий.

Учитывая результаты, ранее полученные авторами в отношении поиска ассоциации полиморфизма генов интерлейкинов *IL4* (*C589T*, *G/C3'UTR*) и *IL4RA* (*Q551*) с БА и ее клинико-функциональными характеристиками [8], в настоящей работе проведена оценка влияния способа родоразрешения на реализацию генетической предрасположенности к atopическим изменениям. Результаты анализа распределения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов интерлейкинов *C589T*, *G/C3'UTR* гена *IL4* и *Q551* гена рецептора *IL4RA* в зависимости от способа родоразрешения представлены в таблице 5.

Таблица 5

Распределение частот аллелей и генотипов генов интерлейкинов *C589T*, *G/C3'UTR* гена

IL4 и *Q551* гена рецептора *IL4RA* в зависимости от способа родоразрешения

Ген, Полиморфизм	Генотипы	Естественные роды (группа 1), n=73	Оперативные роды (группа 2), n=30	P
<i>IL4</i> <i>C589T</i>	<i>CC</i>	6 (8,22)	7 (23,33)	p_1 не достигнут p_2 не достигнут
	<i>CT</i>	22 (30,14)	8 (26,67)	
	<i>TT</i>	45 (61,64)	15 (50,0)	
Мутантный аллель	<i>C</i>	0,232	0,366	
«Дикий» аллель	<i>T</i>	0,768	0,634	
<i>IL4</i> <i>G/C3'UTR</i>	<i>GG</i>	3 (4,11)	8 (26,67)	$p_1 0,002$
	<i>GC</i>	24 (32,88)	5 (16,67)	$p_2 0,045$

	<i>CC</i>	46 (63,01)	17 (56,67)	
Мутантный аллель	<i>G</i>	0,205	0,350	
«Дикий» аллель	<i>C</i>	0,795	0,650	
<i>IL4RA</i> <i>Q551R</i>	<i>QQ</i>	34 (46,68)	8 (26,67)	<i>p</i> ₁ 0,002 <i>p</i> ₂ 0,003
	<i>QR</i>	34 (46,68)	12 (40,0)	
	<i>RR</i>	5 (6,85)	10 (33,33)	
Мутантный аллель	<i>R</i>	0,699	0,467	
«Дикий» аллель	<i>Q</i>	0,301	0,533	

Примечание. *p*₁ – для частот генотипов, *p*₂ – для частот аллелей.

Анализ распределения аллелей и генотипов для полиморфного варианта гена *IL4* (*C589T*) продемонстрировал отсутствие достоверных различий, обе группы детей характеризовались преобладанием гомозиготного генотипа *TT* и аллеля *T*.

Полиморфизм гена *IL4* (*G/C3'UTR*) характеризовался наличием достоверных различий в распределении как аллелей, так и генотипов, несмотря на общее преобладание носителей генотипа *CC* и аллеля *C* и в 1-й, и во 2-й группе, причем дети, рожденные посредством кесарева сечения, чаще являлись носителями генотипа *GG* по сравнению с детьми, рожденными через естественные родовые пути.

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта гена рецептора *IL4RA(Q551R)* установил, что для детей 2-й группы носительство аллеля *R* полиморфного варианта гена рецептора *IL4RA (Q551R)* повышает риск формирования БА в 2,6 раза (*OR* = 2,65; 95% ДИ 1,428–4,916), а наличие у них гомозиготного генотипа *RR* полиморфного варианта данного гена повышает риск формирования БА в 6,8 раза (*OR* = 2,65; 95% ДИ 2,082–22,211) по сравнению с детьми 1-й группы.

Заключение

Таким образом, результаты впервые проведенного в якутской популяции исследования по оценке влияния способа родоразрешения на реализацию генетической предрасположенности к atopическим изменениям у детей с учетом молекулярно-генетических особенностей распределения аллельных частот генов интерлейкинов *C589T*, *G/C3'UTR* гена *IL4* и *Q551* гена рецептора *IL4RA* свидетельствуют о том, что оперативный способ родоразрешения как фактор риска возникновения дисбаланса микробиоты для детей – носителей гомозиготного генотипа *GG* гена *IL4 (G/C3'UTR)* и генотипа *RR*, а также аллеля *R* гена рецептора *IL4RA(Q551R)* в значительной степени повышает риск развития у них более тяжелых форм течения бронхиальной астмы.

Исследование было проведено в рамках НИР «Изучение генетической структуры и груза наследственной патологии популяций Республики Саха (Якутия)».

Список литературы

1. Pyun B.Y. Natural history and risk factors of atopic dermatitis in children. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2015. V. 7(2). P. 101–105.
2. Wong G.W. Epidemiology: international point of view, from childhood to adults, food allergens. *Chem. Immunol. Allergy.* 2015. V. 101. P. 30–37.
3. Flohr C., Mann J. New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis. *Allergy.* 2014. V. 69(1). P. 3–16.
4. Nutten S. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Ann. Nutr. Metab.* 2015. V. 66 (1). P. 8–16.
5. Garg N., Silverberg J.I. Epidemiology of childhood atopic dermatitis. *Clin. Dermatol.* 2015. V. 33(3). P. 281–288.
6. Miles E.A., Calder P.C. Maternal diet and its influence on the development of allergic disease. *Clin. Exp. Allergy.* 2015. V. 45(1). P. 63–74.
7. T.Boerma, dessalegn Y. Melesse et al. Global epidemiology of use and differences in caesarean sections. *The Lancet.* 2018. V. 392 (10155). P. 1341-1348.
Salminen S, Gibson GR, McCartney AL, Isolauri E: Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut.* 2014. V. 53. P. 1388–1389.
9. Фролова Н.А. Особенности формирования микробиоценоза детей раннего возраста в зависимости от микробного пейзажа кишечника матери: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Смоленск, 2001. 23 с.
10. Legatzki A., Rösler B., von Mutius E. Microbiome diversity and asthma and allergy risk. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2014. V. 14(10). P. 466.
11. Максимова О.В., Гервазиева В.Б., Зверев В.В. Микробиота кишечника и аллергические заболевания // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 3. С. 49–60.
12. Peng W., Novak N. Recent developments in atopic dermatitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2014. V. 14(5). P. 417–422.
13. Houghteling P.D., Walker W.A. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to infants' and children's health? *J. Pediatr.Gastroenterol. Nutr.* 2015. V. 60 (3). P. 294–307.
14. Eggesbo M., Botten G., Stigum H., et al. Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. V. 112(2). P. 420-426.

15. Patuzzo C., Malerba G., Migliaccio C. et al. No IL4R alfa gene linkage or association detected in Italian families with atopic asthma by the analysis of 3 mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 1999. V. 65. Suppl. A439.