

М.В. Смольникова, С.В. Смирнова

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ IL4 (C-590T) И IL10 (C-597A) С ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)

Псориатический артрит — хроническое прогрессирующее заболевание суставов, протекающее на фоне псориаза. Как и артрит с псориазом в отдельности, он представляет собой системное мультифакториальное заболевание, причины которого доподлинно неизвестны, в связи с чем профилактика данного заболевания неэффективна. Предполагается, что существует генетически обусловленная предрасположенность к развитию псориатического артрита, в которой существенное значение имеют гены цитокинов, основных медиаторов иммунного ответа. Проведено исследование распределения полиморфизма генов противовоспалительных цитокинов IL4 (C-590T) и IL10 (C-597A) у больных псориазом, псориатическим артритом и здоровых доноров. Получено распределение генов IL4 и IL10 в европейской популяции г. Красноярск. Установлена ассоциация полиморфного маркера C-590T гена IL4, расположенного в промоторной области, с псориатическим артритом. Полученные данные позволяют предположить, что аллельный вариант C-590 является предрасполагающим фактором к более тяжелому течению псориаза и развитию патологии костно-суставной системы.

Ключевые слова: полиморфизм генов, псориатический артрит, интерлейкин

ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHIC MARKERS OF THE IL4 (C-590T) AND IL10 (C-597A) GENES AND PSORIATIC ARTHRITIS

M.V. Smolnikova, S.V. Smirnova

Institute of Medical Problems of the North SB RAMS (Krasnoyarsk)

Psoriatic arthritis is a chronic progressive disease of joints developing along with psoriasis. Likewise arthritis and psoriasis alone, it represents the systemic multifactorial disease of unknown etiology; therefore prevention of the disease is inefficient. Genetic predisposition to psoriatic arthritis development is proposed with essential role of genes coding for cytokines, the main mediators of immune response. A study of the prevalence of polymorphisms of the genes of anti-inflammatory cytokines IL4 (C-590T) and IL10 (C-597A) in patients with psoriasis, psoriatic arthritis and healthy donors was carried out. The prevalence of the polymorphisms in the European population of Krasnoyarsk was obtained. An association of the C-590T polymorphic marker of the promoter region of the IL4 gene with psoriatic arthritis was established. The obtained results suggest that the C-590 allele is a contributing factor to heavier course of psoriasis and the development of bone system pathology.

Key words: genes polymorphism, psoriatic arthritis, interleukin

Псориатический артрит (ПА) представляет собой хронический прогрессирующий системный воспалительный процесс костно-суставной системы и развивается, по данным разных авторов, у 30–70 % пациентов с псориазом [1, 6, 7]. У одних больных псориаз предшествует развитию артрита, у других артрит и псориаз развиваются одновременно. Какое из этих двух слагаемых является следствием, а какое — причиной, пока однозначно не определено. Патогенетические механизмы псориаза окончательно не выяснены, что делает прогноз и профилактику данного заболевания затруднительной. Важную роль в патогенезе псориаза, как одного из мультифакториальных заболеваний, играет генетическая предрасположенность. Считается, что генетические факторы составляют около 60–70 % среди других причин возникновения псориаза, клинического течения заболевания и темпа прогрессирования костно-хрящевой деструкции [2, 3].

Основанием для признания роли генетических факторов при ПА послужили статистически достоверное учащение случаев ПА в семьях больных этим заболеванием, а также результаты, полученные близнецовым методом [15]. Однако подавля-

ющее большинство случаев ПА не укладывается в законы менделевской генетики. Вероятно, развитие заболевания вызвано не каким-либо генетическим дефектом, а неблагоприятным сочетанием нормальных полиморфных аллелей различных генов — полиморфизмом. В отличие от мутаций генные полиморфизмы встречаются в популяции исключительно часто и сами по себе не имеют патологической значимости [4]. Нежелательный эффект проявляется лишь при достижении избыточного сочетания «неудачных» аллелей генов и/или действия провоцирующих внешних факторов [8].

Учитывая иммунопатологические изменения при ПА, наиболее перспективным направлением является исследование полиморфных вариантов генов, вовлеченных в формирование иммунного ответа. При псориазе и псориатическом артрите наблюдается дисбаланс продуцируемых Th1/Th2 клетками интерлейкинов (IL), которые обеспечивают межклеточные медиаторные контакты, участвуя в запуске иммунопатологических реакций [5]. Установленное гиперактивное состояние Т-хелперной системы иммунитета при псориазе сегодня рассматривается как ключевой момент в каскаде взаимодействий между клетками воспалительного

инфильтрата, кровеносными сосудами и кератиноцитами, приводящий к развитию клинических проявлений [6]. На современном этапе поиска и изучения генов-маркеров предрасположенности (резистентности), характера течения псориаза, развития псориатического артрита важное место занимает полиморфизм генов цитокинов.

В связи с чем, цель настоящей работы состояла в оценке ассоциации полиморфных маркеров некоторых генов иммунной системы – противовоспалительных цитокинов *IL4* (С-590Т) и *IL10* (С-597А) с развитием псориатического артрита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований послужили образцы ДНК от 79 больных псориазом в среднем возрасте 43 года (42 женщины, 37 мужчин), у 51 больного из общей группы был диагностирован ПА. Все больные обследованы в прогрессирующую стадию течения заболевания. При постановке диагноза «псориаз» использованы классические клинические критерии: наличие феноменов псориатической триады («стеаринового пятна», «терминальной пленки», «точечного кровотечения»), возникновение изоморфной реакции Кебнера, периферический рост элементов (яркий венчик эритемы). Контрольную группу составили относительно здоровые доноры (n = 52), сопоставимые по полу и возрасту с больными. Все обследованные являлись европеоидами в трех поколениях, жителями г. Красноярск.

Геномная ДНК выделялась из периферической венозной крови с помощью набора «Silica» (ООО «Лаборатория Медиген», Россия). Участки промоторных регионов генов амплифицировали с использованием пары специфичных праймеров, используя ПЦР. Реакционная смесь, объемом 20 мкл, содержала 0,25 нг ДНК, 0,5 мкМ каждого из праймеров, 0,25 мМ каждого из dNTP, 1 – 2 е.а. Taq-полимеразы («Сибэнзим», Россия), в стандартном буфере, поставляемом производителем фермента. Затем продукты амплификации подвергались гидролизу специфичной эндонуклеазой рестрикции (табл. 1). Затем фрагменты ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете после электрофоретического разделения в 2% агарозных гелях, окрашенных этидий бромидом.

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 (РХВ) с помощью критерия χ^2 и точного теста Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота распределения генотипов и аллелей исследованных полиморфных локусов *IL4* (С-590Т) и *IL10* (С-597А), полученная нами у здоровых доноров и больных псориазом жителей г. Красноярск, в целом характерна для европеоидных популяций [4]. Анализ полиморфизма С-590Т промоторного участка гена *IL4* показал преобладание частоты гомозиготного варианта СС, частота мутантного варианта ТТ была минимальной в группе здоровых (1,9 %) и более распространена у больных псориазом (7,6 % в общей группе, 10,7 % в группе ПС) (табл. 2). При анализе распределения частот генотипов гена *IL10* показано преобладание генотипа СС, генотип АА не встречался у здоровых доноров, тогда как его частота в группе ПС составила 7,2 % (3,8 % в общей группе больных). Тем не менее, различия частот генотипов исследуемых генов цитокинов между группой больных псориазом и здоровыми донорами, жителями г. Красноярск, были статистически недостоверны.

В результате анализа частот генотипов и отдельных аллельных вариантов, нами обнаружена ассоциация полиморфного маркера С-590Т гена *IL4*, расположенного в промоторной области, с псориатическим артритом (ПА) ($p = 0,03$) (табл. 2). В группе с артритом частоты генотипов отличались от группы больных без изменений в костно-суставной системе (ПС) в сторону увеличения частоты гомозиготного варианта СС за счет уменьшения частоты генотипов СТ и ТТ. Частота генотипа СС у больных ПА почти вдвое превышает частоту этого варианта у больных ПС за счет того, что частоты СТ и ТТ в группе больных без артропатологии значительно выше, чем в группе ПА. Сравнение частот аллелей показало положительную взаимосвязь аллельного варианта С-590 *IL4* 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)).

Исследование распределения генотипов полиморфного маркера С-597А гена *IL10*, также расположенного в промоторной зоне, среди больных псориазом и псориатическим артритом, не показало

Таблица 1

Характеристики исследованных полиморфизмов

Ген	Полиморфизм ¹	Структура праймеров	Температура отжига праймеров, °С	Фермент рестрикции	Продукты гидролиза, п. н.		Литература
					Аллель «дикого» типа	Мутантный аллель	
<i>IL4</i>	С-590Т	5'cacctaaacttgggagaacatggt3' 5'gttgtaatgcagtcctcctg3'	60	Bme 18l ²	194;23	217	10, 11
<i>IL10</i> ³	С-597А	5'atccaagacaactactactaa-3' 5'taaatatcctcaaaagttcc-3'	58	Rsa I 4 ²	306; 232; 42	240;232; 66; 42	13

Примечание: 1 – первым указан аллель «дикого» типа; 2 – производство «Сибэнзим», Новосибирск; 3 – продукт амплификации состоит из 587 bp.

Таблица 2

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов у больных псориазом, псориатическим артритом и здоровых доноров

Ген	Полиморфизм	Генотип	Группы								p
			Доноры (1)		Псориаз (2)		ПА (3)		ПС (4)		
			n	%	n	%	n	%	n	%	
IL4	C-590T	CC	31	59,6	49	62,0	37	72,6	12	42,9	$p_{1,2} = 0,28$ $p_{3,4} = 0,03$ $p_{1,3} = 0,12$ $p_{1,4} = 0,13$
		CT	20	38,5	24	30,4	11	21,6	13	46,4	
		TT	1	1,9	6	7,6	3	5,8	3	10,7	
		T	22	0,21	36	0,23	17	0,17	19	0,34	
IL10	C-597A	CC	38	73,1	46	58,2	30	58,8	16	57,1	$p_{1,2} = 0,12$ $p_{3,4} = 0,51$ $p_{1,3} = 0,22$ $p_{1,4} = 0,08$
		CA	14	29,9	30	38,0	20	39,2	10	35,7	
		AA	0	0	3	3,8	1	2,0	2	7,2	
		A	14	0,13	36	0,23	22	0,22	14	0,25	

Примечание: n – абсолютное число наблюдаемых генотипов и аллелей; p – уровень значимости, полученный с помощью критерия χ^2 и точного теста Фишера.

ло статистически достоверной ассоциации с заболеванием. Тем не менее, тенденция к взаимосвязи аллельного варианта существует – частота варианта A-597 IL10 у больных псориазом значительно выше, чем у здоровых доноров ($p = 0,06$; OR 1,9; CI (0,93-4,03)).

При анализе распределения полиморфизмов IL4 (C-590T) и IL10 (C-597A) в исследуемых группах ПА и ПС отдельно среди мужчин и женщин показаны статистически недостоверные отличия в частотах генотипов и аллельных вариантов указанных генов противовоспалительных цитокинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные по распределению двух полиморфных маркеров генов противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 среди европеоидного населения г. Красноярск отражают закономерности, характерные для европеоидного населения в целом. Аллели «дикого» типа C-590 IL4 и C-597 IL10 преобладают в группах здоровых доноров и больных псориазом, независимо от тяжести заболевания и проявления косто-суставной патологии. Мутантные генотипы TT-590 и AA-597 практически не встречаются в группе здоровых доноров в отличие от группы больных ПА. Популяционный анализ полиморфизма генов лежит в основе исследований генетических факторов предрасположенности к развитию заболеваний, в том числе аутоиммунных, связанных с дисфункцией иммунной системы [4, 8].

Анализ ассоциаций полиморфизма генов-кандидатов с изучаемой болезнью или патологическими признаками позволяет установить их патогенетическую роль и, таким образом, «картировать» заболевание. В настоящее время изучение полиморфных вариантов протеинов цитокиновой сети применяется главным образом для исследования их ассоциаций с патологией. Важность такого изучения может быть обоснована поиском потенциальных маркеров восприимчивости, тяжести

течения, и особенностей клиники заболеваний. Также это зачастую приводит к более глубокому пониманию этиологии и патогенеза заболеваний человека и разработке более эффективной терапии или улучшения существующих методов профилактики заболевания [12].

Полученные в данной работе результаты говорят об ассоциации полиморфизма промоторного региона IL4 (C-590T) с псориатическим артритом. Интерлейкин 4 (IL-4), цитокин Th2, является главным фактором регуляции пролиферативного ответа В-лимфоцитов и регулирует переключение изотипов иммуноглобулинов в них, индуцируя экспрессию IgG и IgE, его часто называют критическим цитокином воспаления. IL-4 выступает также как фактор роста Т-лимфоцитов и тучных клеток и является ключевым сигналом дифференцировки CD4+ Т-клеток в хелперы типа 2. Известно, что изучаемая нами точечная замена ассоциирована с уровнем продукции IL-4, одного из основных цитокинов, участвующих в развитии иммунного ответа при аутоиммунных заболеваниях. Точечная замена в положении – 590 обуславливает повышенную по сравнению с аллельным вариантом C-590 активность промотора, и, как результат этого, увеличенную экспрессию IL-4 и продукцию интерлейкина [9]. Полученные нами данные показывают, что аллельный вариант C-590 IL4 достоверно чаще встречается среди больных псориатическим артритом по сравнению с больными псориазом без артропатологии. Это предполагает, что носители аллеля C-590 могут иметь повышенный риск развития более тяжелой формы псориаза по сравнению с носителями другого аллеля.

Изучение полиморфизма гена интерлейкина 10 (IL-10), располагающегося на первой хромосоме, представляет особый интерес в связи с тем, этот цитокин играет основную роль в регуляции воспалительного и иммунного ответов, являясь продуктом Th2 клеток. IL-10 ингибирует синтез ряда цитокинов, продуцируемых Th1, таких как

IFN γ , IL-2, TNF β , а также IL-1, IL-6 и TNF α . Установлено, что присутствие аллельного варианта-592A ассоциировано с уменьшением продукции IL-10 [14]. Результаты проведенной работы показали, что генотип AA-597 не распространен у здоровых доноров, тогда как среди больных псориазом встречается с частотой 3,8%. Таким образом, существует тенденция к взаимосвязи аллельного варианта A-597 IL10 с ПС. И, при увеличении выборок исследуемых, возможно, ассоциация будет сильнее.

Резюмируя полученные результаты, можно заключить, что полиморфные гены цитокинов являются важными генами-кандидатами такого мультифакториального заболевания, как псориазический артрит. Определение генотипа больного, наряду с исследованием уровня экспрессии соответствующего гена, может сформировать суммарный прогностический критерий развития более тяжелой формы заболевания, в результате чего профилактические меры и выбор лечения будут наиболее эффективными для предотвращения инвалидизации населения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляев Г.М., Рыжко П.П. Псориаз. Псориазическая артропатия: этиология, патогенез, диагностика, лечение, профилактика. — М.: МЕД-пресс-информ, 2005. — 272 с.
2. Галимова Э.С. Молекулярно-генетические основы предрасположенности к псориазу // Генетика. — 2008. — Т. 44, № 5. — С. 594—605.
3. Довжанский С.И. Генетические и иммунные факторы в патогенезе псориаза // Рос. журн. кожных и венерических болезней. — 2006. — № 1. — С. 14—19.
4. Коненков В.И., Смольникова М.В.. Структурные основы и функциональная значимость аллельного полиморфизма генов цитокинов человека и их рецепторов // Мед. иммунология. — 2003. — Т. 5, № 1—2. — С. 11—28.

5. Кундер Е.В. Роль цитокинов в развитии системного и локального воспаления при псориазическом артрите // Цитокины и воспаление. — 2010. — Т. 9, № 1. — С. 25—28.

6. Лига А.Б., Ухина Т.В., Владимирова Е.В. Некоторые аспекты этиологии и патогенеза псориаза и поиск новых лекарственных соединений для его терапии // Клинич. дерматология и венерология. — 2008. — № 6. — С. 15—19.

7. Молочков В.А., Бадокин В.В., Альбанова В.И., Волнухин В.А. Псориаз и псориазический артрит. — М., 2007. — 304 с.

8. Пирузян А.А. Молекулярная генетика псориаза // Вестн. РАМН. — 2006. — № 3. — С. 33—43.

9. Borish L., Mascali J.J., Klinnert M. SSC polymorphisms in interleukin genes // Hum. Mol. Genet. — 1994. — Vol. 3. — P. 1710.

10. Cantagrel A., Navaux F., Loubet-Lessonlie P. IL-1 β , IL-1 receptor antagonist, IL-4, and IL-10 gene polymorphisms // Arthr Rheum. — 1999. — Vol. 42, N 6. — P. 1093—1100.

11. Choi E., Lee H.J., Yoo T., Chanock S. A common haplotype of interleukin-4 gene IL4 is associated with severe respiratory syncytial virus disease in Korean children // The Journal of Infectious Diseases. — 2002. — Vol. 186. — P. 1207—1211.

12. Fresno M., Kopf M., Rivas L. Cytokines and infectious disease // Imm Today. — 1997. — Vol. 18, N 2. — P. 56—58.

13. Mok C.C., Lanchbury J.S., Chan D.W., Lau C.S. IL-10 promoter polymorphism in Southern Chinese patients with SLE // Arthrit Rheumatism. — 1998. — Vol. 41, N 6. — P. 1090—1095.

14. Turner D.M., Williams D.M., Sankaran D. An investigation of polymorphism in the IL-10 gene promoter // Eur. J. Immunogenet. — 1997. — Vol. 24, N 1. — P. 1—8.

15. Valdimarsson H. The genetic basis of psoriasis // Clin. Dermatol. — 2007. — Vol. 25, N 6. — P. 563—567.

Сведения об авторах

Смольникова Марина Викторовна — ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, кандидат биологических наук (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г; тел. раб.: 89831520137; e-mail: smarinv@mail.ru)

Смирнова Светлана Витальевна — заместитель директора по научной работе ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (660100, г. Красноярск, ул. Чкалова, д. 41, кв. 117; тел. раб.: 83912280681; e-mail: svetvita@mail.ru)