

РАБОТЫ КОНКУРСА МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ НА КОНГРЕССЕ РЕВМАТОЛОГОВ РОССИИ

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-10 У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Ж.Е. Омарбекова¹, Р.Л. Иванова¹, И.А. Гусева², В.А. Мякоткин²

¹Медицинская академия, Семипалатинск, Казахстан, ²ГУ Институт ревматологии РАМН, Москва

Резюме

Проведен анализ ассоциативной связи полиморфизма гена IL-10 с клинической вариабельностью СКВ у казахов. В исследование вошли 49 пациентов с СКВ, (48 жен и 1 муж). Полиморфизм промоторной области гена IL-10, обусловленный точковой вариацией в позиции -627, изучали методом полиморфизма длин рестриктивных фрагментов (ПДРФ) с использованием рестриктазы RsaI. Результаты анализа выявили значимость аллельного полиморфизма гена IL-10 в детерминации риска возникновения заболевания, в формировании клинического разнообразия и особенностях течения патологического процесса у казахов.

Ключевые слова: интерлейкин-10, генетическая гетерогенность, клинический полиморфизм, системная красная волчанка.

В рамках общей проблемы изучения генома человека особое место занимает проблема выявления генов, ответственных за возникновение мультифакториальных заболеваний, к числу которых относится и системная красная волчанка (СКВ). СКВ является классической моделью для изучения аутоиммунных процессов [1,2]. В последние годы сначала на модельных линиях мышей, а затем и на человеке была показана перспективность 1-ой хромосомы человека в плане носительства генов предрасположенности к СКВ [5,8]. С помощью большого числа полиморфных ДНК маркеров и анализа сцепления были выявлены критические хромосомные сегменты (1q21, 1q31-32, 1q41-42), в которых с наибольшей вероятностью могут быть локализованы гены предрасположенности к СКВ. Установлено, что в 1q31-32 хромосомных сегментах локализован ген интерлейкина-10 (IL-10), продукты которого принимают участие в иммунных реакциях как в норме, так и в патогенезе СКВ [7].

IL-10 является иммунорегуляторным цитокином, подавляет синтез провоспалительных цитокинов, усиливает пролиферацию В-лимфоцитов и синтез иммуноглобулинов, подавляет антиген-специфическую Т-клеточную пролиферацию и экспрессию антигенов HLA II класса. Кроме того, IL-10 увеличивает выживаемость В-лимфоцитов, индуцируя транскрипцию гена BCL-2, предохраняющего клетки от апоптоза [4]. Показано, что у модельных линий мышей нейтрализация IL-10 замедляет развитие аутоиммунного процесса, тогда как введение этого цитокина ускоряет его развитие. Установлено, что вклад генетического компонента в межиндивидуальную изменчивость секреции IL-10 превышает 70 % и что эта вариабельность коррелирует с различиями в структуре промоторной части гена IL-10 [3]. Представляют интерес данные зарубежных исследователей, полученные при изучении у больных СКВ аллельного полиморфизма гена IL-10 и BCL-2 гена. Авторы показали, что носительство аллеля 193 BCL-2 гена и аллеля 127 IL-10

гена в отдельности умеренно повышает риск возникновения СКВ, тогда как их совместное наследование в 40 раз повышает это риск [6].

Таким образом, результаты ряда работ свидетельствуют о потенциальной значимости полиморфизма гена IL-10 в формировании предрасположенности к СКВ.

Цель настоящего исследования состояла в анализе ассоциаций полиморфизма гена IL-10 с клинической вариабельностью СКВ у казахов.

Задачи исследования:

- 1) Изучить распределение аллелей промоторной области гена IL-10 у больных СКВ и здоровых лиц казахской популяции.
- 2) Изучить связь аллельного полиморфизма гена IL-10 с клинической симптоматикой и течением заболевания.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы ДНК больных СКВ и здоровых лиц казахской национальности. Набор материала проводился на базе ревматологического отделения клинического учебного центра Семипалатинской государственной медицинской академии (КУЦ СГМА). Молекулярно-генетический анализ проводился в лаборатории генетики ревматических заболеваний Института ревматологии РАМН (г. Москва).

Группу больных составили 49 человек в возрасте от 16 до 58 лет, среди которых было 48 женщин и 1 мужчина. Острое течение СКВ определено у 3 больных, что составило 6,1 %, подострое - у 36 (73,5 %) и хроническое - у 10 (20,4%). По активности заболевания больные распределились следующим образом: I степень наблюдалась в 8,2 % случаев, II - 71,4 % и III - 20,4 %. Диагноз СКВ ставился согласно классификации Американской Ревматологической Ассоциации (1982г.). С целью диагностики СКВ использовали общеклинические и иммунологические показа-

тели; последние включали в себя определение антител к ДНК, антинуклеарного фактора, волчаночного антикоагулянта, LE-клеток.

Группу сравнения составили 71 практически здоровых индивида казахской национальности в возрасте от 15 до 55 лет, среди них 70 женщин и 1 мужчина. Подбор лиц осуществлялся методом случайной выборки, с учетом тщательного сбора анамнеза с целью исключения ревматических болезней.

Выделение ДНК осуществляли методом фенольно-хлороформной экстракции. Для выявления точечной мутации в промоторной области гена IL-10, обусловленной заменой нуклеотида С на нуклеотид А в позиции -627, использовали полиморфизм длины рестриктивных фрагментов (ПДРФ) с помощью рестриктазы RsaI. Амплификацию и дегестацию полученных амплифицированных фрагментов осуществляли согласно рекомендациям J.Eskdale [7]. Детекцию рестриктированных фрагментов проводили в 2% агарозном геле.

Выявление в геле продукта длиной 351 пара оснований (п.о.) свидетельствовало о том, что в позиции - 627 имелся нуклеотид С, наличие которого обуславливало отсутствие дополнительного сайта рестрикции. Выявление более легкого продукта длиной 240 п.о. свидетельствовало о присутствии нуклеотида А в позиции -627 и, как следствие этого, о наличии дополнительного сайта рестрикции.

Для оценки значимости наблюдаемых распределений частот генотипов и аллелей в выборке больных СКВ и среди здорового контроля использовали критерий χ^2 по компьютерной программе R x C (Rows x Columns). Значимость ассоциаций оценивали с помощью критерия OR (odds ratio) - показателя отношения преобладаний.

Результаты и обсуждение

С целью изучения ДНК полиморфизма промоторной части гена IL-10 нами проведен анализ особенностей распределения частот аллелей и генотипов данного гена у больных СКВ и здоровых лиц казахской национальности. Как указывалось выше, вариабельность промоторной части гена IL-10 обусловлена наличием рестрикционного (240 п.о.) и нерестрикционного (351 п.о.) аллелей. Для удобства проведения анализа мы следовали общепринятым обозначениям: 240 аллель принимали за 1, а 351 аллель - за 2. Следовательно, гомозиготный генотип 240/240 соответствовал генотипу 1/1, генотипы 240/351 и 351/351 соответственно 1/2 и 2/2.

В таблице 1 приведено распределение частот генотипов и аллелей IL-10 гена в двух сравниваемых группах. Как видно из таблицы, среди больных СКВ по сравнению с здоровым контролем отмечается достоверно значимое ($p = 0,023$) накопление лиц с генотипами, содержащими аллель 1 и снижение носителей генотипа 2/2 ($p = 0,02$). Носительство в гомозиготном состоянии аллеля 1 увеличивает риск возникновения СКВ в 2,4 раза, тогда как наличие в гомозиготном состоянии аллеля 2 снижает риск заболеваемости в 2,8 раза ($OR = 0,35$, $p = 0,02$), т.е. аллель 1 является предиктором, тогда как аллель 2 является протектором данной болезни. У гетерозигот 1/2 риск заболеваемости СКВ существенно ниже ($OR = 1,36$), следовательно, для аллельного полиморфизма гена IL-10 в отношении СКВ присущ эффект дозы аллеля.

Нами также был проведен анализ взаимосвязи отдельных клинических проявлений заболевания с носительством гомо- и гетерозиготных генотипов IL-10 гена. В таблице 2 представлена частотная характеристика генотипов при СКВ, стратифицированной по наличию или отсутствию поражения почек. Следует отметить определенное накопление генотипов 1/1 и 1/2 и существенное снижение числа лиц с генотипом 2/2 среди больных с поражением почек. Наличие у больного в гомозиготном состоянии аллеля 1 повышает риск развития люпус - нефрита в 3,4 раза, тогда как у гетерозигот 1/2 он равнялся 1,8, однако статистичес-

кая достоверность этих показателей не достигала 5% уровня значимости. В то же время протективный эффект по отношению к СКВ с поражением почек носительства в гомозиготном состоянии аллеля 2 был значительно более выражен. У таких лиц риск развития этой патологии по сравнению с априорным был меньше в 9,8 раза ($p = 0,001$). Необходимо отметить, что у гетерозигот как предикторный (в меньшей степени), так и протективный (в большей степени) эффекты аллелей 1 и 2 значительно нивелируются; риск развития СКВ с люпус - нефритом у лиц с наличием генотипа 1/2 превышал априорный только в 1,3 раза. Помимо этого, полученные данные свидетельствуют о наличии отчетливого эффекта дозы аллеля 2.

Оценка влияния носительства генотипов гена IL-10 на развитие специфического дерматита у больных СКВ представлена в таблице 3. При сопоставлении изученного аллельного полиморфизма с наличием или отсутствием у

Таблица 1
Распределение частот аллелей и генотипов IL-10 у больных СКВ и в контрольной группе

Исследуемые параметры	СКВ	Контроль	OR	P
Генотипы	n=49 n (%)	n=71 n (%)		
1/1	15 (30,6)	11 (15,5)	2,4	0,08
1/2	23 (46,9)	28 (39,5)		n/d
2/2	11 (22,5)	32 (45,0)	0,35	0,02
Аллели	2n=98	2n=142		
1	53 (54,1)	50 (35,2)		0,006
2	45 (45,9)	92 (64,8)		

Таблица 2
Частоты генотипов гена IL-10 у больных СКВ с нефритом (+), без нефрита (-) и в контрольной группе

Исслед-ые параметры	СКВ n=49		Контроль	OR
	нефрит +	нефрит -		
Генотипы	n=26 n (%)	n=23 n (%)	n=71 n (%)	
1/1	10 (38,5)*	5 (21,8)	11 (15,5)	3,41
1/2	14 (53,8)	9 (39,1)	28 (39,5)	
2/2	2 (7,7)** ***	9 (39,1)	32 (45,0)	0,10

*- $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой;

** - $p < 0,01$ по сравнению с группой больных СКВ без нефрита;

*** - $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой;

Таблица 3
Частоты генотипов гена IL-10 у больных СКВ с кожными проявлениями (+), без кожных проявлений (-) и в контрольной группе

Исслед-ые параметры	СКВ n=49		Контроль	OR
	кожные проявления+	кожные проявления-		
генотипы	n=33 n (%)	n=16 n (%)	n=71 n (%)	
1/1	13 (39,4) *	2 (12,5) **	11 (15,5)	3,55
1/2	13 (42,4)	11 (62,5)	28 (39,5)	
2/2	7 (21,2) #	4 (25,0)	32 (45,0)	0,33

*- $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой;

** - статистически недостоверно ($p=0,052$ (Fisher exact test, 1-tailed) по сравнению с группой больных СКВ без кожных проявлений;

- $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

больных СКВ характерного поражения кожи также были выявлены определенные ассоциации между ними (таблица 3). Так, среди больных с дерматитом отмечается значительное увеличение частоты лиц с генотипом 1/1 (39,4%) как по сравнению с группой больных без дерматита (12,5%), так и с контрольной выборкой (15,5%). Относительный риск развития дерматита для носителей генотипа 1/1 превышал априорный популяционный риск в 3,5 раза ($p = 0,015$). С другой стороны, генотип 2/2 также является протектором и по отношению к волчаночному дерматиту, однако его эффект менее выражен, чем для люпус – нефрита ($OR = 0,33$, $p = 0,03$, т.е. его наличие в 3 раза снижает риск развития дерматита). У 1/2 гетерозигот относительный риск по дерматиту был абсолютно незначим и равнялся 1,0, что свидетельствует о том, что эффект дозы аллелей 1 и 2 гена IL-10 существует и в отношении волчаночного дерматита.

Установлена связь между носительством генотипа 1/1 и антифосфолипидным синдромом (АФС): его частота была достоверно выше в группе больных с наличием АФС по сравнению с группой больных, где таковой синдром не диагностировался ($p = 0,05$ $OR = 2,6$).

Сопоставляя полученные данные по взаимосвязи аллельного полиморфизма гена IL-10 с особенностями течения СКВ, ими установлено, что у лиц, имеющих генотип 2/2, заболевание протекало с умеренной активностью и полисиндромностью и имело подострое течение в 71,4 % случаев, хро-

ническое – в 28,5 %. Практически у всех больных с генотипом 2/2 присутствовало поражение суставов в виде полиартралгии (24,3%), в 11,8 % случаев диагностировалось наличие АФС, который проявлялся эпилептиформными судорогами и сетчатым ливедо, а также наблюдался кожный синдром в виде сосудистой эритемы. Лишь в одном случае было выявлено поражение почек в виде нефрита с нефротическим синдромом и в сочетании с синдромом Верльгофа.

У больных с генотипом 1/1 отмечено более тяжелое течение СКВ с высокой активностью процесса и неблагоприятным прогнозом. В 40,6 % случаев наблюдался стойкий дерматит в виде "бабочки", в 70 % – поражение лимфопролиферативных органов. Клиническими проявлениями АФС у больных с генотипом 1/1, который встречался в 41,2%, были тромбоз мезентериальных сосудов, сопровождавшийся выраженным абдоминальным синдромом, невынашиваемость беременности и асептический некроз головки бедренной кости. В 34,6% случаев наблюдался люпус-нефрит в виде умеренной протеинурии, микрогематурии и артериальной гипертензии.

Таким образом, результаты изучения аллельного полиморфизма гена IL-10 у больных СКВ и в выборке здорового контроля показали его значимость в детерминации риска возникновения заболевания, а также в формировании клинического разнообразия и особенностей течения патологического процесса у казахов

ЛИТЕРАТУРА

1. Мякоткин В.А. Генетические аспекты ревматических болезней. Вест. РАМН, 1998, 12, 39 – 43
2. Мякоткин В.А. Достижения и перспективы в идентификации генов предрасположенности к ревматическим заболеваниям. В кн.: Избранные лекции по клинической ревматологии. Под ред. В.А.Насоновой, Н.В. Бунчука. М., 2001, 20 – 28.
3. Eskdale J., Kube D. A second polymorphic dinucleotide repeat in the 5' flanking region of the human IL10 gene. Immunogenetics, 1996, 45, 82-83
4. Eskdale J., Kube D., Gallagher G., Tesch H. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. Immunogenetics, 1997, 46, 120-128
5. Kearns G., Gaffney P., Shark K. et al. Three candidate SLE susceptibility loci on chromosome 1 identified by microsatellite gene mapping in 105 SLE sib-pair families. Materials of American College of Rheumatology (ACR), 61-st National Scientific Meeting, Washington, November 8-12, 1997, abstr.1705, 932- 937
6. Mehrian R., Quismorio F.P. Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. Arthr. Rheum., 1998, 41, 596-602.
7. Moser K.L., Asundi H.Y.N., Koelsch G. et al. Evidence for racial differences in genetic linkage to multiple loci spanning chromosome 1q in human systemic lupus erythematosus (SLE). Materials of American College of Rheumatology (ACR), 61-st National Scientific Meeting, Washington, November 8-12, 1997, abstr.1706, 932- 937
8. Tsao B.P., Cantor R.M., Kalunian K.C. et al. Evidence for linkage of a candidate chromosome 1 region to human systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest., 1997, 99, 725-731

Abstract

Interleukin-10 gene polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus and normal individuals of Kasakh population

Z.E. Omarbekova, R.L. Ivanova, I.A. Guseva, V.A. Myakotkin

An analysis of interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism associative link with clinical variability in Kasakhs. 49 pts with systemic lupus erythematosus were included (48 female and 1 male). Promotive IL-10 gene region determined by a point variable in 627 locus was assessed with restrict fragment length polymorphism method using restrictase RsaI. The results showed allele IL-10 gene polymorphism significance in disease risk determination, clinical variability and features of pathological process course in Kasakhs.

Key words: IL-10, genetic heterogeneity, clinical polymorphism, systemic lupus erythematosus.

Поступила 10.04.03