

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЫ

Баранова Н.И., Левашова О.А., Коженкова С.В.

ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения РФ,
г. Пенза, Россия

Резюме. Проведено обследование 50 пациентов с хронической аутоиммунной крапивницей (ХАК) и 48 пациентов с хронической идиопатической крапивницей (ХИК). Изучено содержание цитокинов IL-4, IL-10 и IL-17A в сыворотке, в спонтанной и индуцированной продукции клетками крови, а также полиморфизм генов цитокинов *IL-4 (C-589T)*, *IL-10 (G-1082A)*, *IL-17A (G-197A)*. Не обнаружено различий при изучении показателей IL-4 в зависимости от генетических вариантов изучаемых полиморфизмов у больных ХАК и ХИК. Выявлено повышение показателей IL-10 у больных ХИК, которое не имело взаимосвязи с генотипом *IL-10 (G-1082A)*. Повышенные показатели IL-17A у пациентов с ХАК ассоциировались с гомозиготным носительством *AA* по сравнению с контрольной группой и гетерозиготным носительством *GA* по сравнению с группой ХИК. Выявленные различия полиморфизма генов цитокинов при ХАК и ХИК свидетельствуют о различиях молекулярно-генетических основ формирования изучаемых форм ХК.

Ключевые слова: хроническая крапивница, полиморфизм, цитокины

STUDIES ON THE ROLE OF CYTOKINES POLYMORPHISM IN PATHOGENESIS OF CHRONIC URTICARIA

Baranova N.I., Levashova O.A., Kozhenkova S.V.

Penza Institute of Postgraduate Medical Education, Penza, Russian Federation

Abstract. Fifty patients with chronic autoimmune urticaria (CAU) and forty-eight patients with chronic idiopathic urticaria (CIU) have been examined. Blood serum contents of IL-4, IL-10 and IL-17A, spontaneous and induced cytokine production in blood cells, as well as polymorphism of *IL-4 (C-589T)*, *IL-10 (G-1082A)*, *IL-17A (G-197A)* cytokine genes has been studied. No differences have been detected when studying IL-4 levels, depending on genetic variants of *IL-4* gene in patients with CAU and CIU. Increased IL-10 amounts in patients with CIU still did not show any correlations with *IL-10* genotype (*G-1082A*). Increased IL-17A levels in patients with CAU were associated with homozygous genotype of *AA* in comparison to control group, and with heterozygous *GA* genotype, in comparison to CIU group. The revealed differences of cytokines' genes polymorphism in CAU and CIU provide a molecular-genetic evidence for different clinical forms of chronic urticaria.

Keywords: chronic urticaria, gene polymorphism, cytokines

Адрес для переписки:

Баранова Надежда Ивановна
ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования
врачей» Министерства здравоохранения РФ
440060, Россия, г. Пенза, ул. Стасова, 8а.
Тел./факс: 8 (8412) 43-43-57.
E-mail: giuv@sura.ru

Address for correspondence:

Baranova Nadezhda I.
Penza Institute of Postgraduate Medical Education
440060, Russian Federation, Penza, Stasova str., 8a.
Phone/Fax: 7 (8412) 43-43-57.
E-mail: giuv@sura.ru

Образец цитирования:

Н.И. Баранова, О.А. Левашова, С.В. Коженкова,
«Изучение роли полиморфизма генов цитокинов
в патогенезе хронической крапивницы» // Медицинская
иммунология, 2015. Т. 17, № 2. С. 167-172.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-167-172

© Баранова Н.И. и соавт., 2015

For citation:

N.I. Baranova, O.A. Levashova, S.V. Kozhenkova, "Studies on the
role of cytokines polymorphism in pathogenesis of chronic urticaria",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2015, Vol. 17, no. 2, pp. 167-172.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-167-172

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-2-167-172>

Введение

На протяжении многих лет хроническая крапивница (ХК) является одной из сложных проблем медицины. Широкая распространенность, длительное и упорное течение болезни, резистентность к традиционным методам терапии приводят к серьезному снижению качества жизни больных ХК [5, 12]. До настоящего времени назначение патогенетически обоснованной терапии при данной патологии представляет наибольшую трудность [2, 3, 4].

Среди всех форм ХК наиболее сложными для диагностики и лечения остаются хроническая аутоиммунная крапивница (ХАК) и хроническая идиопатическая крапивница (ХИК). Распространенность ХАК составляет от 30 до 50% [7, 10]. Распространенность ХИК составляет также около 50% [8]. Несмотря на то, что проведено немало работ по изучению данных формы заболевания, одним из малоизученных аспектов в патогенезе ХК остается роль генетического полиморфизма наиболее значимых цитокинов.

Известно, что мутации в генах цитокинов могут приводить к серьезным нарушениям иммунитета. У человека подобные мутации встречаются достаточно редко, что может свидетельствовать о важнейшей роли цитокинов в осуществлении защитных реакций. Тем не менее, накапливается все больше данных о выявлении функционального полиморфизма генов цитокинов, связанного с заменами единичных нуклеотидов (Single nucleotide polymorphism – SNP), вызывающих количественные изменения функционирования соответствующих генов, в отличие от мутаций, полностью выключающих функции кодируемых ими белков. Обладая значительной вариабельностью, цитокины характеризуются наличием однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с изменением синтеза биохимических продуктов у больных с различными аллергическими заболеваниями.

Исследованиями последних лет доказано, что наиболее важными в патогенезе ХАК и ХИК являются IL-4, IL-10 и IL-17 [1, 9]. В приведенных работах рассматривалась связь количественных отклонений цитокинов с формированием той или иной формы ХК. Однако в доступной нам литературе работ по анализу ассоциаций полиморфизма генов данных цитокинов с той или иной формой ХК не было найдено.

В связи с вышеизложенным, целью работы явилось сравнительное изучение содержания цитокинов IL-4, IL-10 и IL-17A в сыворотке, в спонтанной и индуцированной продукции

клетками крови и их связь с полиморфизмом генов цитокинов IL-4 (C-589T), IL-10 (G-1082A), IL-17A (G-197A) у больных ХАК и ХИК.

Материалы и методы

На проведение работы было получено разрешение локального этического комитета. Все пациенты дали информированное согласие на проведение исследования и использование их медицинской документации.

Было обследовано 98 больных ХК в возрасте от 18 до 60 лет (средний возраст составил 41 ± 12 лет), из них 50 пациентов с диагнозом ХАК и 48 пациентов – с ХИК. Диагноз ХАК и ХИК устанавливался на этапе предварительного обследования на основании данных анамнеза, клинических проявлений болезни, длительности заболевания, анализа данных сопутствующих заболеваний, а также положительных результатов пробы с аутосывороткой. Диаметр пробы 7 мм и более являлся диагностическим критерием ХАК [6]. Пациенты с ХИК имели отрицательную пробу с аутосывороткой. Также было обследовано 30 здоровых людей (контрольная группа) в возрасте от 23 до 56 лет (средний возраст составил 34 ± 9 лет), сопоставимых по полу и возрасту с группами ХАК и ХИК.

Всем изучаемым группам определяли концентрацию IL-4, IL-10, IL-17A в сыворотке крови и супернатанте методом иммуноферментного анализа реактивами фирмы «Вектор-Бест». Также было проведено молекулярно-генетическое исследование. Анализировался полиморфизм генов IL-4 (C-589T), IL-10 (G-1082A), IL-17A (G-197A). Все исследования были проведены на базе ЦНИЛ ГБОУ ДПО ПИУВ Минздрава России (г. Пенза). Генотипы по изучаемым маркерам цитокинов соответствовали нормальной гомозиготе, гетерозиготе и мутантной зиготе.

Материалом для изучения полиморфизмов генов IL-4, IL-10 IL-17A являлась геномная ДНК человека, выделенная из лейкоцитов периферической крови. Кровь для проведения исследований получали утром натощак, путем венепункции локтевой вены. Венозную кровь собирали в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА. Для выделения ДНК использовали реагент «ДНК-Экспресс-кровь» фирмы ООО НТП «Литех» (Москва, Россия). Амплификацию проводили на аппарате «DT-lite» («ДНК-технология») с помощью тест-систем для выявления полиморфизмов в геноме человека «SNP-экспресс» (ООО НПФ «Литех») методом полимеразной цепной реакции в режиме real-time.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием прикладных программ «Статистика 6,0». Описательная статистика качественных признаков (определение частоты встречаемости полиморфизмов генов) представлена относительными частотами. При сравнении двух выборочных средних в пределах одной выборки использовали критерий Вилкоксона, при сравнении групп между собой – критерий Манна–Уитни. Показатели представлены в виде медианы – Me, нижнего и верхнего квартилей (Q_{25} ; Q_{75}). Сравнение несвязанных групп по качественным признакам (попарное сравнение частот молекулярно-генетических показателей в группах больных и здоровых лиц, а также между группами больных) осуществляли с использованием двустороннего критерия χ^2 . Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio (OR) с 95% доверительным интервалом CI (confidence interval). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Как видно из данных таблицы 1, уровень IL-4 в сыворотке был достоверно ниже аналогичных показателей контрольной группы как в группе больных с ХАК, так и в группе больных ХИК ($p < 0,05$), что может свидетельствовать об отсутствии атопического механизма в обеих группах. Однако в изучаемых группах достовер-

ных различий по данному показателю не было выявлено как в сыворотке, так и в спонтанной и индуцированной продукции клетками крови. При сравнительном анализе показателей IL-10 в сыворотке крови было отмечено, что у больных ХАК и контрольной группы не было выявлено достоверных различий, однако в группе больных ХИК данный показатель составил 19,3 пг/мл [0,8-78,8], что было достоверно выше по сравнению с группой контроля, где данный показатель составил 1,0 [0-3,4] (критерий Манна–Уитни, $p = 0,00001$). Кроме того, при сравнении показателей IL-10 в группах ХАК и ХИК также наблюдалось достоверное повышение данного показателя у больных ХИК (критерий Манна–Уитни, $p = 0,000032$). Более того, было выявлено повышение IL-10 у больных ХИК и в спонтанной продукции клетками крови по сравнению с показателями больных ХАК. Известно, что IL-10 является основным продуктом регуляторных клеток T_H1, которые формируются в ходе иммунного ответа на периферии [11]. Повышение данного цитокина как по сравнению с контрольной группой, так и с группой больных ХАК может свидетельствовать о возможном участии данного цитокина в патогенезе ХИК.

При исследовании уровня спонтанной продукции IL-17 у больных ХАК было отмечено повышение данного показателя, который составил 58,3 пг/мл [45,0-98,1] по сравнению с результатами контрольной группы (критерий Манна–

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ПРОДУКЦИИ IL-4, IL-10, IL-17А У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ И ЛИЦ КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ (Q_{25} ; Q_{75})

Показатели	Больные ХАК (n = 50)	Больные ХИК (n = 48)	Контрольная группа (n = 30)
IL-4 сыв., пг/мл	0,39 (0-0,71)*	0 (0-0)**	4,6 (0,21-5,0)
IL-4 сп., пг/мл	0,8 (0,2-3,2)	2,8 (1,2-3,4)	0,1 (0-0,5)
IL-4 инд., пг/мл	1,8 (0,5-4,8)	3,6 (0,9-6,8)	1,0 (0,7-3,3)
IL-10 сыв., пг/мл	0 (0-3,0)***	19,3 (0,8-78,8)**	1,0 (0-3,4)
IL-10 сп., пг/мл	9,75 (0-11,1)***	19,5 (10,0-31,1)	11,3 (6,05-18,9)
IL-10 инд., пг/мл	10,1 (4,3-20,0)	15,1 (6,3-25,6)**	8,85 (0,7-21,25)
IL-17 сыв., пг/мл	0 (0-0)	0 (0-0,8)	0 (0-1,0)
IL-17 сп., пг/мл	58,3 (45,0-98,1)*	11,3 (3,0-18,1)***	5,4 (0-22,0)
IL-17 инд., пг/мл	95,55 (62,6-105,0)*	15,55 (2,6-25,0)***	6,1 (0-23,5)

Примечание. * – статистически значимые различия больных ХАК и контрольной группы;

** – статистически значимые различия больных ХИК и контрольной группы;

*** – статистически значимые различия больных ХАК и ХИК.

Используемые сокращения: сыв. – определение цитокинов в сыворотке крови; сп. – спонтанная продукция цитокинов клетками иммунной системы; инд. – индуцированная продукция цитокинов клетками иммунной системы.

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *IL-4* (C-589T), *IL-10* (G-1082A), *IL-17* (G-197A) У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Показатель	Генотип	Частота встречаемости генотипа, %			OR (95%CI) p		
		ХАК (n = 50)	ХИК (n = 48)	Здоровые (n = 30)	ХАК и ХИК	ХАК и здоровые	ХИК и здоровые
<i>IL-4</i> (C-589T)	CC	62,0%	51,1%	56,7%	1,561 (0,637-3,840) p = 0,307	1,248 (0,449-3,465) p = 0,646	0,799 (0,284-2,240) p = 0,814
	CT	22,0%	35,6%	36,7%	0,511 (0,187-1,384) p = 0,175	0,487 (0,159-1,480) p = 0,198	0,953 (0,327-2,782) p = 1,000
	TT	16,0%	13,3%	6,7%	1,238 (0,347-4,488) p = 0,778	2,667 (0,467-19,737) p = 0,306	2,154 (0,350-16,785) p = 0,464
<i>IL-10</i> (G-1082A)	GG	62,0%	64,4%	60,0%	0,900 (0,359-2,256) p = 0,834	1,088 (0,388-3,039) p = 1,000	1,208 (0,419-3,484) p = 0,808
	GA	34,0%	35,6%	40,0%	0,934 (0,368-2,368) p = 1,000	0,773 (0,273-2,185) p = 0,636	0,828 (0,287-2,387) p = 0,808
	AA	4,0%	0,0%	0,0%	–	–	–
<i>IL-17</i> (G-197A)	GG	36,0%	20,0%	53,3%	2,250 (0,810-6,352) p = 0,112	0,492 (0,176-1,362) p = 0,163	0,219 (0,069-0,680) p = 0,005*
	GA	44,0%	71,1%	43,3%	0,319 (0,124-0,812) p = 0,012*	1,027 (0,374-2,830) p = 1,000	3,219 (1,102-9,564) p = 0,029*
	AA	20,0%	8,9%	3,3%	2,563 (0,661-10,680) p = 0,155	7,250 (0,863-159,805) p = 0,046*	2,829 (0,272-70,082) p = 0,642

Примечание. * – достоверное различие частоты встречаемости генотипов по генам цитокинов между группами (p < 0,05).

Уитни, p = 0,00001). При сравнении результатов по спонтанной и индуцированной продукции *IL-17* клетками иммунной системы между больными ХАК и ХИК было также получено достоверное повышение данного показателя у больных ХАК (Wilcoxon test, p = 0,035). Учитывая ключевую роль Th17-популяции лимфоцитов в патогенезе аутоиммунных заболеваний, можно предположить, что повышение *IL-17* может сви-

детельствовать о ведущем аутоиммунном механизме у больных ХАК.

Данные молекулярно-генетических исследований показали, что носительство аллели С полиморфизма *IL-4* (C-589T) у больных ХАК и ХИК достоверно не отличалось от показателей контрольной группы (табл. 2). Не было обнаружено достоверных различий генотипов в группах и при изучении аллеля *G IL-10* (G-1082A).

Сравнительное исследование частот генотипов *IL-17 (G-197A)* показал следующее распределение. Так, следует отметить, что генотип *IL-17 (197GG)* статистически реже встречался у больных ХИК по сравнению со здоровыми людьми (OR = 0,219 (0,069-0,680) p = 0,005). По генотипу *IL-17 (197GA)* было получено достоверное повышение у пациентов ХИК по сравнению с контрольной группой (OR = 3,219 (1,102-9,564) p = 0,029). Кроме того, гетерозиготное носительство у больных ХИК аллеля *G* полиморфизма (*197 G/A*) гена *IL-17A* было также достоверно выше по сравнению с группой ХАК (OR = 0,319 (0,124-0,812) p = 0,012). По мутантной зиготе полиморфизма (*197 A/A*) гена *IL-17A* достоверное повышение было выявлено у больных ХАК по сравнению с контрольной группой (OR = 7,250 (0,863-159,805) p = 0,046).

Таким образом, не обнаружено различий при изучении показателей *IL-4* в зависимости от генетических вариантов изучаемых полиморфизмов у больных ХАК и ХИК. Наиболее выраженная гиперпродукция *IL-10* у больных ХИК и отсутствие взаимосвязи с данными молекулярно-генетических исследований по генотипу *IL-10 (G-1082A)* свидетельствует о возможной роли в патогенезе ХИК другого, не изученного нами аллеля. Однако было доказано, что повышенные показатели *IL-17A* у пациентов с ХАК ассоциировались с гомозиготным носительством *AA* по сравнению с контрольной группой и гетерозиготным носительством *GA* по сравнению с группой ХИК. Выявленные различия полиморфизма генов цитокинов при ХАК и ХИК вносят вклад в изучение молекулярно-генетических основ формирования ХК и могут быть использованы при выборе метода лечения данных пациентов.

Список литературы / References

1. Баранова Н.И., Коженкова С.В., Ащина Л.А. Роль цитокинов в патогенезе хронической крапивницы // Цитокины и воспаление, 2014. Т. 13, № 1. С. 11-15. [Baranova N.I., Kozhenkova S.V., Ashchina L.A. Role of cytokines in pathogenesis of chronic urticaria. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2014, Vol. 13, no. 1, pp. 11-15. (In Russ.)]
2. Борзова Е.Ю. Новые аспекты патогенеза хронической крапивницы // Российский аллергологический журнал, 2012. № 5. С. 3-9. [Borzova E.Yu. New aspects of pathogenesis of chronic urticaria. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergy Journal*, 2012, no. 5, pp. 3-9. (In Russ.)]
3. Голубчикова Р.Н., Данилычева И.В. Оценка эффективности антигистаминной терапии у больных хронической идиопатической крапивницей // Российский аллергологический журнал, 2012. № 2. С. 13-18. [Golubchikova R.N., Danilycheva I.V. Assessment of antihistaminic therapy efficacy in patients with chronic idiopathic urticarial. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergy Journal*, 2012, no. 2, pp. 13-18. (In Russ.)]
4. Данилычева И.В. Лечение крапивницы off-label // Российский аллергологический журнал, 2012. № 6. С. 15-23. [Danilycheva I.V., Pecherey I.O. Treatment of urticarial off-label. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergy Journal*, 2012, no. 6, pp. 15-23. (In Russ.)]
5. Колхир П.В. Крапивница и ангиоотек. М.: Практическая медицина, 2012. 364 с. [Kolkhir P.V. Urticaria and angioedema]. Moscow: Practice Medicine, 2012. 364 p.
6. Молотилов Б.А., Караулов А.В., Орлова Е.А., Болц Е.А., Алешкин В.А., Новикова Л.И., Лютов А.Г. Новые аспекты в диагностике и лечении аутоиммунной крапивницы // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2011. № 4. С. 11-14. [Molotilov B.A., Karaulov A.V., Orlova E.A., Bolc E.A., Alyoshkin V.A., Novikova L.I., Lyutov A.G. New aspects in diagnostics and treatment of autoimmune urticarial. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergy, Infectology*, 2011, no. 4, pp. 11-14. (In Russ.)]
7. Синельникова Н.А., Калинина Н.М., Савенкова Н.Д. Хроническая крапивница в детском возрасте. Формы хронической крапивницы у детей. Дифференциальная диагностика (часть II) // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 4. С. 313-324. [Sinelnikova N.A., Kalinina N.M., Savenkova N.D. Chronic urticaria in childhood. Chronic urticaria forms in children. Differential diagnostics (part II). *Meditinskaya immunologiya = Medicine Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 4, pp. 313-324. (In Russ.)]
8. Goh C.L., Tan K.T. Chronic autoimmune urticaria: where we stand? *Indian J. Dermatol.*, 2009, Vol. 54, no. 3, pp. 269-274.
9. Jin C.Y., Wang D.L., Fang Z.D. Effect of integrative Chinese and western medicine in treating chronic urticaria and its impact on interleukin-10 and interleukin-8 in peripheral blood. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2008, Vol. 28, no. 4, pp. 358-360.

10. Kaplan A.P., Greaves M. Pathogenesis of chronic urticaria. *Clin. Exp. Allergy*, 2009, Vol. 39, no. 6, pp. 777-787.
11. O'Garra, A., Vieira P.L., Goldfeld A.E. IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *Journal of Clinical Investigation*, 2004, Vol. 114, is. 10, pp. 1372-1378.
12. Zuberbier T. A Summary of the New International EAACI/GA2LEN/EDF/WAO Guidelines in Urticaria. *W. Allergy Org. J.*, 2012, no. 5, pp. 1-5.

Авторы:

Баранова Н.И. — д.б.н., доцент, заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией, ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения РФ, г. Пенза, Россия

Левашова О.А. — к.б.н., доцент, старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории, ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения РФ, г. Пенза, Россия

Коженкова С.В. — аспирант кафедры аллергологии и иммунологии ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения РФ, г. Пенза, Россия

Authors:

Baranova N.I., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Central Research Laboratory, Penza Institute of Postgraduate Medical Education, Penza, Russian Federation

Levashova O.A., PhD (Biology), Associate Professor, Senior Research Associate, Central Research Laboratory, Penza Institute of Postgraduate Medical Education, Penza, Russian Federation

Kozhenkova S.V., PhD Fellow, Department of Allergology and Immunology, Penza Institute of Postgraduate Medical Education, Penza, Russian Federation

Поступила 13.02.2015
Принята к печати 17.02.2015

Received 13.02.2015
Accepted 17.02.2015