

Полиморфизм промотора гена *IL1B* (*G1473C*) и его влияние на содержание интерлейкина 1 в крови больных рожей

Емельянов А.С., Емельянова А.Н., Пушкарёв Б.С., Витковский Ю.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Чита, artur1926@yandex.ru

Целью исследования явилось изучение генетического полиморфизма промотора гена *IL1B* (*G1473C*) *rs1143623* и его влияния на содержание IL1B в крови больных рожей при первичном и рецидивирующем течении. В исследовании участвовали 84 больных рожей (51 пациент с первичной рожей, 33 пациента с рецидивирующей формой заболевания) и 82 здоровых резидента. Для анализа полиморфизма гена *IL1B* (*G1473C*) использован метод полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией. Измерение концентрации IL1B проводилось методом иммуноферментного анализа. Аллель *C*, генотипы *G/C* и *C/C* промотора гена *IL1B* (*G1473C*) предрасполагают к развитию рожи. Гомозиготный вариант *C/C* промотора гена *IL1B* (*G1473C*) увеличивает риск развития рецидивирующего течения заболевания. Носительство *C*-аллеля сопровождается уменьшением продукции IL1B у больных рожей при гетерозиготном *G/C* и гомозиготном *C/C* генотипах гена *IL1B* (*G1473C*).

Ключевые слова: рожа, первичная форма, рецидивирующее течение, полиморфизм промотора гена *IL1B* (*G1473C*), концентрация интерлейкина 1B.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

Promoter gene *IL1B* (*G1473C*) polymorphism and its influence on interleukin 1B concentration in blood of patients with erysipelas

Emelyanov A.S., Emelyanova A.N., Pushkarev B.S., Vitkovsky Yu.A.

Chita State Medical Academy, Chita, artur1926@yandex.ru

Aim was to study the influence of polymorphism of *IL1B* gene promoter (*G1473C*) *rs1143623* on the concentration of IL1B in the blood of patients with erysipelas in primary and recurrent course. The study was performed in 84 patients with erysipelas (51 patients with primary erysipelas and 33 patients with recurrent course) and 82 healthy residents. Gene polymorphism of *IL1B* was detected by PCR method. Measurement of the concentration of IL1B was performed by immunoassay analysis. Allele *C*, genotypes *G/C*, and *C/C* of promoter gene of *IL1B* (*G1473C*) were more frequent among patients with erysipelas. Homozygous *C/C* genotype of promoter gene of *IL1B* (*G1473C*) increased the risk of recurrent erysipelas. *C*-allele carrier led to decrease of IL1B concentration heterozygous *G/C* and homozygous *C/C* patients.

Keywords: erysipelas, the primary form, relapsing course, gene polymorphisms of the promoter of gene *IL1B* (*G1473C*), the concentration of interleukin 1B.

Введение

Известно, что в структуре первичных форм стрептококковых рожа занимает одно из доминирующих положений [1]. Эта нозология характеризуется стабильно высокой заболеваемостью, выраженной склонностью к рецидивированию, частым нарушением лимфообращения, увеличением доли тяжелых геморрагических форм с замедленной репарацией в очаге воспаления, развитием гнойно-воспалительных осложнений и др. [2–5].

Иммунологическое реагирование при внедрении β-гемолитического стрептококка группы А сопровождается продукцией целого каскада цитокинов, регулирующих взаимодействие иммунокомпетентных клеток и определяющих направление иммунного ответа [2, 6]. Несмотря на это, реализация воспалительного ответа может значительно различаться по интенсивности и продолжительности у отдельных индивидуумов в зави-

симости от генетического полиморфизма сигнальных молекул [2]. В настоящее время описаны аллельные варианты не только структурных генов, оказывающих влияние на структуру и функциональные свойства цитокинов, но также некодирующих участков — интронов, промоторов, мутации которых изменяют экспрессию и количество кодируемого белка [6, 7].

Генетическая информация о цитокинах может являться существенным фактором для определения предрасположенности (резистентности) к инфицированию, тяжести, длительности, развитию осложнений заболеваний, в том числе и рожи [8–10].

Исследование однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) при роже показало, что полиморфные варианты генов *IL2* и *IL10* предрасполагают к развитию заболевания. Ранее нами установлено, что первичная и рецидивирующая рожа ассоциирована с аллелем *T* и гомозигот-

ным носительством *T/T* в промоторе гена *IL2 (T330G rs2069762)*, а также с аллелем *T* полиморфизма *IL10 (C819T) rs3021097* и аллелем *A* полиморфизма *IL10 (G1082A) rs3024491* [2]. Распределение частот изучаемых генов при первичной и рецидивирующей роже различается, но носительство аллелей, предрасполагающих к воспалительному заболеванию кожи, прослеживается во всех случаях независимо от клинического течения.

Интерлейкин 1В (IL1В) — провоспалительный цитокин, активно участвующий в воспалительных процессах. Ген *IL1В* расположен на хромосоме 2 и имеет множество полиморфизмов, наиболее изученными из которых являются полиморфизмы в позициях -511, -31 и +3953 [11].

Сведения о результатах исследования цитокинов при стрептококковых инфекциях немногочисленны и основаны на небольшом числе пациентов. Установлено, что продукция цитокинов, происходящая под влиянием стрептококкового токсина, коррелирует с тяжестью течения заболевания [10]. Предполагается, что высокие показатели IL1 и TNFα в реконвалесцентный период рожи могут свидетельствовать о возможности рецидивирования болезни [10]. При этом практически отсутствует информация об изучении генетического полиморфизма гена *IL1В* при роже, в том числе промоторного региона *G1473C*.

Наличие нуклеотидной замены в промоторном участке гена *IL1В* может сказаться на скорости транскрипции и трансляции кодируемого белка IL1В. В связи с этим важно проследить уровень цитокина в зависимости от полиморфных вариантов его гена при роже.

Целью исследования было изучение частоты полиморфных аллелей и генотипов промотора гена *IL1В (G1473C) rs1143623*, а также их влияния на содержание IL1В в крови больных рожей при первичном и рецидивирующем течении.

Материалы и методы

В исследование были включены больные рожей (по МКБ-10, А-46) в возрасте от 34 до 52 лет (средний возраст $47,5 \pm 3,4$ года) (40 мужчин и 44 женщины) с локализацией в области лица, верхних и нижних конечностей, эритематозной, эритематозно-буллезной, эритематозно-геморрагической, буллезно-геморрагической формами, первичного и рецидивирующего течения. Диагноз установлен на основании клинико-anamnestических данных согласно классификации В.Л. Черкасова (1986) [12]. Клиническое проявление заболевания характеризовалось лихорадкой, симптомами интоксикации, болезненности поражённого участка при пальпации, появлением на коже яркой гиперемии и отёка, регионарного лимфаденита. Критериями исключения из настоящего исследования служили: повторная и после родовая формы рожи, сахарный диабет 1 и 2 типов, пневмония, беременность, острые сердечно-сосудистые заболевания, острые и хронические вирусные инфекции, кишечные инфекции.

По кратности течения заболевания пациенты были распределены на 2 группы: основную (51 пациент с первичной рожей) и сравнения (33 пациента с рецидивирующей рожей). Контрольную группу составили 82 практически здоровых донора, не имеющих острых и хронических инфекционных и аутоиммунных заболеваний, аллергических реакций. Группы сопоставимы по возрастным и половым характеристикам (средний возраст $45,1 \pm 4,6$ года, 37 мужчин и 45 женщин).

Все обследованные — представители европеоидной расы, родившиеся и проживающие на территории Забайкальского края.

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki) (1964, 2013 — поправки) и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными Приказом Минздрава РФ (от 19.06.2003 г., №266).

Для исследования использовали цельную кровь здоровых лиц и больных рожей. Образцы крови пациентов получали в начале разгара заболевания в 1—2 день поступления в стационар.

Измерение концентрации IL1В проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Определение SNP промотора гена *IL1В (G1473C) rs1143623* осуществлялось методом ПЦР с использованием стандартных наборов НПФ «Литех» (Москва). Амплификация фрагментов гена проводилась в термочиклере (модель «Бис»-M111, ООО «Бис-Н», Новосибирск). Детекцию продукта амплификации проводили в 3% агарозном геле.

Полученные данные обработаны с использованием пакета программ Statistica 10. При сравнении частот аллелей и генотипов по качественному бинарному признаку пользовались критерием χ^2 . Степень риска развития событий оценивали по величине отношения шансов (odds ratio (OR)) с расчетом для него 95% доверительного интервала (CI95%). Для описания характера распределения количественных признаков определялись медиана (Me) и интерквартильная широта (25%—75%). При определении межгрупповых различий в уровне цитокинов применялся критерий Краскела—Уоллиса. При наличии статистически значимых различий попарное сравнение групп осуществлялось с использованием критерия Манна—Уитни с поправкой Бонферрони.

Результаты и обсуждение

Нами проведен анализ частот аллелей и генотипов гена *IL1В (G1473C)* у больных рожей и здоровых индивидов.

Распределение частот генотипов исследуемого полиморфизма гена *IL1В (G1473C)* соответствует равновесию Харди—Вайнберга ($p > 0,05$).

Выявлено, что в группе больных рожей встречаемость полиморфных вариантов *IL1B (G1473C)* существенно отличалась от контрольной группы. У пациентов с рецидивирующим течением рожи в 1,6 раза чаще выявлялся минорный аллель *C* 0,682 и 0,461 соответственно по сравнению с больными первичной рожей ($\chi^2 = 7,90$; $p = 0,005$), и в 2,9 раза чаще, чем в группе здоровых лиц — 0,238 ($\chi^2 = 40,02$; $p = 0,0002$). Обнаружено, что мажорный аллель *G* встречался у здоровых индивидов с частотой 0,732, тогда как среди пациентов с первичным заболеванием его частота составила 0,539 ($\chi^2 = 14,29$; $p = 0,0002$), а у больных рецидивирующей рожей — 0,318, что в 2,3 раза реже, чем в контроле ($\chi^2 = 40,02$; $p = 0,0002$) (таблица).

Установлено, что в группах пациентов с первичной и рецидивирующей рожей гетерозиготы *G/C IL1B (G1473C)* встречались в 52,9% и 51,5% случаев соответственно. При этом среди больных с рецидивирующим течением в 2,2 раза чаще выявлялись гомозиготы *C/C*, и в 4,5 раза реже регистрировались гомозиготы *G/G* гена *IL1B (G1473C)*, чем в группе больных первичной рожей ($\chi^2 = 8,47$; $p = 0,01$). Распределение генотипов среди здоровых лиц оказалось следующим: *G/G* — 59,8%, *G/C* — 32,9%, *C/C* — 7,3% (таблица).

Исходя из полученных данных о распределении аллелей и генотипов, риск развития рожи возрастает у лиц, несущих минорный аллель *C* (OR = 2,74 [CI95%: 1,61—4,65]) ($p = 0,0002$), носителей гетерозигот *G/C* (OR = 2,29 [CI95%: 1,12—4,70]) и гомозиготного генотипа *C/C* (OR = 3,09 [CI95%: 1,05—9,11]) промотора гена *IL1B (G1473C)* ($p = 0,0009$). При этом вероятность развития рецидивирующей формы заболевания выше у носителей гомозиготного варианта *C/C* (OR = 3,02 [CI95%: 1,14—8,03]) ($p = 0,01$).

Исходя из того, что исследуемый SNP *G1473C* гена *IL1B* расположен в промоторном регионе, мы выяснили влияние данного полиморфизма на уровень продукции кодируемого цитокина (рисунок).

Выявлено, что у пациентов с первичной и рецидивирующей рожей вне зависимости от генотипа повышается концентрация провоспалительного *IL1B* по сравнению со здоровыми лицами ($p < 0,05$). Вместе с тем, уровень цитокина у больных-носителей разных генотипов различается между собой.

При первичной роже у обладателей генотипа *G/G* повышается концентрация *IL1B* до 185,1 (166,7—203,5) пкг/мл, что значительно выше, чем в группе здоровых лиц при отсутствии антигенного воздействия ($p^1 = 0,006$). У лиц, несущих гетерозиготный вариант *G/C*, содержание *IL1B* в крови достигало уровня 177,9 (159,7—196,3) пкг/мл ($p^1 = 0,003$, $p^2 = 0,008$) (рисунок).

Среди больных рожей — носителей гомозиготного варианта *C/C* полиморфизма *IL1B (G1473C)* выявлялась минимальная концентрация *IL1B*. При первичной роже она составляла 171,3 (152,9—189,7) пкг/мл ($p^1 = 0,003$, $p^2 = 0,006$, $p^3 = 0,002$), а при рецидивирующем течении заболевания — 178,6 (160,2—196,6) пкг/мл ($p^1 = 0,004$, $p^2 = 0,003$, $p^3 = 0,008$) (рисунок).

Однако при парном сравнении уровня *IL1B* у больных первичной и рецидивирующей рожей в зависимости от генотипа нами не обнаружено статистически значимых различий (критерий Манна—Уитни, $p > 0,05$).

Таким образом, полученные данные указывают, что полиморфизм *G1473C* гена *IL1B* влияет на уровень *IL1B* в крови больных рожей. При этом развитие рецидива заболевания не связано с концентрацией этого цитокина.

Известно, что для рожи характерен высокий уровень провоспалительного цитокина *IL1B*, что, по-видимому, носит благоприятный характер, поскольку способствует развитию адаптивного клеточно-опосредованного иммунного ответа, в котором клеткам Лангерганса принадлежит ведущее значение [2, 13]. *IL1B* продуцируется макрофагами в ответ на стимуляцию антигенами β -гемолитического стрептококка группы А. Он усиливает миграцию нейтрофилов в очаг воспаления, отвечающих за реализацию местной защитной реакции силами факторов врожденного иммунитета — фагоцитоза, высвобождения

Таблица

Встречаемость SNP *IL1B (G1473C)* у здоровых лиц и больных рожей

Генотипы (%), аллели (p)	Группы			χ^2 (p) ¹	χ^2 (p) ²	χ^2 (p) ³
	Здоровые (n = 82)	Больные первичной рожей ¹ (n = 51)	Больные рецидивирующей рожей ² (n = 33)			
IL1B (G1473C)						
G/G	59,8%	27,5%	6,1%	13,98 p = 0,0009	34,10 p = 0,0004	8,47 p = 0,01
G/C	32,9%	52,9%	51,5%			
C/C	7,3%	19,6%	42,4%			
G	0,762	0,539	0,318	14,29 p = 0,0002	40,02 p = 0,0002	7,90 p = 0,005
C	0,238	0,461	0,682			
Примечание. p ¹ , p ² — значимость различий по сравнению со здоровыми; p ³ — значимость различий распределения частот генотипов и аллелей групп больных первичной и рецидивирующей рожей.						

дефенсинов и др. В ответ на стимуляцию интерлейкина 1 макрофаги выделяют гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, который амплифицирует нейтрофильный ответ. Продукция IL1B вызывает усиление синтеза IL6, индуцирующего матурацию В-клеток, продукцию острофазовых белков (С-реактивный белок, сывороточный амилоид А, фибриноген), выработку лейкоцитами и эндотелиоцитами молекул адгезии, хемокинов и других провоспалительных цитокинов, экспрессию тканевого фактора, являющего триггером гиперкоагуляции. Молекулярный эффект клеток на действие IL1B обуславливает разнообразие патогенетических механизмов, направленных на ограничение патологического очага и санацию [14, 15].

По мнению ряда авторов, продукция цитокинов под влиянием стрептококкового токсина коррелирует с тяжестью течения заболевания [16]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что концентрация IL1B при наличии аллеля *C* полиморфизма *G1473C* гена *IL1B* заметно уменьшается независимо от клинического течения заболевания. Особенно это наблюдается у носителей гомозиготного варианта *C/C*.

Можно предположить, что изученный полиморфизм влияет на экспрессию гена и приводит к снижению концентрации IL1B, что, в свою очередь, приводит к ослаблению местных клеточных и гуморальных механизмов защиты. Низкие значения концентрации IL1B могут не обеспечивать достаточную реализацию саногенных механизмов.

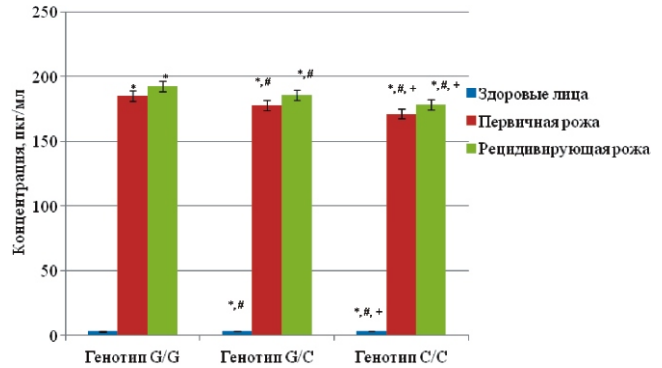
Наши предположения согласуются с мнением А.С. Симбирцева с соавт. [16] о том, что когда наблюдается генетически обусловленный перевес в сторону выработки IL1Ra в системе IL1/IL1Ra, тогда воспалительный ответ становится более продолжительным, а процесс — хроническим. Уменьшенная концентрация IL1B в реализации иммунного ответа у больных рожей может быть фактором, располагающим к рецидивированию болезни.

Выводы

1. Аллель *C*, генотипы *G/C* и *C/C* промотора гена *IL1B (G1473C)* предрасполагают к развитию рожи.
2. Гомозиготный вариант *C/C* промотора гена *IL1B (G1473C)* увеличивает риск развития рецидивирующего течения заболевания.
3. Присутствие *C*-аллеля сопровождается уменьшением продукции IL1B у больных рожей при гетерозиготном *G/C* и гомозиготном *C/C* генотипах гена *IL1B (G1473C)*.

Список литературы

1. Ратникова ЛИ, Шип СА. Современные клинико-лабораторные и гендерные особенности рожи. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2013;3:19-21.
2. Емельянова АН, Витковский ЮА. Рожа (патогенез, особенности течения). Томск: Иван Федоров. 2014;132 с.



Содержание IL1B в крови больных рожей в зависимости от генотипа полиморфизма гена *IL1B (G1473C)*, пг/мл (Ме, 25–75%): критерий Краскела–Уоллиса; p^1 (–) — статистическая значимость различий с контролем; p^2 (#) — статистическая значимость различий по сравнению с гомозиготами *G/G*; p^3 (+) — статистическая значимость различий по сравнению с гетерозиготами *G/C*.

3. Dupuy A, Benchikhi H, Roujeau J-C, et al. Risk factors for erysipelas of the leg (cellulites): coese-control study. Brit. Med. J. 1999;12:1591-1594.
4. Inghammar M, Rasmussen A, Linder A. Recurrent erysipelas — risk factors and clinical presentation. BMC Infectious Diseases. 2014;14(1):1-6. DOI: 10.1186/1471-2334-14-270.
5. Leclerc S, Teixeira A, Mahe E, et al. Recurrent erysipelas: 47 cases. Dermatology 2007;214:52-57.
6. Емельянова АН, Емельянов АС, Витковский ЮА. Генетический полиморфизм промотора гена *IL-2 (T330G)* и его влияние на содержание интерлейкина 2 в крови больных рожей. Забайкальский медицинский вестник. 2014;2:98-103.
7. Наследникова ИО, Уразова ОИ, Воронкова ОВ. Иммунопатогенез бактериальных и вирусных инфекций: роль полиморфизма генов цитокинов. Аллергология и иммунология. 2008;3:294.
8. Емельянова АН, Витковский ЮА. Эффективность препарата интерлейкина-2 в комплексной терапии рожи. Инфекционные болезни. 2011;1:66-68.
9. Емельянова АН, Емельянов АС, Витковский ЮА. Полиморфизм промотора гена интерлейкина-2 (*T330G*) при роже. Врач-аспирант. 2013;4.1(59):165-169.
10. Петров АА, Страмбовская НН, Говорин АВ, Витковский ЮА. Генетический полиморфизм *CD14*, *TNFA* и *FCGR2A* у больных гриппом А H1N1 в Забайкальском крае. Медицинская иммунология. 2011;1:83-86.
11. Tuncbilek S. Relationship between cytokine gene polymorphisms and chronic hepatitis B virus infection. World journal of gastroenterology: WJG. 2014;20:6226-6235.
12. Черкасов ВЛ. Рожа. Л.: Медицина. 1986;200 с.
13. Бубнова НА, Симбирцев АС, Шатиль МА и др. Рожистое воспаление: современный взгляд на проблему и принципы лечения. Вестник лимфологии. 2010;4:4-13.
14. Bardoe BW, Strijp JA. Molecular battle between host and bacterium: recognition in innate immunity. J. Mol. Recognit. 2011;6:1077-1086.
15. Ferrero- Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1b generation. Clin. Exp. Immunol. 2007;2:227-235.
16. Громова АЮ, Симбирцев АС. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека. Цитокины и воспаление. 2005;2:3-12.