

# ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ С ГЕНАМИ ЦИТОКИНОВОЙ СЕТИ У БОЛЬНЫХ ЮВЕНИЛЬНЫМ ИДИОПАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ

TO STUDY THE RELATIONSHIP OF IMMUNE COMPLEXES CIRCULATING IN THE BLOOD WITH CYTOKINE NETWORK GENES IN PATIENTS WITH JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS

**S. Kazantseva  
L. Nazarova  
K. Danilko  
V. Malievsky**

*Summary.* The results of an analysis of associations of circulating immune complexes (CICs) in blood serum in 244 patients with juvenile idiopathic arthritis (JIA) with various combinations of polymorphic allelic variants of the immune response mediator genes TNFα rs1800629, IL-10 rs1800872 and IL-6 rs1800795 are presented. In the group of patients with JIA, genotypes of two-locus (IL-10\*AA/IL-6\*GC, TNFα\*GA/IL-10\*CA) and three-locus (TNFα\*GG/IL-10\*AA/IL-6\*GC) models were established, significantly less common among patients with elevated levels of CEC. No associations have been established for individual loci. It is expected that in the course of further research, the results obtained will make it possible to predict and optimize the effectiveness of management of patients with JIA in accordance with its immune status and taking into account genetic characteristics.

*Keywords:* juvenile idiopathic arthritis, polymorphism of cytokine genes, circulating immune complexes, predictive medicine.

**Казанцева Светлана Римовна**

Аспирант, ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет (г. Уфа)  
smitana1@mail.ru

**Назарова Лилия Шамилевна**

Ассистент, к.м.н., ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет (г. Уфа)  
lilinaz19@mail.ru

**Данилко Ксения Владимировна**

к.б.н., доцент, ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет (г. Уфа)  
kse-danilko@yandex.ru

**Малиевский Виктор Артурович**

д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет (г. Уфа)  
malievsky@list.ru

*Аннотация.* Представлены результаты анализа ассоциаций циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови у 244 больных ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА) с различными сочетаниями полиморфных аллельных вариантов генов медиаторов иммунного ответа TNFα rs1800629, IL-10 rs1800872 и IL-6 rs1800795. В группе больных ЮИА установлены генотипы двухлокусных (IL-10\*AA/IL-6\*GC, TNFα\*GA/IL-10\*CA) и трехлокусной (TNFα\*GG/IL-10\*AA/IL-6\*GC) моделей, достоверно реже встречающиеся среди пациентов с повышенным уровнем ЦИК. Предполагается, что в ходе дальнейших исследований, полученные результаты позволят прогнозировать и оптимизировать эффективность ведения пациентов с ЮИА в соответствии с его иммунным статусом и учетом генетических особенностей.

*Ключевые слова:* ювенильный идиопатический артрит, полиморфизм генов цитокинов, циркулирующие иммунные комплексы, предиктивная медицина.

**Ю**венильный идиопатический артрит (ЮИА) — тяжелое хроническое заболевание со сложной этиологией и аутоиммунным механизмом, сопровождающееся поражением суставов и внесуставными проявлениями, нарушающее развитие детей и подростков.

Патогенетические механизмы аутоиммунных болезней связаны с накоплением ЦИК в тканях и органах. Клинически проявляется симптомами васкулита, гломерулонефрита и артрита. Повышенный уровень ЦИК в крови свидетельствует о риске их отложения в тканях, что приводит к развитию воспаления. ЦИК — высокомолекулярные соединения, которые состоят из специфических иммуноглобулинов, которые появляются в следствии

ответной реакции иммунитета на влияние антигенов, возникающее при взаимодействии антигенов с антителами. При этом активация реакции иммунной системы возможна не только внешним антигеном, но также антигенами, которые вырабатываются при жизнедеятельности, либо аутоантигенами, образующимися вследствие патологий. Оценка степени напряженности регуляторных механизмов иммунного ответа часто лишь констатирует факт её повышения или понижения у конкретного пациента. При ЮИА аутоиммунные и иммунокомплексные патологические процессы находятся в тесной взаимосвязи, определяемой генетической предрасположенностью к нарушениям иммунорегуляции, опосредуемой аутоантигенами и иммунными комплексами.

Известно, что в основе хронического патологического процесса у больных ЮИА при активации иммунного ответа лежит гиперпродукция провоспалительных цитокинов и относительная недостаточность противовоспалительных [1]. TNF $\alpha$  и IL-6 являются важными цитокинами провоспалительного ряда, активация которых приводит к нарушению регенеративных процессов в тканях суставов, инициации воспаления синовиальной оболочки сустава, повреждению хряща и кости [2]. Противовоспалительный цитокин IL-10 регулирует иммунный ответ и способен подавлять воспалительные реакции ингибируя синтез ряда других цитокинов. Неадекватная иммунная активация цитокинов провоспалительного ряда может играть важную роль в развитии ЮИА [1].

Ген фактора некроза опухоли альфа (Tumor Necrosis Factor, TNF $\alpha$ ) расположен в хромосоме 6p21.3, его структурная часть включает четыре экзона. TNF $\alpha$ , как провоспалительный цитокин, способен индуцировать синтез других провоспалительных цитокинов (интерлейкины 1, 6 и 8) поддерживая таким образом воспаление [3]. Ряд авторов показали, что индукция TNF $\alpha$  приводит к подавлению активности моноцитов и уменьшению иммунопатологического процесса у больных ЮИА [4]. Известно около 20 полиморфных вариантов гена влияющие на уровень экспрессии TNF $\alpha$ . Один из полиморфных вариантов rs1800629 обусловлен транзицией -308G>A в промоторной области, что приводит к увеличению его продукции, и как следствие активации местных воспалительных реакций [5, 6].

Ген интерлейкина 10 (IL-10) расположен в хромосоме 1q31-32.8, промоторная область гена содержит около 40 полиморфных сайтов, что обуславливает существенную индивидуальную вариативность [7]. По данным ряда исследований, замена аденина на цитозин в положении -592 в промоторной области (-592 A>C, rs1800872) ассоциирована с усиленной продукцией интерлейкина 10, и, как следствие, с повышенной выработкой антител, в том числе иммуноглобулина E [8]. Кроме того, полиморфный вариант — 592C ингибирует образование провоспалительных цитокинов, таких как TNF $\alpha$ , IL-6 в Т-клетках и моноцитах, а также снижает экспрессию основного комплекса гистосовместимости II класса в моноцитах [5, 8]. Считается, что недостаточное образование белкового продукта IL10 может служить одним из факторов, способствующих развитию воспалительного процесса в суставах [9, 10]. В то же время, по данным исследований, IL10 способствует активации и пролиферации Т-лимфоцитов, усилению продукции аутоантител, возможно это обусловлено его иммуностимулирующей активностью [11, 12].

Ген интерлейкин 6 (IL-6) расположен в хромосоме 7p21-p14 и включает пять экзонов. Являясь активатором воспалительного ответа, этот цитокин контроли-

рует созревание В— и Т-лимфоцитов, стимулирует дегенерацию суставов и костной ткани [10]. Полиморфный вариант IL-6 rs1800795, представляет собой замену гуанина на цитозин в промоторной области (-174G>C). IL-6 может обладать про— и противовоспалительным действием, одновременно ингибируя продукцию провоспалительных цитокинов (IL-1 и TNF $\alpha$ ) и активируя противовоспалительные цитокины (IL1RA и IL-10). У носителей полиморфного варианта -174C наблюдается пониженная продукция IL-6, что в свою очередь может благоприятно влиять на костную ткань не вызывая ее разрушение, и напротив, у носителей аллеля -174G выше риск развития системного ЮИА, остеопороза и других заболеваний [2]. В то же время ряд авторов приводят противоположные данные исследований [13]. Некоторые авторы отмечают, что IL6 способен стимулировать образование Т-хелперов, пролиферацию и дифференцировку В-клеток в лимфоцитарные плазматические клетки, которые в свою очередь участвуют в образовании аутоантител и служат триггером аутоиммунных нарушений [10].

Таким образом, цитокины являются участниками сложной сети взаимодействий, что требует комплексного подхода к оценке значимости полиморфных вариантов данных генов. В связи с вышеуказанным, возрастает необходимость исследования индивидуального генетического профиля, что может дать возможность прогнозировать и оптимизировать эффективность ведения пациентов с ЮИА с учетом его иммунного статуса и генетической конституции.

## Материалы и методы

В исследовании приняли участие 244 пациента с установленным диагнозом ЮИА, наблюдавшихся в кардиоревматологическом отделении ГБУЗ РДКБ. Диагноз ЮИА был установлен в соответствии с Международной лигой ассоциаций ревматологов (ILAR) [14]. Тяжелое течение наблюдалось у 21,43 %, умеренное и легкое у 64,29 и 7,14 % соответственно, у 10,14 % однозначно не дифференцировано. Тяжесть течения ЮИА, оценивалась на основании классификации терапевтических групп, определенных в рекомендациях ACR по лечению ЮИА (2011). Материалом исследования являлась периферическая кровь больных ЮИА. Забор крови проводился с добровольного информированного согласия родителей больных детей. Выделение ДНК из лимфоцитов образцов периферической венозной крови проводилось с использованием стандартного фенолхлороформного метода. Генетическое типирование осуществлялось на базе лаборатории клеточных культур ФГБОУ ВО Башкирского государственного медицинского университета. Для исследования полиморфизма генов TNF $\alpha$  rs1800629, IL-10 rs1800872, IL-6 rs1800795 использовался метод ПЦР в реальном времени (StepOnePlus™, Applied Biosystems, США). Результаты ПЦР регистрировались и интерпретировались.

тировались в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения StepOne Software v2.2.2 («Applied Biosystems», США). Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета прикладных компьютерных программ Microsoft Excel, SNPStats, R v.3.4.2 (R Core Team, 2017), PowerMarker v.3.25, STATISTICA v.10 (StatSoft, Inc.). Уровень ЦИК оценивался в сыворотке венозной крови в период острой стадии заболевания с использованием иммуноферментного анализа (ИФА), пределы нормы устанавливались в границах до 20 Ед/мл (автоматический иммуноферментный анализатор «Лазурит», АО «Вектор-Бест», Россия). Достоверность ассоциаций определялась по критерию  $\chi^2$  Пирсона для четырехпольных таблиц и точному двустороннему критерию Фишера. Результаты рассматривались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Сила ассоциаций оценивалась по показателю отношения шансов (OR) [15].

### Результаты и обсуждения

При оценке уровня ЦИК в плазме крови повышенный уровень был определен у 67,6 % больных ЮИА и в 32,4 % случаев установлен уровень, соответствующий норме. Последующий сравнительный анализ распределения частот генотипов проводили в этих двух группах (с повышенным ЦИК и в норме).

Нами был проведен анализ распределения частот генотипов двухлокусных и трехлокусной модели у пациентов с ЮИА. При анализе двухлокусной модели IL-10/IL-6 в группе больных с диагнозом ЮИА наблюдалось статистически значимое увеличение частоты генотипа IL-10\*CA/IL-6\*CC до 10,1 % среди пациентов с нормальным уровнем ЦИК (рис. 1). В группе больных с повышен-

ным уровнем ЦИК уменьшение доли пациентов с данным генотипом до 3,6 % ( $p=0,042$  OR= 0,33 95 % CI 0,11 до 1).

При анализе распределения частот встречаемости сочетаний двухлокусной модели TNF $\alpha$ /IL-10 в группе больных с диагнозом ЮИА наблюдалось статистически значимое увеличение частоты комбинаций генотипов TNF $\alpha$ \*GA/IL-10\*CA до 17,7 % среди пациентов с легким течением болезни и нормальным уровнем ЦИК. В группе пациентов с повышенным уровнем ЦИК уменьшение доли пациентов с данным генотипом до 5,5 % ( $p=0,002$ ; OR=0,27; 95 % CI 0,11 до 0,65), (рис. 2). Вероятнее всего, данный эффект может определяться генетической предрасположенностью к высокой продукции противовоспалительного цитокина IL-10 и низкой продукцией провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$ , приводящей к более эффективной иммунорегуляции [1, 5, 16].

При анализе распределения частот встречаемости аллельных вариантов генов цитокинов TNF $\alpha$ /IL-10/IL-6 в трехлокусной модели у пациентов с диагнозом ЮИА наблюдалось статистически значимое увеличение частоты встречаемости генотипа TNF $\alpha$ \*GA/IL-10\*CA/IL-6\*CC, среди пациентов с нормальным уровнем ЦИК, и уменьшение частоты данного варианта в группе пациентов с высоким показателем (5,1 % против 0,6 %;  $p=0,004$ ; OR=0,27; 95%CI 0,01-1,04) (рис. 3). Полученные данные подтверждают результаты анализа распределения частот аллельных вариантов двухлокусных моделей.

При ранжировании по тяжести течения заболевания наблюдалась тенденция уменьшения доли генотипа TNF $\alpha$ \*GA/IL-10\*CA/IL-6\*CC с тяжелым течением ЮИА относительно легкого течения (28,94 % против 14,7 %

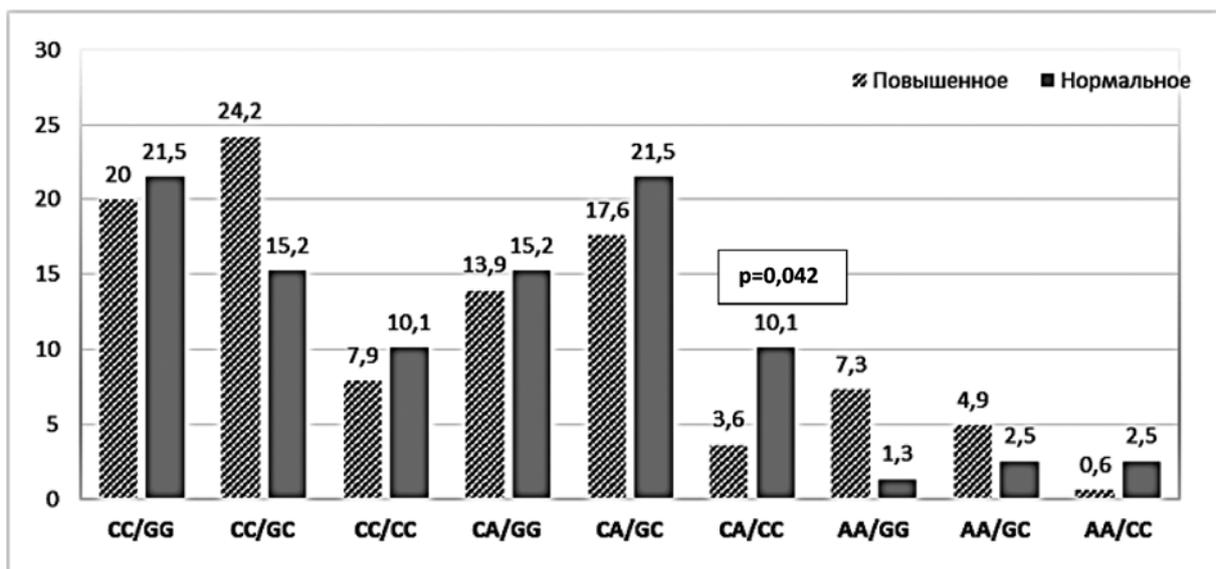


Рис. 1. Анализ двухлокусной модели аллельных вариантов генов цитокинов IL-10/IL-6 при оценке уровня ЦИК у больных ЮИА

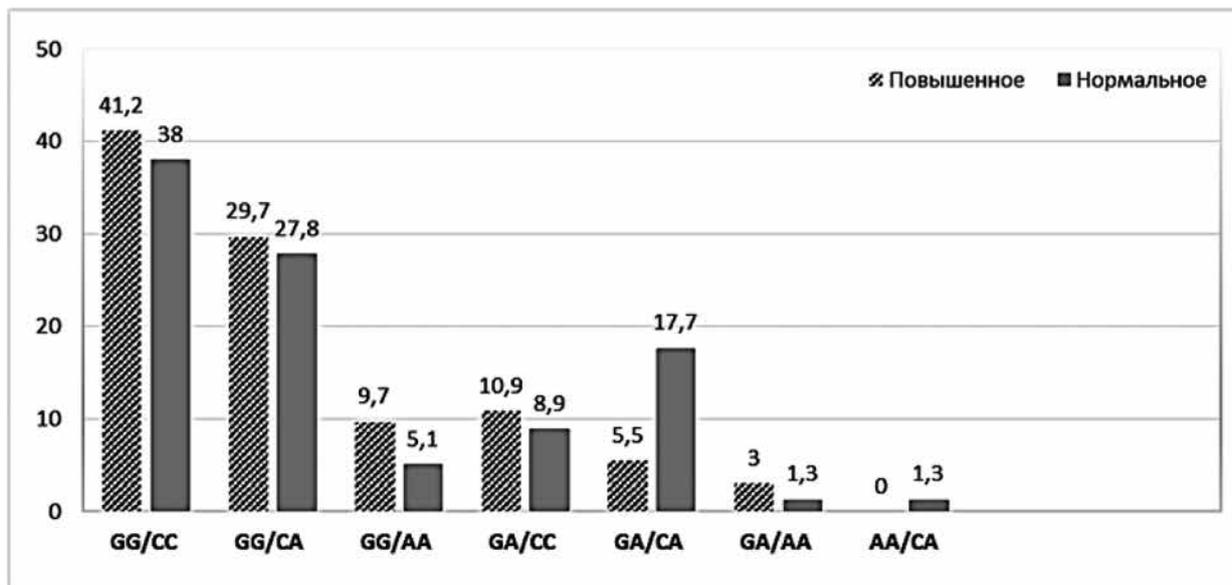


Рис. 2. Анализ двухлокусной модели аллельных вариантов генов цитокинов TNFα/IL-10 при оценке уровня ЦИК у больных ЮИА

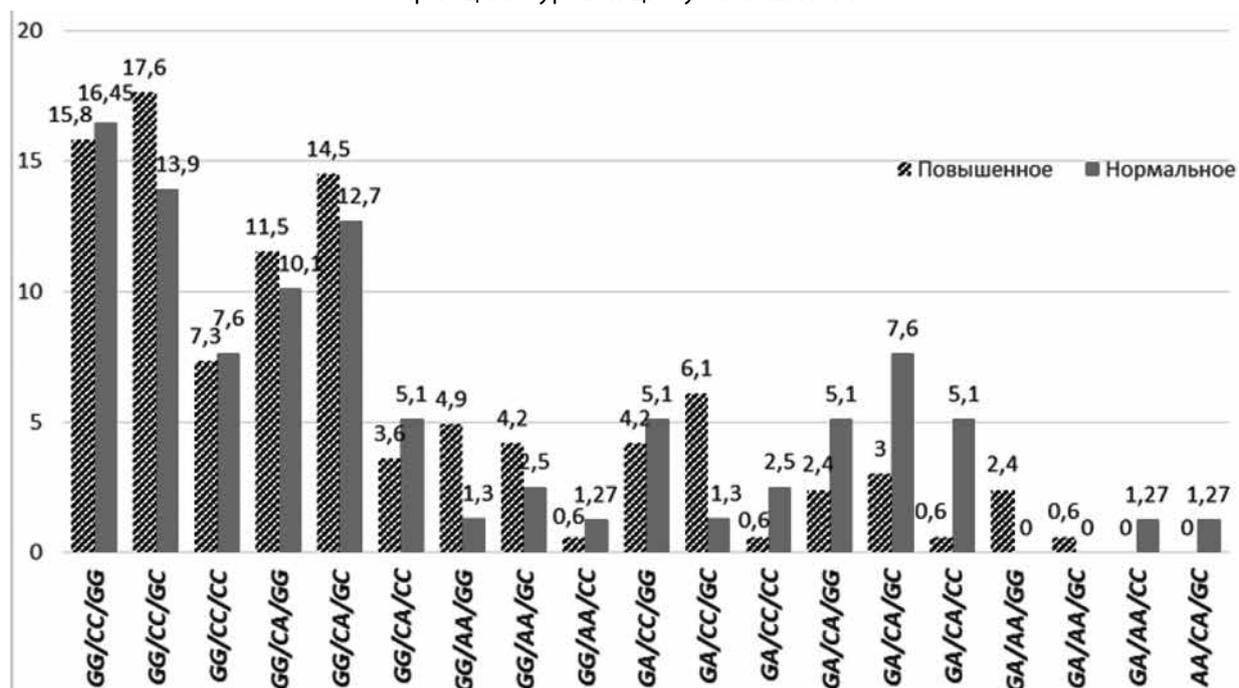


Рис. 3. Анализ трехлокусной модели аллельных вариантов генов цитокинов TNFα/IL-10/IL-6 при оценке уровня ЦИК у больных ЮИА

$p=0,1$ ), но так как выборка в результате расчетов значительно сократилась, это может привести к ошибочным выводам и требует дальнейших исследований.

### Заключение

Нами были идентифицированы генотипы двухлокусных (IL-10\*CA/IL-6\*CC, TNFα\*GA/IL-10\*CA) и трехлокусной (TNF-α\*GA/IL-10\*CA/IL-6\*CC) моделей, достоверно чаще встречающиеся в группе больных с диагнозом ЮИА у которых не отмечалось повышения уровня ЦИК и он оставался в пределах нормы, это может объясняться тем,

что генотип данных пациентов опосредует пониженный риск иммунного воспаления. В группе больных с повышенным уровнем ЦИК наблюдалось статистически значимое снижение доли представленных генотипов. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о вкладе межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов медиаторов иммунного ответа TNFα rs1800629, IL-10 rs1800872 и IL-6 rs1800795 в формирование межиндивидуальных особенностей изменения показателей циркулирующих иммунных комплексов у больных ЮИА.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mellins ED, Macaubas C, Grom AA. Pathogenesis of systemic juvenile idiopathic arthritis: some answers, more questions. *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Jun 07;7(7):416–26. doi: 10.1038/nrrheum.2011.68.
2. Насонов Е.Л. Достижения ревматологии в XXI в. *Научно-практическая ревматология*. 2014;52(2):133–141. doi.org/10.47360/1995-4484-2022-5-20
3. Sen ES, Dick AD, Ramanan AV. Uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(6):338–348. doi: 10.1038/nrrheum.2015.20.9
4. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants — past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(4):453–472. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.016.
5. Hersh AO, Prahalad S. Immunogenetics of juvenile idiopathic arthritis: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2015 Nov; 64:113–24. doi: 10.1016/j.jaut.2015.08.002.
6. Schmeling H, Horneff G. Tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms and etanercept therapy in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol Int*. 2007 Feb;27(4):383–386. doi: 10.1007/s00296-006-0208-2.
7. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants — past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(4):453–472. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.016
8. Thatayatikom A, Modica R, De Leucio A. Juvenile Idiopathic Arthritis. StatPearls Publishing. 2023 Jan; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554605/>.
9. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis [Электронный ресурс] / M.S. Fife [et al.] // *Arthritis Res Ther*. — 2006. — Vol. 8, № 5. — R148. — URL: <https://doi.org/10.1186/ar2041>. (10.04.2017).
10. The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis / Y.T. Lin [et al.] // *Autoimmun Rev*. — 2011. — Vol. 10, № 8. — P. 482–489.
11. Iyer, S.S. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease / S. S. Iyer, G. Cheng // *Crit Rev Immunol*. — 2012. — Vol. 32, № 1. — P. 23–63.
12. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor / K.W. Moore [et al.] // *Annu Rev Immunol*. — 2001. — Vol. 19. — P. 683–765.
13. Ringold S, Angeles-Han ST, Beukelman T, et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis: Therapeutic Approaches for Non-Systemic Polyarthritis, Sacroiliitis, and Enthesitis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2019 Jun;71(6):717–734. doi: 10.1002/acr.23870
14. Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J. et al. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol*. 2004; (31):390–392.
15. McDonald JH. *Handbook of Biological Statistics*. 3rd ed. Baltimore, MD, USA: Sparky House Publishing. 2014.
16. Черных ЕР, Сахно ЛВ, Шевела ЕЯ, Тихонова МА. Влияние популяционных нейтрофилов на продукцию цитокинов и простагландина E2 M1 макрофагами человека. *Иммунология*. 2017;38(4):193–196.

© Казанцева Светлана Римовна (smitana1@mail.ru); Назарова Лилия Шамиловна (lilinaz19@mail.ru);  
Данилко Ксения Владимировна (kse-danilko@yandex.ru); Малиевский Виктор Артурович (malievsky@list.ru)  
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»