

УДК: 616.5 – 002.525.2 – 056.7 – 036.12.

Роль 1258G/A поліморфізму гену *SPINK-5* у розвитку обмеженої склеродермії та хронічного червоного вовчача

М.І.Зуєва

ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України» (Харків, Україна)
mahaqq@yandex.ru

Генотипування 174 хворих на обмежену склеродермію та 76 хворих на хронічний червоний вовчак з різними стадіями та ступенями тяжкості показало, що наявність у пацієнтів аденіну (A) у 1258-му положенні 14-го екзону гену *SPINK-5* обумовлює підвищений ризик виникнення обмеженої склеродермії. Наявність генотипу AA підвищує ризик виникнення хронічного червоного вовчача. Генотип GG знижує ризик розвитку обох захворювань. Генетична складова у чоловіків з обмеженою склеродермією та хронічним червоним вовчаком відіграє більш важливу роль у розвитку даних дерматозів, ніж у жінок.

Ключові слова: обмежена склеродермія, хронічний червоний вовчак, ген *SPINK-5*, однонуклеотидний поліморфізм, 1258G/A.

Роль 1258G/A полиморфизма гена *SPINK-5* в развитии ограниченной склеродермии и хронической красной волчанки

М.И.Зуева

Генотипирование 174 больных ограниченной склеродермией и 76 больных хронической красной волчанкой с разными стадиями и степенями тяжести показало, что наличие аденина (A) в 1258-ом положении 14-го экзона гена *SPINK-5* у пациентов обуславливает повышенный риск возникновения ограниченной склеродермии, а наличие генотипа AA обуславливает повышенную предрасположенность к хронической красной волчанке. Генотип GG снижает риск возникновения обеих патологий. У мужчин, больных ограниченной склеродермией и хронической красной волчанкой, генетическая составляющая играет более важную роль в развитии дерматоза, чем у женщин.

Ключевые слова: ограниченная склеродермия, хроническая красная волчанка, ген *SPINK-5*, однонуклеотидный полиморфизм, 1258G/A.

Role of *SPINK-5* gene 1258G/A polymorphism in scleroderma and chronic lupus erythematosus development

M.I.Zuyeva

On the ground of genetic researches the *SPINK-5* gene polymorphism analysis of 174 patients with different stages and severity levels of scleroderma and 76 patients with chronic lupus erythematosus with different stages and severity levels has been presented. The association between adenine (A), AA genotype and GG genotype of *SPINK-5* gene and studied pathologies has been shown in the work. Presence of adenine (A) in position 1258 in *SPINK-5* gene causes high risk of scleroderma, AA genotype causes high risk of chronic lupus erythematosus and genotype GG causes reduced risk of studied diseases occurrence. In men genetic factors play more important role in development of scleroderma and chronic lupus erythematosus, than in women.

Key words: scleroderma, chronic lupus erythematosus, *SPINK-5* gene, single nucleotide polymorphism, 1258G/A.

Вступ

Останні роки характеризуються значними досягненнями у вивченні генетичних аспектів автоімунних процесів за допомогою молекулярних методів дослідження (Гусева, 2002; Sestak et al., 2008). Обмежена склеродермія (ОСД) та хронічний червоний вовчак (ХЧВ) відносяться до захворювань, що пов'язані з автоімунними патологіями. ХЧВ є одним із видів червоного вовчача, при якому спостерігаються переважно ураження шкіри та сполучної тканини. Основу патогенезу цих захворювань складають різноманітні порушення імунітету, що призводять до уражень шкіри, які відбуваються на рівні основних клітинних (імунокомпетентні клітини – фібробласти – ендотелій – клітини крові) та рецепторно-лігандних систем (молекули адгезії, фактори росту, інтерлейкіни та ін.) (Гусева, 2002). Важливість ролі генетичних факторів у розвитку цих мультифакторіальних захворювань підтверджено багатьма дослідженнями. Так, наприклад, якщо захворюваність на

червоний вовчак у загальній популяції варіює від 1:10 000 до 1:1000 населення, то у родичів першого ступеня вона складає від 1:250 до 1:20. Конкордантність монозиготних близнюків досягає $\geq 60\%$, а у дизиготних наближається до такої, як у родичів першого ступеня (Дядык и др., 2009).

Одна з основних ролей у розвитку ОСД та ХЧВ відводиться генам системи головного комплексу гістосумісності, HLA, проте не менше значення мають гени, що не належать до HLA-системи, – у першу чергу ті, що кодують регуляцію імунної відповіді та процеси розпізнання антигену (Ardoin, Pisetsky, 2008; Horvitz, 2008).

Такі кандидатні гени визначаються за допомогою різноманітних молекулярно-генетичних методів. Один з підходів полягає у визначенні поліморфізму генів, наприклад, однонуклеотидного поліморфізму. Однонуклеотидний поліморфізм (з англ. single nucleotide polymorphism, SNP) – гетерогенність первинної структури ДНК, що виявляється в однонуклеотидних (точкових) відмінностях алелей, тобто різниці на один нуклеотид. Наявність того чи іншого нуклеотиду може впливати на активність гену та змінювати властивості білку, який кодується даним геном. Часто зміни у структурі таких генів ведуть до розвитку тих чи інших патологічних процесів.

Ген *SPINK-5* (від англ. Serine protease inhibitor Kazal-type 5 – інгібітор серинових протеаз 5-го Казал-типу) знаходиться у хромосомі 5q та кодує інгібітор серинових протеаз. Продукт даного гену відіграє важливу роль у різноманітних морфологічних процесах в організмі: бере участь у протизапальних та антимікробних процесах (імуносупресорні функції, диференціювання Т-лімфоцитів та ін.), контролює диференціювання епітелію, організацію міжклітинного матриксу, регулює ангиогенез та клітинну адгезію (Godic, Dragos, 2004; Kabesch et al., 2004). Поліморфізм гену *SPINK-5* пов'язаний із рядом захворювань: алергіями, астмою, синдромом Нетертона, целиацією та іншими (Warpenaar et al., 2007; Hubeche et al., 2007). Відомо багато видів однонуклеотидного поліморфізму у гені *SPINK-5*, одним з яких є 1258G/A поліморфізм у 14-му екзоні. При даному виді поліморфізму у 1258 положенні 14 екзону гену *SPINK-5* може знаходитися аденін або гуанін (A/G), що у свою чергу веде до поліморфізму амінокислотної послідовності у молекулі білку (Glu 420/Lys): наявність у 420-му положенні глютамінової кислоти (за наявності у нуклеотидній послідовності гуаніну) або лізину (за наявності у нуклеотидній послідовності аденіну). Викладені вище функції гену *SPINK-5* дозволяють розглядати його як можливий кандидатний ген, що пов'язаний із розвитком аутоімунних процесів.

Метою роботи було вивчення взаємозв'язку 1258G/A поліморфізму 14-го екзону гену *SPINK-5* із схильністю до ОСД і ХЧВ.

Матеріал та методи дослідження

Однонуклеотидний поліморфізм гену *SPINK-5* (1258G/A) було досліджено у двох груп хворих. Першу групу склали 174 хворих на ОСД, які були розподілені за стадією (еритематозна, склеротична і атрофічна) та ступенем тяжкості (I – легкий, II – середній, III – тяжкий). Серед них було 39 чоловіків (22,4%) та 135 жінок (77,6%). Віковий діапазон пацієнтів становив від 19 до 74 років. Серед хворих на ОСД 9 осіб (5,2%) становили хворі на гостру стадію I ступеня, 52 (29,9%) хворих II ступеня, 28 (16,1%) хворих III ступеня; склеротичну стадію I ступеня – 4 (2,3%), II ступеня – 36 (20,7%), III ступеня – 24 (13,8%); атрофічну стадію I ступеня – 4 (2,3%), II ступеня – 15 (8,6%), III ступеня – 2 (1,1%). Друга група складалася з 76 хворих на ХЧВ, серед яких було 35 чоловіків (46,05%) та 41 жінка (53,95%). Віковий діапазон пацієнтів становив від 19 до 84 років, причому найбільша кількість хворих знаходилася у віковій групі 51–60 років (20–35,7%) та 21–30 років (11–19,6%). Хворі були досліджені залежно від стадії та ступеня тяжкості. Серед 67 хворих на ХЧВ при дискоїдній та дисемінованій формах у еритематозно-інфільтративній стадії I ступеня тяжкості було 3 (4,5%), 12 (17,9%) хворих II ступеня, 17 (25,4%) хворих III ступеня; гіперкератотично-інфільтративну стадію I ступеня – 1 (1,5%), II ступеня – 6 (9,0%), III ступеня – 15 (22,4%); атрофічну стадію I ступеня – 4 (6,0%), II ступеня – 8 (11,9%), III ступеня – 1 (1,5%). Всі хворі знаходилися на лікуванні у відділенні дерматології ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України». Контрольною групою служили 96 людей без ознак ОСД та ХЧВ віком від 19 до 74 років (37 чоловік і 59 жінок). Зразки крові були зібрані у Харківському обласному центрі служби крові.

Виділення ДНК проводилося фенольним методом з лейкоцитів периферичної крові за стандартною методикою (Маниатис и др., 1984). Дослідження генотипів по гену *SPINK-5* у хворих виконувалось методом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів. На першому етапі проводилась ампліфікація (ПЛР, полімеразна ланцюгова реакція) фрагменту 14 екзону гену *SPINK-5* довжиною 304 пари нуклеотидів із використанням наступної пари праймерів – 5'-TGC AAT TGT GAG GAT TTC ACA G-3' / 5'-CCT GAA CAT GAT CTG TGG ATC-3' (Kabesch et al., 2004) та температурних режимів: 95°C 30 секунд, 52°C 30 секунд, 72°C 40 секунд. Об'єм рестрикційної суміші – 30 мкл. На другому етапі утворені при ампліфікації фрагменти гену піддавали дії рестриктази HphI (Fermentas,

Литва), що розрізає сайт з послідовністю GGTGA(N)₈↓. Рестриктазу додавали в розрахунку 3 одиниці на 30 мкл суміші після ПЛР. Зразки інкубували протягом ночі при температурі 37°C. Обрана рестриктаза розрізає фрагмент гену на два або три фрагменти в залежності від того, який нуклеотид знаходиться у 197-му положенні фрагменту, – аденін чи гуанін. Якщо це аденін, то амплікон *SPINK-5* розрізається на дві частини, а коли у 197-му положенні знаходиться гуанін, з'являється ще один сайт рестрикції, який розпізнається ферментом *HphI*, і при цьому утворюються три фрагменти. На третьому, фінальному етапі, проводилася детекція результатів рестрикції за допомогою електрофорезу у 3% агарозному гелі. У даному виді поліморфізму може виявлятися три генотипи: AA, AG, GG в залежності від присутності у 1258-му положенні 14-го екзону аденіну або гуаніну.

Статистичний аналіз проводили із використанням критерію Фішера F, поліхоричного показника спряженості k, критерію χ^2 (Лакин, 1990; Гланц, 1999).

Результати та обговорення

В результаті проведеного генотипування хворих на 1258G/A поліморфізм гену *SPINK-5* було виділено рестрикційні фрагменти трьох генотипів (AA, AG і GG) (рис. 1).

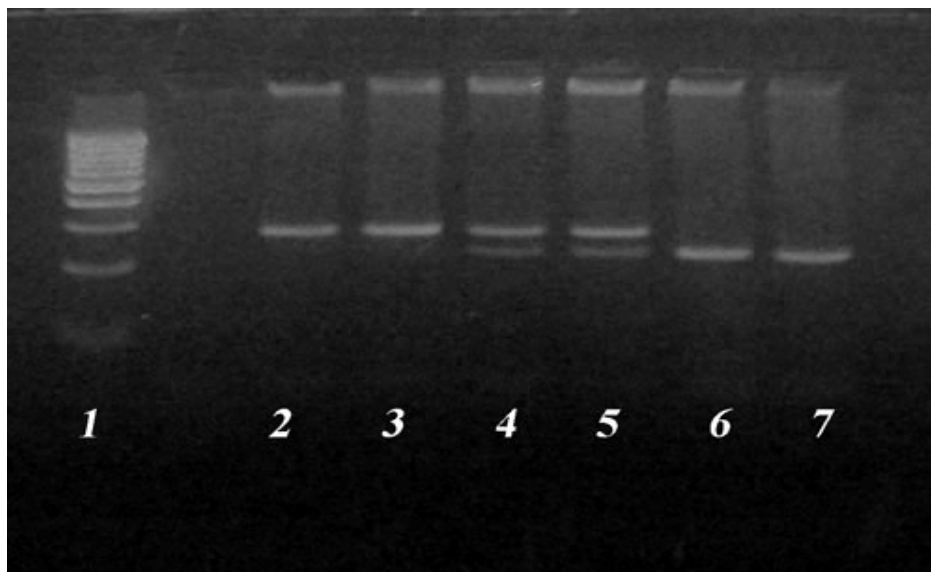


Рис. 1. Електрофореграма 1258G/A генотипів *SPINK-5* після рестрикції. 1 – маркер молекулярної маси; 2, 3 – генотип AA; 4, 5 – генотип AG; 6, 7 – генотип GG

За результатами проведених досліджень у хворих на ХЧВ було знайдено асоціацію захворювання із генотипом AA у фрагменті гену *SPINK-5* (табл. 1). У хворих генотип AA зустрічався у 38,1±5,6 %, а у контролі у 27,1±4,5 % ($p<0,05$). Генотип GG у хворих зустрічався рідше, ніж у здорових людей (13,2±3,9 % і 26,0±4,5 % відповідно, $p<0,02$).

Також було показано, що у чоловіків із ОСД генотип AG переважає у групі хворих (38,1±7,8 % – хворі, 27,1±8 % – контроль, $p<0,05$), а генотип GG у контролі (18,0±6,1 % та 43,2±8,1 % відповідно, $p<0,02$) (табл. 1). У чоловіків, хворих на ХЧВ, переважає генотип AA, який було виявлено у 45,7±8,4 % хворих, порівняно з 16,2±6 % у контролі ($p<0,02$) (табл. 1). Генотип GG у хворих чоловіків із ХЧВ частіше зустрічався в контролі (8,6±4,7 % – хворі, 43,2±8,1 % – контроль, $p<0,02$). Розходжень між частотою виявлення різних генотипів *SPINK-5* у хворих жінок обох груп порівняно з контролем виявлено не було. При порівнянні обох захворювань було знайдено різницю у зустрічальності генотипу AA у чоловіків, який в цілому частіше зустрічався у хворих на ХЧВ (45,7±8,4 % – хворі на ХЧВ, 20,5±6,5 % – хворі на ОСД).

Таблиця 1.

Розподіл генотипів *SPINK-5* у хворих на обмежену склеродермію та хронічний червоний вовчак

Група	Стать	n	Розподіл генотипів <i>SPINK-5</i> , n (%)		
			AA	AG	GG
Хворі на ОСД	чол.	39	8 (20,5)	24 (61,5)	7 (18,0)
	жін.	135	42 (31,1)	63 (46,7)	30 (22,2)
	в цілому		25 (28,7)	43,5 (50,0)	18,5 (21,3)
Хворі на ХЧВ	чол.	35	16 (45,7)	16 (45,7)	3 (8,6)
	жін.	41	13 (31,7)	21 (51,2)	7 (17,1)
	в цілому		14,5 (38,1)	18,5 (48,7)	5 (13,2)
Контроль	чол.	37	6 (16,2)	15 (40,5)	16 (43,2)
	жін.	59	20 (33,9)	30 (50,8)	9 (15,3)
	в цілому		13 (27,1)	22,5 (46,9)	12,5 (26,0)

Примітки: n – кількість обстежених, ОСД – обмежена склеродермія, ХЧВ – хронічний червоний вовчак.

Було проаналізовано зв'язок між генотипом *SPINK-5* та формою і ступенем тяжкості ОСД та ХЧВ за допомогою поліхоричного показника спряженості k (табл. 2). Поліхоричний показник спряженості обчислюється з використанням багатопільної кореляційної таблиці і дозволяє виявити силу зв'язку між двома якісними показниками (генотипом та стадією або ступенем тяжкості захворювання). Показник спряженості k може мати значення від нуля до одиниці. Чим ближче значення показника спряженості k до одиниці, тим сильніше зв'язок між досліджуваними показниками.

Найбільш виражений зв'язок існує між еритематозною стадією ОСД та генотипом *SPINK-5* ($k=0,5$, $p<0,01$). При склеротичній і атрофічній стадіях зв'язку з генотипом *SPINK-5* виявлено не було. Крім того, було виявлено зв'язок між ОСД у цілому та генотипом *SPINK-5* ($k=0,51$, $p<0,01$).

Найбільш виражений зв'язок було знайдено між генотипом *SPINK-5* та ХЧВ в цілому ($k=0,3$, $p<0,01$). При дослідженні окремих стадій кореляції знайдено не було.

Отримані результати щодо розподілу генотипів у хворих та здорових донорів можна пояснити тим, що присутність в гені *SPINK-5* аденіну (A) у 1258 положенні веде до зміни амінокислотного складу інгібітору серинових протеаз, який є продуктом даного гену. Ці зміни у свою чергу зумовлюють зниження активності даного ферменту. Білок *SPINK-5* є одним із ключових регуляторів ферментативних процесів в організмі людини. Зниження активності інгібітору призводять до аномального підвищення рівня активності білків-мішеней *SPINK-5* – протеолітичних ферментів, які зумовлюють, зокрема, запальні процеси та беруть участь у багатьох інших імунологічних процесах. Продукт гену *SPINK-5* відноситься до негативних регуляторів імунної відповіді, тому зміна його активності у бік зменшення може привести до виникнення аутоімунних процесів, що приводять до таких патологій, як ОСД та ХЧВ. Ці порушення також можуть бути пов'язані із змінами на рівні диференціювання клітин імунної відповіді, яке також контролюється продуктом гену *SPINK-5*. Треба відзначити також роль *SPINK-5* у формуванні бар'єрної функції шкіри і, зокрема, захисту від ультрафіолетового випромінювання, інфекційних агентів, хімічно активних речовин, несприятливих факторів зовнішнього середовища (Deraison et al., 2007).

Результати генотипування у хворих на ОСД та ХЧВ дають підставу для припущення, що у чоловіків генетична складова у розвитку даних захворювань має більш істотне значення, ніж у жінок.

Таблиця 2.
Розповсюдження генотипів SPINK-5 у хворих на обмежену склеродермію та хронічний червоний вовчак у залежності від стадії та ступеня тяжкості

Захворювання	Стадія	Ступінь тяжкості	Усього хворих	Розподіл генотипів SPINK-5, n			
				AA	AG	GG	
Обмежена склеродермія	Еритематозна	I	9	2	4	3	
		II	52	24	12	16	
		III	28	5	17	6	
	k=0,5, $\chi^2_{\text{факт}}=22,59$, $\chi^2_{\text{порог}}=18,47$, p<0,01						
	Склеротична	I	4	4	1	3	0
		II	36	13	19	4	
		III	24	6	15	3	
	k=0,284, $\chi^2_{\text{факт}}=10,04$, $\chi^2_{\text{порог}}=18,47$, p>0,05						
	Атрофічна	I	4	4	2	1	1
		II	15	15	3	5	7
III		2	2	0	1	1	
k=0,26, $\chi^2_{\text{факт}}=6,83$, $\chi^2_{\text{порог}}=18,47$, p>0,05							
Усього хворих			174	56	77	41	
Хронічний червоний вовчак	Еритематозно-інфільтративна	I	3	3	2	1	0
		II	12	12	4	6	2
		III	17	17	8	7	2
	k=0,35, $\chi^2_{\text{факт}}=6,92$, $\chi^2_{\text{порог}}=18,47$, p>0,05						
	Гіперкератотично-інфільтративна	I	1	1	1	0	0
		II	6	6	2	3	1
		III	15	15	10	3	2
	k=0,33, $\chi^2_{\text{факт}}=5,28$, $\chi^2_{\text{порог}}=18,47$, p>0,05						
	Атрофічна	I	4	4	1	2	1
		II	8	8	2	6	0
III		1	1	0	0	1	
k=0,19, $\chi^2_{\text{факт}}=1,1$, $\chi^2_{\text{порог}}=18,47$, p>0,05							
Усього хворих			67	30	28	9	

Примітки: n – кількість хворих, k – поліхоричний показник спряженості, $\chi^2_{\text{факт}}$ – фактичне значення критерію χ^2 , $\chi^2_{\text{порог}}$ – табличне значення критерію χ^2 .

Наші результати у майбутньому дозволяють отримати більш високий ступінь передбачуваності виникнення ОСД та ХЧВ у чоловіків та у хворих із еритематозною стадією ОСД на підставі аналізу генотипу SPINK-5.

Подяка

Автор висловлює подяку завідуючій відділенням дерматології ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України» канд. мед. наук В.В.Савенковій та головному лікарю Харківського обласного центру служби крові В.В.Яворському за сприяння у проведенні дослідження.

Список літератури

- Гусева Н.Г. Системная склеродермия: клиника, диагностика, лечение // Рос. журн. кож. и вен. бол. – 2002. – №4. – С. 5–15.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459с.
- Дядык А.И., Багрий А.Э., Ракитская И.В., Щукина Е.В. Системная красная волчанка: некоторые вопросы этиологии и патофизиологии // Український ревматологічний журнал. – 2009. – №2. – С. 61–66.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генной инженерии. Молекулярное клонирование / Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 480с.
- Ardoin S.P., Pisetsky D.S. Developments of the scientific understanding of lupus // *Athr. Res. Ther.* – 2008. – №10. – P. 218–226.
- Deraison C., Bonnart C., Lopez F. et al. LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction // *Mol. Biol. Cell.* – 2007. – Vol.18, №9. – P. 3607–3619.
- Godic A., Dragos V. Successful treatment of Netherton's syndrome with topical calcipotriol // *Europ. J. Dermatol.* – 2004. – Vol.14, №1. – P. 115–117.
- Horvitz D.A. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future // *Athr. Res. Ther.* – 2008. – №10. – P. 226–235.
- Hubiche T., Ged C., Benard A. et al. Analysis of SPINK 5, KLK 7 and FLG genotypes in a French atopic dermatitis cohort // *Acta Derm. Venereol.* – 2007. – Vol.87, №6. – P. 499–505.
- Kabesch M., Carr D., Weiland S.K., von Mutius E. Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample // *Clin. Exp. Allergy.* – 2004. – Vol.34, №2. – P. 340–345.
- Sestak A.L., Nath S.K., Sawalha A.H., Harley J.B. Current status of lupus genetics // *Arthr. Res. Ther.* – 2008. – Vol.9. – P. 210–219.
- Wapenaar M., Monsuur A., Poell J. et al. The *SPINK* gene family and celiac disease susceptibility // *Immunogenetics.* – 2007. – Vol.59, №5. – P. 349–357.

Представлено: Г.К.Кондаковою / Presented: G.K.Kondakova

Рекомендовано до друку: Л.О.Атраментовою / Recommended for publishing by: L.A.Atramentova

Подано до редакції / Received: 28.12.2009.

© М.І.Зуєва, 2010
© M.I.Zuyeva, 2010