

Полиморфизм генов Toll-рецепторов 4-го и 9-го типов у больных псориазом

В.А. Охлопков¹, А.И. Новиков^{1,2}, А.В. Кононов², Е.Г. Поморгайло², Е.А. Петрова¹,
О.В. Правдина¹

¹Кафедра дерматовенерологии и косметологии (зав. — проф. В.А. Охлопков); ²кафедра патологической анатомии (зав. — проф. А.В. Кононов) ГБОУ Омская государственная медицинская академия Минздрава России

Исследованы распространенность полиморфизма генов TLR4 (C6898A) и TLR9 (A2848G) и их ассоциации с данными анамнеза и клинической картиной у 425 пациентов с прогрессирующей стадией вульгарного псориаза мужского и женского пола в возрасте от 18 до 80 лет. Установлены ассоциативные связи мутантного аллеля A гена TLR4 6898C/A с каплевидной формой псориаза, наличием псориаза у близких родственников больного, наличием сопутствующих инфекционных или паразитарных заболеваний, низкими показателями дерматологического индекса качества жизни, частым рецидивированием патологического процесса. Наличие мутантного аллеля G гена TLR9 (A2848G) ассоциировано со склонностью к экссудации псориатических элементов, снижением эффективности проводимой терапии, высоким показателем PASI до начала лечения и меньшей его динамикой в период лечения.

Ключевые слова: полиморфизм генов, Toll-рецепторы 4-го и 9-го типов (TLR4, TLR9), псориаз, распространенность полиморфных аллелей

TOLL RECEPTOR 4 AND 9 GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH PSORIASIS

V.A.Okhlopkov, A.I.Novikov, A.V.Kononov, E.G.Pomorgailo, E.A.Petrova, O.V.Pravdina

Omsk State Medical Academy, Omsk, Russia

The prevalence of TLR4 (C6898A) and TLR9 (A2848G) gene polymorphisms and their associations with case history and clinical picture were studied in 425 patients of both genders, aged 18-80 years, with advanced stage of psoriasis vulgaris. Associations of TLR4 6898C/A mutant allele A with the guttate-type psoriasis, presence of psoriasis in the patient's close relatives, presence of concomitant infectious or parasitic diseases, low dermatological quality of life index, and frequent relapses of the pathological process were detected. The TLR9 (A2848G) mutant allele G was associated with liability to exudation of psoriatic elements, inefficiency of therapy, high PASI score before therapy and its lesser changes over the course of treatment.

Key words: gene polymorphism, TLR4, TLR9, psoriasis, polymorphic allele incidence

Псориаз — один из наиболее распространенных хронических дерматозов, составляющий от 12 до 15% всех кожных заболеваний. Псориазом страдает до 3% всего населения земного шара [1], при этом его распространенность меняется в зависимости от этнической принадлежности и географического размещения популяции. Несмотря на многочисленные [2, 3] исследования отечественных и зарубежных ученых, многие аспекты этиологии и патогенеза псориаза до сих пор остаются невыясненными. В течение последних 10—15 лет наблюдается рост заболеваемости этим дерматозом, "омоложение" контингента больных, увеличение частоты тяжелых форм, нередко приводящих к инвалидизации, в частности, псориатического полиартрита, псориатической эритродермии, экссудативного и пустулезного псориаза [4]. Отсутствует единая концепция этиологии и патогенеза псориаза [5, 6].

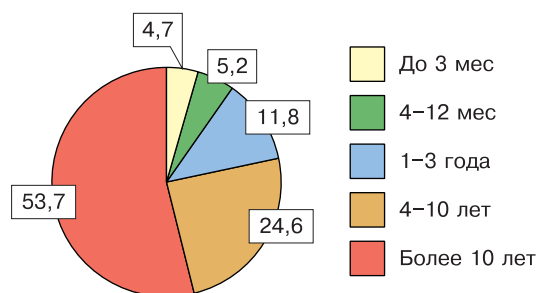
Псориаз — мультифакториальное заболевание, формирование его клинической картины и течение

определяются влиянием большого числа генетических и внешнесредовых факторов [7, 8].

Генетические факторы доминируют над средовыми, о чем свидетельствуют высокие значения коэффициента наследуемости псориаза. Вместе с тем средовая компонента, играя определенную роль в возникновении дерматоза, оказывает значительное влияние на характер течения и прогноз уже развившейся болезни. Многочисленные популяционные, семейные исследования конкордантных и дискордантных по заболеванию близнецов указывают на значительную роль генетических факторов в развитии псориаза [9], поэтому большое внимание в настоящее время уделяют молекулярно-генетическим методам анализа с определением полиморфизма генов, повышающих риск развития заболеваний. Отдельный полиморфизм гена на 1—8% повышает риск заболевания в популяции, что может показаться незначительным, но аддитивный эффект нескольких

Сведения об авторах:

Охлопков Виталий Александрович — доктор мед. наук, профессор (ochlopkov@omsk-osma.ru); Новиков Александр Иванович — доктор мед. наук, профессор; Кононов Алексей Владимирович — доктор мед. наук, профессор; Поморгайло Елена Геннадьевна — кандидат биол. наук, доцент; Петрова Елена Александровна — аспирант; Правдина Ольга Валерьевна — кандидат мед. наук, доцент.



Давность заболевания у пациентов группы исследования, %.

таких факторов может составлять 20—70% общего риска, обусловленного генетическими факторами.

Семейство Toll-подобных рецепторов (TLR) играет центральную роль в системе иммунной защиты кожи. До настоящего времени различные TLR установлены на нескольких основных клеточных популяциях, таких как кератиноциты, фибробласты, антигенпрезентирующие клетки и меланоциты. TLR участвует в поддержании гомеостаза и восстановлении ткани, активация TLR через различные внутриклеточные сигнальные пути приводит к образованию провоспалительных стимулов и считается сигналом опасности, который трансформирует кожу в функциональное состояние защиты. Идентифицированы два типа TLR: поверхностно экспрессируемые (например, 4-го типа), которые особенно активны против компонентов клеточной стенки бактерий; и внутриклеточные рецепторы, предпочтительно распознающие вирусассоциированный характер молекул (рецепторы 9-го типа). Кроме того, поверхностно экспрессируемые рецепторы инициируют фagosомные сигналы и сигналы созревания.

В генах, кодирующих структуру TLR, описаны различные однонуклеотидные полиморфные участки (Single nucleotide polymorphism, SNP). Роль полиморфизма генов *TLR4* (C6898A) и *TLR9* (A2848G) в формировании клинической картины у больных псориазом недостаточно изучена, что определило цель и задачи настоящего исследования.

Цель работы — исследование распространенности полиморфизма генов *TLR4* (C6898A) и *TLR9* (A2848G) и их ассоциации с данными анамнеза и клинической картиной у больных псориазом.

Материалы и методы

Отбор больных для исследования проводили на кафедре дерматовенерологии и косметологии Омской государственной медицинской академии (ОмГМА) и в дерматологическом отделении Омского областного клинического кожно-венерологического диспансера. Генетические исследования проводили на кафедре патологической анатомии и на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ОмГМА.

Всего наблюдали 425 неродственных больных (335 мужчин и 90 женщин) в возрасте от 18 до 80 лет, медиана возраста 46 (29—55) лет, с разными клиническими вариантами вульгарного псориаза в прогрессирующей стадии на момент включения и в стационарной и регрессирующей стадиях в процессе исследования.

Все больные прошли стационарное лечение. В историях болезни пациентов отражалось множество факторов, имеющих значение в течении псориаза: начало и последующая динамика заболевания, предполагаемые причины его возникновения, условия труда и быта, наследственность, пере-

Таблица 1
Некоторые показатели больных псориазом

| Показатель | M | SD | SE | P25 | P50 | P75 |
|--|-------|-------|------|------|------|------|
| PASI: | | | | | | |
| 1-е сутки | 23,03 | 11,17 | 0,54 | 14,9 | 22,3 | 28,1 |
| 21-е сутки | 7,79 | 5,32 | 0,26 | 4,2 | 6,6 | 9,6 |
| динамика, % | 66,91 | 11,99 | 0,58 | 60 | 67 | 76 |
| Возраст больных, годы: | | | | | | |
| в начале заболевания | 28,52 | 14,31 | 0,69 | 17 | 25 | 38 |
| при обследовании | 43,19 | 15,88 | 0,77 | 29 | 46 | 55 |
| Дерматологический индекс качества жизни, баллы | 10,78 | 4,42 | 0,21 | 7 | 11 | 14 |

несенные заболевания, состояние здоровья в момент обращения и во время лечения, результаты общеклинических и параклинических исследований.

Протокол исследования был одобрен локальным научным этическим комитетом ОмГМА. Клинически значимые результаты оценивали по степени очищения кожи от псориазных высыпаний — индексу PASI (Psoriasis Area and Severity Index) до лечения и после лечения (на 21-й день). Результаты терапии оценивали по индексу PASI и средней длительности лечения. За клиническое выздоровление принимали полное очищение кожного покрова от псориазных высыпаний. На месте патологических очагов оставалась гипер- или гипопигментация. Значительное улучшение регистрировали в случаях, когда псориазные очаги значительно уменьшались в размерах, фрагментировались на мелкие плоские папулы, в том числе в области дежурных участков.

За улучшение принимали результаты, когда удавалось лишь остановить прогрессирование псориазного процесса, добиться прекращения патологического шелушения и некоторого уменьшения очагов поражения.

Лечение считалось безрезультатным в том случае, если больных выписывали в прогрессирующей или стационарной стадии псориазного процесса, причем площадь очагов поражения оставалась прежней.

Критерии исключения: развитие побочных эффектов получаемой терапии, нарушение режима лечения, алкоголизм, наркомания, прием лекарственных препаратов, которые могут влиять на течение основного заболевания.

Полиморфизм генов исследовали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью диагностических наборов "Литех" (Россия). Определяли два генетических полиморфизма: *TLR4* (C6898A) и *TLR9* (A2848G). Выделение ДНК осуществляли с помощью системы "ДНК-экспресс кровь" ("Литех", Россия). Этапы выделения и амплификации ДНК выполняли в соответствии с требованиями, указываемыми производителем. Наборы "SNP-экспресс" предназначены для проведения аллельспецифической ПЦР, поэтому для каждого исследуемого образца выполняли амплификацию с двумя парами праймеров (комплементарными нормальному или полиморфному аллелю) в двух пробирках. Результаты оценивали по наличию или отсутствию амплифицированной ДНК. При наличии амплифицированной ДНК только в пробирке с праймерами, комплементарными нормальному аллелю, генотип оценивали как гомозиготный по нормальному аллелю, при наличии амплифицированной ДНК только в пробирке с праймерами, комплементарными полиморфному аллелю, — как гомозиготный по полиморфному аллелю, при амплификации ДНК в обеих пробирках — как гетерозиготный.

Таблица 2
Распределение полиморфизмов генов *TLR4* (C6898A) и *TLR9* (A2848G) у больных псориазом

| Полиморфизм | Ал- лель | Распростра- ненность аллеля, % | Гено- тип | Распростра- ненность генотипа, % |
|---------------|-------------|--------------------------------------|--------------|--|
| TLR4 (C6898A) | C | 89,2 ± 1,1 | C/C | 78,8 ± 2,0 |
| | A | 10,8 ± 1,1 | C/A | 20,7 ± 2,0 |
| | | | A/A | 0,5 ± 0,3 |
| TLR9 (A2848G) | A | 57,1 ± 1,7 | A/A | 24,5 ± 2,1 |
| | G | 42,9 ± 1,7 | A/G G/G | 65,2 ± 2,3 10,4 ± 1,5 |

Анализ продуктов амплификации проводили с помощью электрофореза в 3% агарозном геле с бромистым этидием.

Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрических и непараметрических методов. Накопление, корректировку, систематизацию и визуализацию полученных результатов проводилась в электронных таблицах Excel. Биометрический анализ осуществляли с помощью пакета Statistica 6.

Проверке нормальности распределения производили с использованием критериев Колмогорова—Смирнова и Шапиро—Уилки, проверку гипотез о равенстве генеральных дисперсий — с помощью критерия Левене. Средние выборочные значения количественных признаков приведены в тексте в виде $M \pm SD$ (M — среднее выборочное, SD — стандартное отклонение). В случае наличия распределения значений в ряду отличного от нормального, указывали также медиану (P50), 25-й процентиль (P25) и 75-й процентиль (P75) [10]. Для экстенсивных показателей (распространен-

ность аллеля или генотипа), выражаемых в процентах, указывали стандартную ошибку показателя (SE) [11].

В исследовании применяли анализ таблиц сопряженности, корреляционный и дисперсионный анализ [12], оценивали значения информационной статистики Кульбака (2I-статистика), рассматриваемой как непараметрический дисперсионный анализ [13]. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости p принимали равным 0,05.

Распределение наблюдаемых частот аллелей и генотипов исследуемых генов оценивали на соответствие закону Харди—Вайнберга [14].

Результаты и обсуждение

На момент включения в исследование у всех больных диагностирована прогрессирующая стадия псориаза.

Первые клинические признаки псориаза у наблюдаемых нами больных наиболее часто отмечались в возрасте 25 (17—38) лет. Значительное количество больных страдали псориазом в течение продолжительного времени. Так, почти каждый второй пациент был болен в течение 10 лет и более. Средняя продолжительность болезни составила 11 лет (см. рисунок). У 30,6 ± 2,2% пациентов псориазом болели близкие родственники, причем наследственная отягощенность чаще прослеживалась по мужской линии.

Медиана значения PASI на 1-е сутки исследования составила 22,3 (14,9—28,1) (табл. 1). На 21-й день показатель PASI существенно снижился и составил 6,6 (4,2—9,6), за время лечения снизился на 67 (60—76)%.

Таблица 3
Установленные показатели силы влияния (в %) полиморфизма генов *TLR4* (C6898A) и *TLR9* (A2848G) у больных псориазом на некоторые клинические и анамнестические признаки

| Признак | <i>TLR4</i> (C6898A) | | | | <i>TLR9</i> (A2848G) | | | |
|---|----------------------|-------------------|---------|--------------|----------------------|-------------------|---------|--------------|
| | $F_{\text{факт}}$ | $F_{\text{крит}}$ | p | сила влияния | $F_{\text{факт}}$ | $F_{\text{крит}}$ | p | сила влияния |
| Национальность (русский, казах) | 7,21 | 7,10 | < 0,001 | 3,30 | 8,40 | 7,10 | < 0,001 | 3,83 |
| Пол (мужской, женский) | 0,59 | 3,02 | - | - | 4,28 | 3,02 | < 0,05 | 1,99 |
| Псориаз обыкновенный/каплевидный или с преимущественным поражением ладоней и подошв | 8,43 | 7,10 | < 0,001 | 3,84 | 0,21 | 3,02 | - | - |
| Склонность к экссудации псориазных элементов | 0,11 | 3,02 | - | - | 5,13 | 4,66 | < 0,01 | 2,38 |
| Псориаз у родственников | 3,28 | 3,02 | < 0,05 | 1,53 | 1,24 | 3,02 | - | - |
| Сопутствующие инфекционные и/или паразитарные заболевания | 4,54 | 3,02 | < 0,05 | 2,11 | 1,54 | 3,02 | - | - |
| Дерматологический индекс качества жизни, баллы | 5,31 | 4,66 | < 0,01 | 2,46 | 0,59 | 3,02 | - | - |
| Частота рецидивов в год | 6,18 | 4,66 | < 0,01 | 2,84 | 0,89 | 3,02 | - | - |
| Эффект от проводимой терапии: значительное, умеренное, незначительное клиническое улучшение | 1,50 | 3,02 | - | - | 6,50 | 4,66 | < 0,01 | 2,99 |
| Площадь поражения кожи, % | 0,14 | 3,02 | - | - | 6,13 | 4,66 | < 0,01 | 2,82 |
| Тип PASI 1-е сутки | 1,53 | 3,02 | - | - | 4,34 | 3,02 | < 0,05 | 2,01 |
| Динамика PASI, % | 0,78 | 3,02 | - | - | 7,87 | 7,10 | < 0,001 | 3,60 |
| Возраст | 1,62 | 3,02 | - | - | 6,46 | 4,66 | < 0,01 | 2,97 |

Примечание. $F_{\text{факт}}$ — фактический уровень F -критерия Фишера; $F_{\text{крит}}$ — критический уровень F -критерия Фишера.

При исследовании полиморфизма генов у пациентов установлена следующая распространенность полиморфных аллелей генов TLRs: TLR4 (C6898A), аллель С 89,2 ± 1,1%, аллель А 10,8 ± 1,1%; TLR9 (A2848G), аллель А 57,1 ± 1,7%, аллель G 42,9 ± 1,7%. Разделение пациентов с псориазом по генотипам была следующим: TLR4 (C6898A), C/C 78,8 ± 2%, C/A — 20,7 ± 2%, A/A 0,5 ± 0,3%; TLR9 (A2848G) A/A 24,5 ± 2,1%, A/G 65,2 ± 2,3%, G/G 10,4 ± 1,5% (табл. 2).

У больных псориазом с наличием мутантного аллеля А гена TLR4 с помощью дисперсионного анализа (табл. 3) установлены ассоциативные связи со следующими факторами: этнической принадлежностью к казахской нации (сила связи 3,3%; $p < 0,001$); каплевидной формой псориаза (сила влияния 3,84%; $p < 0,001$); наличием псориаза у близких родственников (сила влияния 1,53%; $p < 0,05$); наличием сопутствующих инфекционных и/или паразитарных заболеваний (вирусные гепатиты В и С, хронический описторхоз, туберкулез легких, в том числе в анамнезе, микозы стоп, ногтей, инфекционный дерматит и др.) (сила влияния 2,11%; $p < 0,05$); низкими показателями дерматологического индекса качества жизни (сила влияния 2,46%; $p < 0,01$); частым (3 раза и более в год) рецидивированием псориаза (сила влияния 2,84%; $p < 0,01$).

У пациентов с наличием мутантного аллеля G гена TLR9 такие связи прослеживаются со следующими факторами: этнической принадлежностью к казахской нации (сила связи 3,83%; $p < 0,001$); мужским полом (сила связи 1,99%; $p < 0,05$); экссудативной формой псориаза (сила влияния 2,38%; $p < 0,01$); снижением эффективности традиционной терапии (сила влияния 2,99%; $p < 0,01$); большой площадью поражения кожи (при генотипе AG, сила влияния 2,82%; $p < 0,01$); большим показателем PASI (при генотипе AG, сила влияния 2,01%; $p < 0,05$) и меньшей динамикой его снижения в период лечения (при генотипе GG, сила влияния 3,6%; $p < 0,001$); более старшим возрастом пациентов (при генотипе GG, сила влияния 2,97%; $p < 0,01$).

Таким образом, при исследовании ассоциации полиморфных маркеров 6898C/A в гене TLR4 и 2848G/A

в гене TLR9 с клиническими признаками и данными анамнеза у больных вульгарным псориазом выявлено, что наличие аллеля А гена TLR4 ассоциировано с более частым рецидивированием псориазического процесса, а наличие аллеля G гена TLR9 связано с риском снижения эффективности стандартной терапии, что необходимо учитывать в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Скрипкин Ю.К., Кубанова А.А., Акимов В.Г. Кожные и венерические болезни. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.
2. Хобейш М.М. Псориаз и качество жизни. Медицинский вестник. 2006; 38: 12—3.
3. Sabat R., Philipp S., Höflich C., Kreutzer S., Wallace E., Asadullah K., et al. Immunopathogenesis of psoriasis. Exp. Dermatol. 2007; 16(10): 779—98.
4. Молочков В.А., Бадюкин В.В., Альбанова В.И., Волнухин В.А. Псориаз и псориазический артрит. М.: КМК, Авторская академия; 2007.
5. Федоров С.М. Псориаз: клинические и терапевтические аспекты. Русский медицинский журнал. 2001; 11: 447—51.
6. Nickoloff B.J., Qin J.Z., Nestle F.O. Immunopathogenesis of psoriasis. Clin. Rev. Allergy Immunol. 2007; 33(1—2): 45—56.
7. Galimova E., Akhmetova V., Latipov B., Kingo K., Rätsep R., Traks T., et al. Analysis of genetic variants of class II cytokine and their receptor genes in psoriasis patients of two ethnic groups from the Volga-Ural region of Russia. J. Dermatol. Sci. 2012; 68(1): 9—18. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923181112002320>
8. Connolly D.J., O'Neill L.A. New developments in Toll-like receptor targeted therapeutics. Curr. Opin. Pharmacol. 2012; 12(4): 510—51. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489212001002>
9. Bowcock A.M. The genetics of psoriasis and autoimmunity. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2005; 6: 93—122.
10. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета программ Statistica. М.: Медиа Сфера; 2006.
11. Власов В.В. Эпидемиология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2004.
12. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Издательство МГУ; 1970.
13. Закс Л. Статистическое оценивание: Пер. с нем. М.: Статистика; 1976.
14. <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>

Поступила 11.02.13

Ответы на вопросы в рубрике

«Дерматовенерология в художественной литературе и изобразительном искусстве»:

1. Отрубевидный (разноцветный) лишай.
2. Проба Бальзера.
3. Сыпной тиф.