ПИЛОТНО ПРОУЧВАНЕ НА АСОЦИАЦИЯТА НА ПРОМОТОРЕН ПОЛИМОРФИЗЪМ В ГЕНА ЗА ИНТЕРЛЕВКИН (IL)-12P40 И СЕРУМНОТО НИВО НА IL-12P40 ПРИ АНКИЛОЗИРАЩ СПОНДИЛИТ

И. Манолова[1], М. Иванова[2], Р. Стоилов[2] и С. Станилова[3]

[1]Катедра „Здравни грижи", МФ, ТУ – Стара Загора
[2]Клиника по ревматология, УМБАЛ „Св. Ив Рилски" – София
[3]Катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика", МФ, ТУ – Стара Загора

ASSOCIATION OF IL12P40 GENE PROMOTER POLYMORPHISM AND SERUM IL-12P40 WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS: A PILOT STUDY

I. Manolova[1], M. Ivanova[2], R. Stoilov[2] and S. Stanilova[3]

[1]Department of Health Care, Medical Faculty, Trakia University – Stara Zagora
[2]Clinic of Rheumatology, UMHAT "Sv. Iv. Rilski" – Sofia
[3]Department of Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics, Medical Faculty, Trakia University – Stara Zagora

Резюме. *Целта на настоящото пилотно проучване беше да изследваме ефекта на полиморфизма IL12Bpro за генетично предразположение към анкилозиращ спондилит (АС) и серумните нива на IL-12p40 в българската популация. 54 болни с АС и 83 здрави контроли бяха генотипизирани по този полиморфен маркер чрез алел-специфичен PCR метод (AS-PCR). Макар генотипното и алелно разпределение по IL12Bpro да не показа статистически значими разлики между пациентите с АС и здравите контроли, сред пациентите беше наблюдавана по-ниска честота на хомозиготния 1.1 генотип (16.7%) и по-висока – на хетерозиготния 1.2 генотип (51.8%) в сравнение със здравите контроли – съответно 24.1% за хомозиготния 1.1 генотип и 45.8% за хетерозиготния генотип. Логистичният регресионен анализ показа, че носителството на хомозиготния генотип по вариантния алел 1 намалява 1.5 пъти (OR-0.662; 95% CI 0.22÷2.01) риска от развитие на анкилозиращ спондилит в сравнение с носителството на хомозиготния генотип по „дивия" алел 2. Респективно рискът от развитие на анкилозиращ спондилит е 1.5 пъти по-висок при индивидите, носители на хомозиготния 2.2 генотип (OR-1.511; 95% CI 0.5÷4.64) и почти 2 пъти по-висок при индивидите, носители на „дивия" алел 2 в генотипа (1.2+2.2) (OR-1.89; 95% CI 0.72÷5.01) в сравнение с индивидите, носители на хомозиготния 1.1 генотип. Количественото измерване на серумните нива на IL-12p40 показа, че хомозиготният генотип 1.1 се асоциира с повишени серумни нива на IL-12p40 в сравнение с генотип 2.2 както при здравите лица, така и при болните с АС, но статистически достоверна разлика беше намерена само при болните с АС. В заключение, нашите данни подкрепят хипотезата, че генетичните вариации в гена за IL12B, влияещи на индуцираната продукция на IL-12p40, могат да допринесат за предразположението към развитие на анкилозиращ спондилит в българската популация.*

Ключови думи: *АС, генен полиморфизъм, IL-12p40*

Summary. *The aim of this pilot study was to investigate the effect of IL12Bpro polymorphism on genetic susceptibility to ankylosing spondylitis (AS) and the serum levels of IL-12p40 in the Bulgarian population. 54 patients with AS and 83 healthy controls were genotyped for this polymorphic marker by the allele-specific PCR assay (AS-PCR). Although there were no significant differences in the genotype and allele distribution of IL12Bpro polymorphism between the patients with AS and the healthy controls, a lower frequency of the homozygous genotype 1.1 (16.7%) and a higher frequency of the heterozygous genotype 1.2 (51.8%) were observed among the AS patients, compared with the healthy controls: 24.1% for the homozygous genotype 1.1 and 45.8% for the heterozygous genotype, respectively. The logistic regression analysis has shown that the carriers of IL12Bpro 1.1 are at a 1.5 times lower risk (OR-0.662; 95% CI 0.22÷2.01) of developing AS than the carriers of the homozygous genotype for the wild allele 2. Respectively, the risk of developing AS is 1.5 times higher for the individuals carrying the homozygous genotype 2.2 (OR-1.511; 95% CI 0.5 ÷ 4.64) and almost 2 times higher for these carrying the wild allele 2 in the genotype (1.2+2.2) (OR-1.89; 95% CI 0.72÷5.01), compared to the individuals, carrying the homozygous genotype 1.1. The quantitative measurement of the serum IL-12p40 levels has shown that the homozygous genotype 1.1 is associated with elevated levels of IL-12p40, compared with the genotype 2.2 in both healthy subjects and patients with AS, but a statistically significant difference was found only for the patients with AS. In conclusion, our data support the hypothesis that genetic variations in the gene for IL12B, affecting the inducible production of IL-12p40, may contribute to the AS susceptibility in the Bulgarian population.*

Key words*: AS, IL-12p40, gene polymorphism, IL-12p40*

Увод

Анкилозиращият спондилит (АС) е хронично възпалително ревматично заболяване, ангажиращо сакроилиачните стави, гръбначния стълб във вариабилна степен и по-рядко периферните стави. Точната етиология на АС, заболяване с изразен генетичен компонент, е все още неизяснена. Подчертаната асоциация с някои, но не всички субтипове на HLA-B27, потвърждава схващането, че болестта се дължи на генетично детерминиран имунен отговор към фактори на околната среда при възприемчиви индивиди. Прогресът в генетичните изследвания на спондилоартропатиите показа, че асоциацията на АС с B27 е по-комплексна и че има не-B27 MHC и не-MHC гени, които са важни за предразположението към заболяването. Все още няма съобщения за проучвания върху цялостния геном, но е идентифицирана връзката на болестта с гените за рецептора на IL-23 (IL-23R) и аминопептидаза-1 на ендоплазматичния ретикулум (ERAP-1) [12]. Асоциацията на спондилоартропатиите с генните вариации в гена за IL-23R е установена в няколко контролирани кохортни проучвания, проведени в Испания и Канада [3, 6, 16, 17].

Тази асоциация насочи вниманието и интереса на изследователите към IL-23 и семейството на IL-12 сродните цитокини, включващи още IL-12 и IL-27. Тези цитокини, продуцирани от антиген-представящите клетки, регулират диференциацията на Th клетки [2]. IL-12 индуцира диференциацията на Th0 към Th1 субпопулацията и продукцията на IFN-γ от NK клетките и Th1 лимфоцитите. IL-23 е въвлечен в диференциацията и експанзията на паметовите Т-клетки, експресиращи Th17 фенотип и продуциращи IL-17 [9], който цитокин се оказа важен ефектор при спондилоартропатиите [8]. IL-12 и IL-23 са хетеродимерни протеини, споделящи обща субединица – IL-12p40, която може да се секретира в мономерна и хомодимерна форма (IL-12p80) [4, 7, 21]. IL-12p40 субединицата се кодира от ген, означаван като *IL12B* и локализиран в дългото рамо на пета хромозома (5q31.1-5q33.1). В промоторната област на *IL12B* е описан генен полиморфизъм (rs17860508), означаван като *IL12Bpro*, дължащ се на микроинсерция от 4bp, съпроводена с GC/TT транзиция на разстояние -2703 bp от транскрипционното стартово място [12, 25]. Редица проучвания сочат, че полиморфизмът *IL12Bpro* влияе на степента на генна експресия и на количеството синтезиран цитокин [12, 13, 15, 19].

В достъпната литература намерихме само едно проучване, анализиращо значението на полиморфизма *IL12B* (rs3212227) за генетичното предразположение към анкилозиращ спондилит, в което авторите установяват асоциация на *IL2B* A1188C полиморфизма с развитието и тежестта на АС [23]. Предвид представените данни, целта на настоящото проучване беше да установим ефекта на полиморфизма *IL12Bpro* за генетичното предразположение към анкилозиращ спондилит и серумните нива на IL-12p40 при български пациенти и контроли.

Пациенти и методи

Пациенти: В настоящото проучване бяха включени 54 болни с АС (42 мъже и 12 жени, на възраст 38.6 ± 9.6 г., вариращa от 22 до 60 г. Всички пациенти изпълваха модифицираните Нюйоркски критерии за болестта без други допълнителни изисквания [22].

Като контроли бяха изследвани 83 здрави лица (58 мъже и 25 жени, на възраст 38.9 ± 10.7 г., от 19 до 74 г.).

Изолиране на геномна ДНК: Геномна ДНК беше изолирана от 2 ml венозна кръв с антикоагулант EDTA и с помощта на ДНК екстрахиращи китове на колонния принцип на екстракция (NucleoSpin Blood L, Macherey-Nagel, Duren, Germany). Концентрацията и чистотата на изолирана ДНК беше определена спектрофотометрично, използвайки NanoVue^{tm} спектрофотометър (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Генотипизиране по полиморфизма IL12Bpro: При генотипизирането по IL12Bpro полиморфизма (rs17860508) беше използван методът, познат като алел-специфичен PCR (allele-specific PCR; AS-PCR). При този метод се използват две комбинации от праймери за всяка матрична ДНК, като се провеждат две амплификационни реакции в две различни епруветки с общо три праймера – един генеричен (3'-reverse), общ за двата алела, и два алел-специфични (5'-forward), които се различават по секвенцията си в 3' края. Секвенцията на използваните от нас праймери е следната: генеричен праймер: 5'-TGG AGG AAG TGG TTC TCG TAC-3'; праймер специфичен за CTCTAA-алел, означаван като алел-1: 5'-TGT CTC CGA GAG AGG CTC TAA -3' и праймер, специфичен за GC-алел, означаван като алел-2: 5'- TGT CTC CGA

GAG AGG GCT GT-3'. В този случай на AS-PCR амплификационните фрагменти се различават и по дължината си, като алел 1 е с дължина 196 базови двойки, а алел 2 – с дължина 192 базови двойки. За AS-PCR бяха използвани реактиви, доставени от Фермантас и апарат Q Cycler от LKB Vetriebs GmbH (Vienna, Austria). След първоначална денатурация от 15 min на 95°C, бяха извършени 30 цикъла от следните стъпки: денатурация за 30 s на 95°C, хибридизация на праймерите за 30 s на 61°C и синтез на ДНК фрагмент за 30 s на 72°C. За да се завърши амплификационният процес, беше проведена още една финална инкубация от 7 min при 72° C. Получените PCR продукти бяха разделени чрез 2.5% агарозна електрофореза и визуализирани с етидиев бромид (0.5 mg/ml).

Определяне на IL-12 p40+70: Серумната концентрация на *IL-12 p40+p70* беше измерена с твърдофазов сандвичев имуноензимен метод. Бяха използвани търговски китове, следвайки протокола на производителя (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA 93012). Индивидуалните стойности на *IL-12 p40+p70* бяха изчислени след построяване на стандартна крива по 6 концентрации на референтния NIBSC (95/544) IL-12 стандарт (Hertfordshire, UK) и изразени в пикограма на милилитър (pg/ml). Минималната откриваемост на IL-12p40, посочена от производителя, е под 2.0 pg/ml. Коефициентът на вариация в серия (intra-assay CV%) е между 1.8% и 3.9% и от ден в ден (inter-assay CV%) – от 2.9% до 4.0%. Серумите на пациентите и контролите бяха съхранявани на -20°C до извършване на изследването. IL-12p40 беше определен в серумни проби от 54 болни с АС и 31 контроли.

Статистически анализи: Генотипните и алелни честоти бяха изчислени, след директно изброяване на носителите на даден генотип в изследваните групи. За сравнение на получените честоти между изследваните групи беше използвана четирикратна (2 x 2) таблица и χ^2 тест на SPSS версия 16.0 за Windows. Проверка за наличие на равновесие по закона на Харди-Вайнберг при изследването на полиморфизма rs17860508 беше извършена сред двете изследвани групи с помощта на on-line достъпен статистически калкулатор http://graphpad.com/quickcalcs/chisquared1.cfm. За да установим дали носителството на даден генотип/алел предразполага към развитие на заболяването, използвахме съотношението на шансовете (Odds Ratio, OR). Стойностите на OR са представени със съответния 95% доверителен интервал (95% CI) и са изчислени на базата на заключенията за рисков алел, използвайки интерактивен пакет от статистически програми на страница в интернет: http://statpages.org/ctab2x2.html. За сравнение на средните концентрации на IL-12 между болните с АС и здравите контроли използвахме Student T-тест. При всички използвани анализи за статистически достоверни бяха приети различия при ниво на значимост $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ

Асоциация на полиморфизма IL12Bpro с генетичното предразположение към АС

Генотипизирани бяха общо 54 болни от АС и 83 здрави контроли по полиморфизма в промоторната област на *IL12B* гена с алел-специфичен PCR метод. Установените генотипни и алелни честоти не се различаваха значимо от очакваните съгласно закона на Харди-Вайберг сред изследваните пациенти ($\chi^2 = 0.517$; $p = 0.772$) и здравите индивиди ($\chi^2 = 0.322$; $p = 0.851$).

Установените генотипни и алелни честоти сред изследваните от нас пациенти и здрави контроли са представени на табл. 1**.** Алелното разпределение на полиморфизма *IL12Bpro* не показа статистически значими разлики между пациентите с АС и контролите: 47% алел 1 и 53% алел 2 при контролите към 42.6% алел 1 и 57.4% алел 2 при случаите ($p = 0.475$). В генотипното разпределение бяха наблюдавани известни разлики между пациенти и контроли, но без да достигнат статистическа значимост ($\chi^2 = 1.123$; $df = 2$; $p = 0.57$). Сред пациентите с АС беше наблюдавана по-ниска честота на хомозиготния 1.1 генотип (16.7%) и по-висока – на хетерозиготния 1.2 генотип (51.8%) в сравнение със здравите контроли – съответно 24.1% за хомозиготния 1.1 генотип и 45.8% за хетерозиготния генотип. Логистичният регресионен анализ показа, че носителството на хомозиготния генотип по вариантния алел 1 намалява 1.5 пъти (OR-0.662; 95% CI 0.22÷2.01) риска от развитие на анкилизиращ спондилит в сравнение с носителството на хомозиготния генотип по „дивия" алел 2 (табл. 2). Респективно рискът от развитие на анкилозиращ спондилит е 1.5 пъти по-висок при индивидите, носители на хомозиготния 2.2 генотип (OR-1.511; 95% CI 0.5÷4.64) и почти 2 пъти по-висок при индивидите, носители на „дивия" алел 2 в генотипа (1.2+2.2) (OR-1.89; 95% CI 0.72÷5.01) в сравнение с индивидите, носители на хомозиготния 1.1 генотип (табл. 2)

Таблица 1. Генотипни и алелни честоти на полиморфизма IL12Bpro (rs17860508) при пациенти с AS и здрави контроли

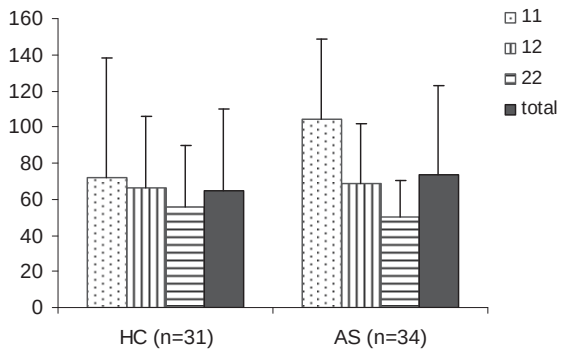
(rs17860508) ***IL12Bpro***	**AC (n = 54)**	**Контроли (n = 83)**	χ^2	**p**
	n (%)	**n (%)**		
Генотип				
1.1	9 (16.7 %)	20 (24.1 %)	1.123	0.57
1.2	28 (51.8 %)	38 (45.8 %)		
2.2	17 (31.5 %)	25 (30.1 %)		
Алел				
1	46 (42.6 %)	78 (47.0 %)	0.51	0.475
2	62 (57.4 %)	88 (53.0 %)		

Таблица 2. Риск за развитие на AC според генетичните вариации на полиморфизма IL12Bpro в българската популация

(rs17860508) ***IL12Bpro***	**OR**	**95% CI**	**p**
2.2	1.00	Ref.	
1.2	1.084	0.459÷2.565	0.841
1.1	**0.662**	0.216÷2.006	0.417
Наличие на алел 1 в генотипа (1.2 +1.1 vs 22)	0.938	0.419÷2.104	0.866
Наличие на алел 2 в генотипа (1.2 + 2.2 vs 11)	**1.887**	0.724÷5.009	0.173
2 allele	1.00	Ref.	
1 allele	0.837	0.499÷1.404	0.475
1 allele	1.00	Ref.	
2 allele	1.195	0.712-2.006	0.475

Полиморфизъм IL12Bpro и серумни нива на IL-12p40

Средните стойности на серумните нива на IL-12p40 при изследваните болни и контроли в цялата група и в зависимост от генотипа на полиморфизма *IL12Bpro* са представени на фиг. 1.



Фиг. 1. Средни стойности (+SD) на IL-12p40 при изследваните болни и контроли в цялата група и според генотипа на полиморфизма IL12Bpro

Серумната концентрация на IL-12p40 при болните с AC (mean ± SD, 73.2 ± 49.4 range, 7.2-257.6) не се различаваше статистически значимо от тази на здравите контроли (mean ± SD, 64.6 ± 45.4; range, 15.7-227.4) (p = 0.429; Student T-test). Хомозиготният генотип 1.1 беше асоциран с повишени серумни нива на IL-12p40 в сравнение с генотип 2.2 както при здравите лица (72.0 ± 66.1 vs 55.8 ± 33.5; p = 0.528), така и при болните с AC (104.5 ± 43.8 vs 50.5 ± 20.2; p = 049), но статистически достоверна разлика беше намерена само при болните с AC.

ОБСЪЖДАНЕ

В проучването изследваме влиянието на биалелен полиморфизъм в промоторната област на гена *IL12B*, означаван като *IL12Bpro*, върху генетичното предразположението към анкилозиращ спондилит и серумното ниво на IL12p40 при български пациенти и контроли. Проучването, обхващащо група от 54 болни с анкилозиращ спондилит и 83 здрави лица, е част от по-обширно проучване на нашия изследователски

екип за генетичната предиспозиция в гена *IL12B* при автоимунни [11], неоплазмени [10] и хронични възпалителни заболявания [18, 20] в българската популация. Изследвали сме асоциацията на генетичните полиморфизми в гена *IL12B* с предразположението към системен лупус сред българската популация и сме установили ролята на промоторния полиморфизъм IL12Bpro за генетичната предиспозиция към развитие на системен лупус [1, 11]. Този резултат е причината да изследваме и генетичния риск на същия полиморфизъм при друго автоимунно заболяване, каквото е АС.

Резултатите от настоящото проучване демонстрират влияние на промоторния полиморфизъм IL12Bpro в гена *IL12B* върху генетичното предразположение към анкилозиращ спондилит сред българската популация, като хомозиготният генотип 2.2 и носителството на „дивия" алел 2 в генотипа са рискови фактори за развитие на АС, докато хомозиготният генотип по вариантния алел 1 може да бъде приет като протективен фактор. Ограничаващо условие при нашите изследвания е отсъствието на статистическа значимост на получените стойности за OR, което вероятно се дължи на сравнително малкия брой от пациенти и контроли. Тъй като това е пилотно проучване, е необходимо изследванията да се продължат с по-голям контингент болни и контроли. Подобно на нас Wong и сътр. изследват асоциация на алелните варианти на друг функционален полиморфизъм в гена за IL12p40, дължащ се на замяна на A с C в 3' нетранслиращата се област (UTR) на *IL12B* с генетичната предиспозиция към развитие на анкилозиращ спондилит и тежестта на заболяването в проучване, обхващащо 362 пациенти и 362 контроли [23]. Авторите намират сигнификантно по-висок риск за развитието на анкилозиращ спондилит при индивидите, носители на хомозиготния генотип CC на A/C полиморфизма в 3'UTR на *IL12B.* В по-ранни проучвания е установен значим функционален ефект на този полиморфизъм върху продукцията на IL-12p40 – генотип AA от полиморфизма *IL12B* A/C в 3'UTR се асоциира с по-висока генна експресия 1[2] и *in vitro* продукция на IL-12p40 [19].

Изследвайки влиянието на промоторния полиморфизъм IL12Bpro в гена *IL12B* върху серумното ниво на IL-12p40, ние установихме, че хомозиготният генотип 1.1 се асоциира с повисоки серумни нива на ILp40. Тази асоциация е валидна най-вече при болните с анкилозиращ спондилит, където е и статистически значима. В по-ранно експериментално проучване, базирано на CD40 ligand-индуцирана активация на периферни мононуклеарни клетки (PBMC), е установено, че хомозиготите по алел-1 имат най-висока продукция на IL-12p40, но не секретират хетеродимерен IL-12p70. [13]. Култивирани човешки PBMC от здрави индивиди с генотип *1.1* продуцират статистически значимо по-високи концентрации IL-12p40 в сравнение с PBMC от индивиди с генотип *1.2/2.2* и след стимулация с фитохемаглутинин [5]. В проучването на Stanilova и сътр. при пациенти със силикоза също се установява, че хомозиготите по алел 1 продуцират най-високи количествта от IL-12p40 [18].

Предвид факта, че IL-12p40 е компонент и на други цитокини от семейството на IL-12, и в частност на IL-23, твърде възможно е полиморфизмът *IL12Bpro* да засяга продукцията и на този цитокин. IL-23 се оказа ключов цитокин в иницииране и поддържането на синовиалното възпаление при колаген-индуцираните артрити [14]. Има съобщения, описващи повишени нива в синовиалната течност и серума на този цитокин при болни със спондилоартропатии [8]. Установено е също, че IL-12p40 се секретира в значимо по-високи количества от хетеродимерните цитокини, и в този смисъл може да се обсъжда и самостоятелната му роля в регулацията на Th1/Th2 имунния отговор [5]. IL-12p40 участва в образуването и на хомодимера IL-12p80, който е антагонист на цитокините IL-12p70 и IL-23 чрез конкурентно свързване с техните рецептори и функционалното им блокиране [4, 7]. В този аспект по-високата продукция на IL-12p40 при индивидите с генотипа 1.1 може да доведе до намаляване на патогенетичните ефекти на IL-23, с което можем да обясним протективния ефект на този генотип за развитието на АС.

В заключение, нашите данни подкрепят хипотезата, че генетичните вариации в гена за *IL12B,* влияещи на индуцираната продукция на IL-12p40, могат да допринесат за предразположението към развитие на анкилозиращ спондилит в българската популация.

Проучването е финансирано по проект № 19/ 2010 г. на МУ – София

Библиография

1. Манолова, И. и сътр.. Асоциация на полиморфизъм в промоторната област на гена за интерлевкин-12p40 при системен лупус еритематодес. – Ревматология, 17, 2009, № 4, 33-38.

2. A c o s t a-R o d r i g u e z, E. V. et al. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. – Nat. Immunol., 8, 2007, 942-949.
3. C a r g i l l, M. et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. – Am. J. Hum. Genet., 80, 2007, 273-290.
4. C o o p e r, A. M. et S. A. Khader. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. – Trends Immunol., 2007, № 28, 33-38.
5. D o b r e v a, Z., S. Stanilova et L. Miteva. Influence of JNK and p38 MAPKs inhibition on IL-12p40 and IL-23 production depending on IL12B promoter polymorphism. – Cell Mol. Biol. Lett., 14, 2009, 609-621.
6. D u e r r, R. H. et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. – Science, 314, 2006, 1461-1463.
7. Ho l s c h e r, C. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. – Med. Microbiol. Immunol., 2004, № 193, 1-17.
8. J a n d u s, C. et al. Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides. – Arthritis Rheum., 58, 2008, 2307-2317.
9. L a n k f o r d, C. S. et D. M. Frucht. A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. – J. Leukoc. Biol., 73, 2003, № 1, 49-56.
10. M i t e v a, L. et al. Association of polymorphisms in regulatory regions of interleukin-12p40 gene and cytokine serum level with colorectal cancer. – Cancer Invest., 27, 2009, № 9, 924-931.
11. M i t e v a, L. et al. Functional genetic polymorphisms in interleukin-12B gene in association with systemic lupus erythematosus. – Rheumatol. Int., 32, 2012, № 1, 53-59.
12. Mo r a h a n, G. et al. Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. – Lancet, 2002, № 360, 455-459.
13. Mu l l e r-B e r g h a u s, J. et al. Deficient IL-12p70 secretion by dendritic cells based on IL12B promoter genotype. – Genes Immun., 2004, № 5, 431-434.
14. M u r p h y, C. A. et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. – J. Exp. Med., 198, 2003, № 12, 1951-1957.
15. P e n g, J. C. et al. IL10 and IL12B polymorphisms each influence IL-12p70 secretion by dendritic cells in response to LPS. – Immunol. Cell. Biol., 2006, № 84, 227-232
16. R a h m a n, P. et al. Association of interleukin-23 receptor variants with ank ylosing spondylitis. – Arthrits Rheum., 58, 2008, 1020-1025.
17. R u e d a, B. et al. The IL23R Arg381Gln non-synonymous polymorphism confers susceptibility to ankylosing spondylitis. – Ann. Rheum. Dis., 67, 2008, 1451-1454.
18. S t a n i l o v a, S., L. Miteva et G. Prakova. IL-12Bpro and GSTP1 polymorphisms in association with silicosis. – Tissue Antigens, 71, 2008, 169-174.
19. S t a n i l o v a, S. et L. Miteva. Taq-I polymorphism in 3'UTR of the IL-12B and association with IL-12p40 production from human PBMC. – Genes. Immun., 6, 2005, № 4, 364-366.
20. S t a n i l o v a, S., L. Miteva et G. Prakova. Interleukin-12B-3'UTR polymorphism in association with IL-12p40 and IL-12p70 serum levels and silicosis severity. – Int. J. Immunogen., 34, 2007, 193-199.
21. T r i n c h i e r i, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. – Nat. Rev. Immunol., 3, 2003, 133-146.
22. V a n d e r L i n d e n, S. M. et al. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patient with the general population. – Arthritis Rheum., 27, 1984, 241.
23. W o n g, R. H. et al. Association of IL-12B genetic polymorphism with the susceptibility and disease severity of ankylosing spondylitis. – J. Rheumatol., 39, 2012, № 1, 135-140.
24. W T C C C, TASC. Association scan of 14 500 nonsynonymous SNPs n four diseases identifies autoimmunity variants. – Nat. Genet., 39, 2007, 1329-1337.
25. Z w i e r s, A. et al. Definition of polymorphisms and haplotypes in the interleukin-12B gene: association with IL-12 production but not with Crohn's disease. – Genes. Immun., 5, 2004, 675-677.

Постъпила за печат на 30 юли 2012 г.

Адрес за кореспонденция:
Доц. д-р Ирена Манолова
Катедра по здравни грижи
Медицински факултет
Тракийски университет
ул. „Армейска" № 11
6003 Стара Загора
042 664 461

Address for correspondence:
Assoc. Prof. Irena Manolova, M.D.
Department "Health Care"
Medical Faculty
Trakia University
11, Armeiska Str.
Bg – 6003 Stara Zaggora
+359 42 664 461