

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНОГО ЛОКУСА ГЕНА *IL10* С РАЗВИТИЕМ ПЕРСИСТИРУЮЩЕГО ОЛИГОАРТИКУЛЯРНОГО ВАРИАНТА ЮВЕНИЛЬНОГО ИДИОПАТИЧЕСКОГО АРТРИТА

Л. Ш. Назарова¹✉, К. В. Данилко¹, В. А. Малиевский¹, Т. В. Викторова^{1,2}

¹ Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

² Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа

Целью исследования был поиск ассоциаций полиморфного локуса $-592C>A$ (rs1800872) гена *IL10* с развитием персистирующего олигоарткулярного варианта ювенильного идиопатического артрита (ЮИА) у детей из Республики Башкортостан. Проведено генотипирование 107 детей с персистирующим олигоарткулярным вариантом ЮИА и 206 добровольцев контрольной группы методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов и ПЦР в реальном времени. Установлено, что у пациентов с персистирующим олигоарткулярным вариантом ЮИА частота генотипа *CC* полиморфного локуса $-592C >A$ гена *IL10* значимо выше, чем в контрольной группе ($p = 0,033$). При стратификации по полу показано, что генотип *CC* и аллель *C* встречались значимо чаще, чем у здоровых добровольцев, только у девочек ($p = 0,042$ и $p = 0,025$ соответственно), но не у мальчиков с персистирующим олигоарткулярным вариантом ЮИА. Результаты исследования свидетельствуют о наличии ассоциации полиморфного локуса $-592C>A$ гена *IL10* с развитием персистирующего олигоарткулярного варианта ЮИА у детей из Республики Башкортостан.

Ключевые слова: персистирующий олигоарткулярный вариант ювенильного идиопатического артрита, ассоциация, ген *IL10*, полиморфный локус, rs1800872

✉ Для корреспонденции: Лилия Шамильевна Назарова
450005, Уфа, ул. З. Валиди, 47, корп. 2; lilinaz19@mail.ru
Статья поступила: 09.10.2015 Статья принята к печати: 12.11.2015

ASSOCIATION OF THE *IL10* GENE POLYMORPHISM WITH THE DEVELOPMENT OF PERSISTENT OLIGOARTICULAR JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS

Nazarova LSh¹✉, Danilko KV^{1,2}, Malievsky VA³, Viktorova TV^{1,4}

¹ Bashkortostan State Medical University, Ufa

² Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa

The aim of the study was to determine whether the *IL10* $-592C>A$ (rs1800872) polymorphism is associated with the development of persistent oligoarticular juvenile idiopathic arthritis (JIA) in children from Bashkortostan, Russia. Genotyping of 107 patients with persistent oligoarticular JIA and 206 healthy controls was performed by PCR-RFLP and real-time PCR methods. The *IL10* $-592CC$ genotype frequency was significantly higher in patients with persistent oligoarticular JIA than in controls ($p = 0,033$). After dividing the whole groups into subgroups based on gender there was found that the *IL10* $-592CC$ genotype and the *IL10* $-592C$ allele frequencies were significantly higher only in girls with persistent oligoarticular JIA in comparison to controls ($p = 0,042$ и $p = 0,025$, correspondingly). In this study we revealed the association of the *IL10* $-592C>A$ polymorphism with the development of persistent oligoarticular JIA in children from Bashkortostan, Russia.

Keywords: persistent oligoarticular juvenile idiopathic arthritis, association, *IL10* gene, polymorphism, rs1800872

✉ Correspondence should be addressed: Liliya Nazarova
Build. 2, 47, Z. Validi st., Ufa, Russia, 450005; lilinaz19@mail.ru
Received: 09.10.2015 Accepted: 12.11.2015

Согласно классификации Международной лиги ревматологических ассоциаций (ILAR) ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) — это артрит неустановленной этиологии, возникающий у детей до 16 лет и длящийся более 6 недель. Одним из наиболее распространенных вариантов ЮИА является олигоарткулярный, который характеризуется вовлечением в патологический процесс не более 4 суставов на протяжении первых 6 месяцев болезни и подразделяется на два подтипа в зависимости от последующего течения. Если у пациента число пораженных суставов не превышает 4 в течение всего периода заболевания, то такой олигоарткулярный вариант ЮИА обозначают как персистирующий, в противном случае — как распространившийся [1, 2]. Этиология олигоарткуляр-

ного варианта ЮИА до настоящего времени не установлена. Предполагается, что патологический процесс запускается воздействием на незрелую иммунную систему ребенка какого-то повсеместно распространенного агента окружающей среды, который, однако, пока точно не определен [2]. Вопрос о причинах, лежащих в основе повышенной предрасположенности к возникновению олигоарткулярного варианта ЮИА, также остается открытым. При этом данные отдельных исследований свидетельствуют о возможной роли ряда внешних (таких как отсутствие грудного вскармливания и неблагоприятные психосоциальные условия) и внутренних факторов, в частности молекулярно-генетических [2]. Несмотря на то что данное заболевание редко носит семейный характер, было показано,

что если у обоих близнецов развивается артрит, то 75 % таких пар конкордантны по типу его дебюта, и чаще всего это олигоартрит [3]. В ряде работ сообщается о наличии ассоциаций определенных аллелей генов главного комплекса гистосовместимости (HLA) I и II классов, а также некоторых полиморфных локусов генов семейства интерлейкинов (IL), таких как *TNFA*, *IL1A*, *IL1RN*, *IL2RA* и др., с повышенным риском развития олигоартрикулярного варианта ЮИА и/или особенностями его течения [4].

Согласно современным представлениям олигоартрикулярный и полиартрикулярный варианты ЮИА относятся к антиген-зависимым лимфоцитарно-опосредованным аутоиммунным заболеваниям, в патогенезе которых важную роль играют нарушения процессов приобретенного иммунитета [2, 5]. Предполагается, что образование аутоантигенов из тканей сустава ведет к активации аутореактивных Th- и Th17-клеток с последующим усилением образования провоспалительных цитокинов (таких как интерферон-гамма и IL17). В ответ на указанный процесс в норме происходит стимуляция продукции регуляторными Т-клетками IL10 — одного из основных противовоспалительных цитокинов, подавляющего высвобождение и функционирование провоспалительных медиаторов [5, 6]. При этом недостаточное его образование может способствовать формированию хронического артрита [5]. Так, было показано, что уровень секреции IL10 в культуре клеток цельной крови после стимуляции фитогемагглютинином и липополисахаридом у пациентов с системным вариантом ЮИА значимо ниже, чем в контрольной группе [7]. Кроме того, в ряде исследований на животных был установлен протективный эффект IL10 в отношении таких заболеваний, как экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника и др. [6]. Известно также, что изменение продукции IL10 в 75 % случаев опосредовано генетическими факторами [8].

Ген *IL10* расположен на длинном плече хромосомы 1 (q31–q32). Наиболее изученными полиморфными локусами, лежащими в регуляторной области данного гена, являются соответствующие замены в следующих положениях: –1082G>A, –819C>T и –592C>A, при этом два последних абсолютно сцеплены между собой [9]. В ряде исследований показаны ассоциации данных полиморфных локусов и/или их гаплотипов с измененной продукцией IL10 *in vitro*, а также с рядом аутоиммунных заболеваний [9, 10]. Цель нашего исследования заключалась в поиске возможных ассоциаций генотипов и аллелей полиморфного локуса –592C>A (rs1800872) гена *IL10* с развитием персистирующего олигоартрикулярного варианта ЮИА у детей из Республики Башкортостан.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Протокол работ был одобрен Этическим комитетом Башкирского государственного медицинского университета. В основную группу вошли 107 детей с персистирующим олигоартрикулярным вариантом ЮИА после подписания ими или их родителями добровольного информированного согласия. Все пациенты прошли обследование и лечение в кардиоревматологическом отделении Республиканской детской клинической больницы (г. Уфа) в 2011–2014 гг. В качестве контрольной группы были подобраны 206 добровольцев без аутоиммунных заболеваний в анамнезе. Все участники исследования проживали на территории Республики Башкортостан.

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из лимфоцитов периферической венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [11]. Изучение полиморфного локуса –592C>A гена *IL10* проводили методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализа полиморфизма длин рестрикционных

фрагментов (эндонуклеаза рестрикции RsaI, «СибЭнзим», Россия), верифицировали методом ПЦР в реальном времени с помощью праймеров и зондов фирмы «ДНК-Синтез» (Россия) на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems, США) [12]. Частоты генотипов и аллелей определяли с использованием программы Microsoft Excel. Для сравнения частот генотипов и аллелей в исследуемых группах рассчитывали точный двусторонний критерий Фишера — р(F) в программе WinPeri v.11.44. Для оценки риска развития заболевания использовали показатель отношения шансов (OR) и 95 % доверительный интервал (95 % CI) Baptista-Pike (программы Microsoft Excel, R v.3.2.0 с пакетом ORCI). Для проверки возможных моделей наследования и соответствия выборки ожидаемому по Харди–Вайнбергу применяли логистический регрессионный анализ (программа SNPStats [13]). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средний возраст больных с персистирующим олигоартрикулярным вариантом ЮИА составил $7,8 \pm 0,41$ года, распределение по полу — 29,9 % мальчиков и 70,1 % девочек. В контрольной группе средний возраст — $18,23 \pm 0,07$ года, 39,8 % юношей и 60,2 % девушек. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного локуса –592C>A гена *IL10* у больных с персистирующим олигоартрикулярным вариантом ЮИА и в контрольной группе соответствовало ожидаемому по Харди–Вайнбергу ($p = 0,13$ и $p = 0,54$ соответственно).

При проведении сравнительного анализа полученных данных было установлено, что у пациентов с персистирующим олигоартрикулярным вариантом ЮИА значимо чаще, чем в контрольной группе, встречался генотип CC ($p(F) = 0,033$; OR = 1,675, 95 % CI 1,053–2,688) (таблица).

Частоты генотипов и аллелей полиморфного локуса –592C>A гена *IL10* в группах пациентов с персистирующим олигоартрикулярным вариантом ЮИА и здоровых лиц из Республики Башкортостан

Генотипы и аллели	Основная группа		Контрольная группа		p	OR (95 % CI)
	Абс. ч.	%	Абс. ч.	%		
CC	62	57,9	93	45,2	0,033*	1,675 (1,053–2,688)
CA	35	32,7	88	42,7	0,089	0,652 (0,400–1,058)
AA	10	9,4	25	12,1	0,571	0,747 (0,360–1,615)
C	159	74,3	274	66,5	0,055	1,457 (1,000–2,106)
A	55	25,7	138	33,5	0,055	0,687 (0,475–1,000)
Доминантная модель наследования						
CC	62	57,9	93	45,1	0,031*	1
CA+AA	45	42,1	113	54,9		0,60 (0,37–0,96)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку IL10 является одним из основных противовоспалительных цитокинов, изменению продукции которого придается большое значение в патогенезе ЮИА и других аутоиммунных заболеваний, а вариации в его секреции обусловлены в первую очередь генетическими факторами, нами был осуществлен поиск возможных ассоциаций полиморфного локуса —592C>A гена *IL10* с развитием персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА. Отметим, что исследование данного полиморфного локуса у пациентов с ЮИА было предпринято в России впервые. В результате проведенного исследования выявлена ассоциация генотипа CC полиморфного локуса —592C>A гена *IL10* с развитием персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА ($p(F) = 0,033$; $OR = 1,675$, $95\% CI 1,053–2,688$). Однако при разделении пациентов по полу значимые различия между основной и контрольной группами были установлены только для девочек, при этом маркером повышенного риска развития персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА у девочек оказался не только генотип CC, но и аллель C ($OR = 1,840$, $95\% CI 1,049–3,307$ и $OR = 1,712$, $95\% CI 1,098–2,706$ соответственно).

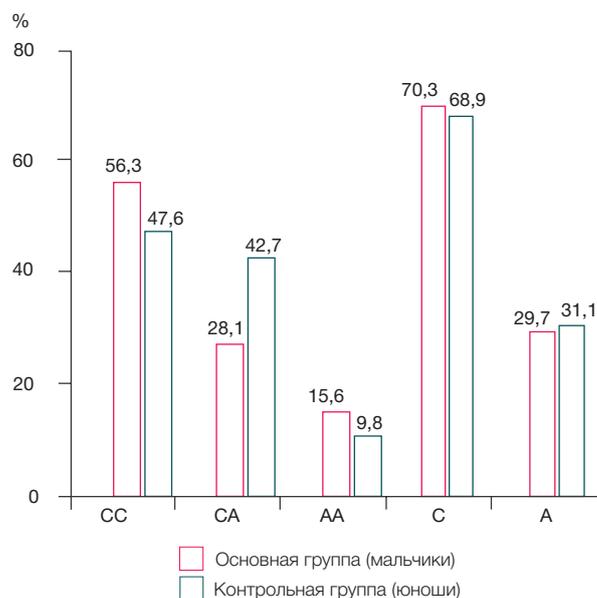
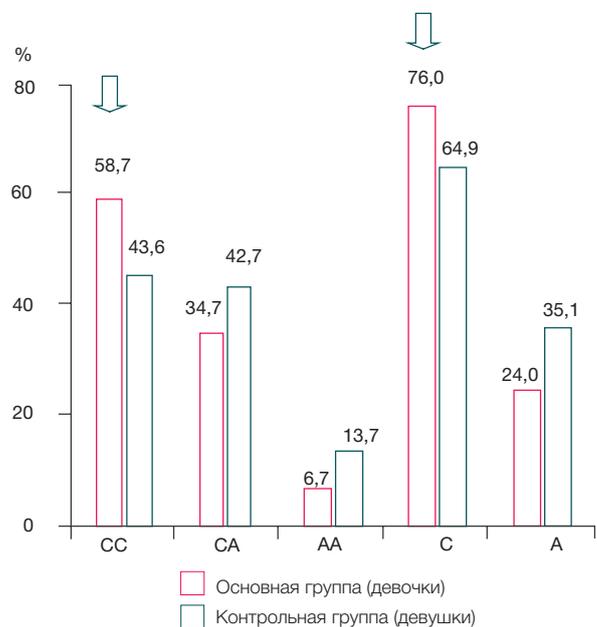
Метод логистической регрессии в обоих случаях указал на статистически достоверные различия между группами при использовании доминантной модели наследования (генотипы SA+AA против CC), где аллель A ассоциирован с пониженным риском развития персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА ($OR = 0,60$ и $OR = 0,54$ для общей группы больных и только для девочек соответственно).

Имеющиеся на сегодняшний день литературные данные о функциональном значении и наличии ассоциаций полиморфного локуса —592C>A гена *IL10* с развитием ЮИА и его вариантов неоднозначны и в основном приводятся для гаплотипов GCC, ACC и ATA полиморфных локусов —1082G>A, —819C>T и —592C>A промоторной области гена *IL10*. В частности, в работе ученых из Великобритании E. Crawley и соавт. было показано, что генотип ATA/ATA ассоциирован с более низкой по сравнению с остальными генотипами продукцией IL10 в культуре клеток цельной крови здоровых индивидов (англосаксонского происхождения) при стимуляции бактериальным липополисахаридом [14]. Кроме того, в моделях с применением временной трансфекции гаплотип ATA оказался связан с более слабой по сравнению с гаплотипом GCC транскрипционной активностью гена *IL10* [14]. Это отчасти может быть обусловлено присутствием аллеля A в позиции —1082, для которого ранее была установлена взаимосвязь со сниженной секрецией соответствующего белка в культуре лимфоцитов периферической крови здоровых индивидов при добавлении конканавалина A [15]. E. Crawley и соавт. было также показано, что при персистирующем олигоартикулярном варианте ЮИА генотипы, содержащие гаплотип ATA, встречались значительно реже, чем при распространенном олигоартикулярном варианте ЮИА, а генотип ATA/ATA — реже, чем при всех других вариантах ЮИА и у здоровых лиц, однако ввиду малочисленности групп индивидов с указанным генотипом статистический анализ не проводился [14]. Приведенные данные согласуются с результатами, полученными в нашей работе и свидетельствующими о том, что аллель A полиморфного локуса —592C>A гена *IL10* маркирует значимо более низкий риск развития персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА у девочек из Республики Башкортостан.

Кроме того, E. Crawley и соавт. было установлено, что у родителей пациентов с распространенным ЮИА генотипы, содержащие гаплотип ATA, встречались значительно чаще, чем у здоровых лиц, тогда как для родителей детей с персистирующим олигоартикулярным вариантом ЮИА статистически значимых различий выявлено не было [16]. В то же время при обследовании индивидов

Отмечалась также тенденция к повышению частоты аллеля C у больных, однако она не достигла уровня статистической значимости ($p(F) = 0,055$; $OR = 1,457$, $95\% CI 1,000–2,106$). Наиболее удачной моделью наследования оказалась доминантная (генотипы SA+AA против CC), согласно которой генотипы, содержащие аллель A, маркируют пониженный риск развития персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА ($p = 0,031$; $OR = 0,60$, $95\% CI 0,37–0,96$). При последующей стратификации по полу значимые различия были выявлены только для девочек. Так, генотип CC и аллель C встречались у девочек с персистирующим олигоартикулярным вариантом ЮИА значимо чаще, чем у девушек в контрольной группе ($p(F) = 0,042$; $OR = 1,840$, $95\% CI 1,049–3,307$ и $p(F) = 0,025$; $OR = 1,712$, $95\% CI 1,098–2,706$ соответственно) (рисунок).

При изучении моделей наследования наиболее удачной оказалась лог-аддитивная ($p = 0,023$, $OR = 0,60$, $95\% CI 0,38–0,94$), однако и для доминантной модели были получены статистически значимые результаты ($p = 0,038$; $OR = 0,54$, $95\% CI 0,30–0,97$). В группах мальчиков (основной и контрольной) различия в частотах генотипов и аллелей оказались статистически незначимыми ($p > 0,1$).



Частоты генотипов и аллелей полиморфного локуса—592C>A гена *IL10* в группах пациентов с персистирующим олигоартикулярным вариантом ЮИА и здоровых лиц из Республики Башкортостан с учетом гендерных различий

европейского происхождения канадскими учеными К. Оен и соавт. не было обнаружено взаимосвязи полиморфных локусов $-1082G>A$, $-819C>T$ и $-592C>A$ гена *IL10* и их гаплотипов с риском развития всех вариантов ЮИА, а также каких-либо различий в распределении генотипов между пациентами с персистирующим и распространенным олигоартикулярными вариантами ЮИА [17]. М. Fife и соавт. также не обнаружили ассоциации полиморфного локуса $-592C>A$ гена *IL10* с развитием системного ЮИА у пациентов из Великобритании [9]. Противоречивость приведенных данных может быть обусловлена различиями в этнической принадлежности обследованных лиц, а также недостаточным объемом соответствующих выборок и свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения роли полиморфного локуса $-592C>A$ гена *IL10* в развитии ЮИА и его вариантов.

Литература

1. Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*. 2007; 369 (9563): 767–78.
2. Petty RE, Laxer RM, Lindsley CB, Wedderburn L. Textbook of pediatric rheumatology. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016.
3. Moroldo MB, Chaudhari M, Shear E, Thompson SD, Glass DN, Giannini EH. Juvenile rheumatoid arthritis affected sibpairs: Extent of clinical phenotype concordance. *Arthritis Rheum*. 2004; 50 (6): 1928–34.
4. Hinks A, Cobb J, Marion MC, Prahalad S, Sudman M, Bowes J. et al. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies 14 new susceptibility loci for juvenile idiopathic arthritis. *Nat Genet*. 2013; 45 (6): 664–9.
5. Lin YT, Wang CT, Gershwin ME, Chiang BL. The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev*. 2011; 10 (8): 482–9.
6. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683–765.
7. Muller K, Herner EB, Stagg A, Bendtzen K, Woo P. Inflammatory cytokines and cytokine antagonists in whole blood cultures of patients with systemic juvenile chronic arthritis. *Br J Rheumatol*. 1998; 37 (5): 562–9.
8. Westendorp R. G., Langermans J. A., Huizinga T. W. et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet*. 1997; 349 (9046): 170–3.
9. Fife MS, Gutierrez A, Ogilvie EM, Stock CJ, Samuel JM, Thomson W, et al. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8 (5): R. 148.
10. Iyer SS., Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in

References

1. Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*. 2007; 369 (9563): 767–78.
2. Petty RE, Laxer RM, Lindsley CB, Wedderburn L. Textbook of pediatric rheumatology. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016.
3. Moroldo MB, Chaudhari M, Shear E, Thompson SD, Glass DN, Giannini EH. Juvenile rheumatoid arthritis affected sibpairs: Extent of clinical phenotype concordance. *Arthritis Rheum*. 2004; 50 (6): 1928–34.
4. Hinks A, Cobb J, Marion MC, Prahalad S, Sudman M, Bowes J. et al. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies 14 new susceptibility loci for juvenile idiopathic arthritis. *Nat Genet*. 2013; 45 (6): 664–9.
5. Lin YT, Wang CT, Gershwin ME, Chiang BL. The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev*. 2011; 10 (8): 482–9.
6. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683–765.
7. Muller K, Herner EB, Stagg A, Bendtzen K, Woo P. Inflammatory cytokines and cytokine antagonists in whole blood cultures of patients with systemic juvenile chronic arthritis. *Br J Rheumatol*. 1998; 37 (5): 562–9.
8. Westendorp R. G., Langermans J. A., Huizinga T. W. et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet*. 1997; 349 (9046): 170–3.
9. Fife MS, Gutierrez A, Ogilvie EM, Stock CJ, Samuel JM, Thomson W, et al. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8 (5): R. 148.
10. Iyer SS., Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in

ВЫВОДЫ

Результаты нашего исследования свидетельствуют о наличии ассоциации полиморфного локуса $-592C>A$ гена *IL10* с развитием персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА у детей из Республики Башкортостан. Показано, что генотип *CC* маркирует значимо повышенный риск развития персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА в целом, а с учетом гендерных особенностей — только у девочек. Кроме того, у девочек маркером повышенного риска персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА является также аллель *C*.

- inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012; 32 (1): 23–63.
11. Mathew CC. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. In: Walker JM, editor. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2. N.Y., L.: Human Press; 1984. P. 31–4.
 12. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Gilvarry E, Day CP. P. Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut*. 2000; 46 (4): 540–5.
 13. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesto R, Morena V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006; 22 (15): 1928–9.
 14. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999; 42 (6): 1101–8.
 15. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997; 24 (1): 1–8.
 16. Crawley E, Kon S, Woo P. Hereditary predisposition to low interleukin-10 production in children with extended oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001; 40 (5): 574–8.
 17. Oen K, Malleson PN, Cabral DA, Rosenberg AM, Petty RE, Nickerson P, et al. Cytokine genotypes correlate with pain and radiologically defined joint damage in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44 (9): 1115–21.

- inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012; 32 (1): 23–63.
11. Mathew CC. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. In: Walker JM, editor. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2. N.Y., L.: Human Press; 1984. P. 31–4.
 12. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Gilvarry E, Day CP. P. Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut*. 2000; 46 (4): 540–5.
 13. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesto R, Morena V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006; 22 (15): 1928–9.
 14. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999; 42 (6): 1101–8.
 15. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997; 24 (1): 1–8.
 16. Crawley E, Kon S, Woo P. Hereditary predisposition to low interleukin-10 production in children with extended oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001; 40 (5): 574–8.
 17. Oen K, Malleson PN, Cabral DA, Rosenberg AM, Petty RE, Nickerson P, et al. Cytokine genotypes correlate with pain and radiologically defined joint damage in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44 (9): 1115–21.