МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ – ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 β , РЕЦЕПТОРА АНТАГОНИСТА ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 И ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ БАШКИРСКОЙ ЭТНИЧЕСКОЙ ГРУППЫ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Бурмистрова А.Л.¹, Сташкевич Д.С.¹, Суслова Т.А.¹,
Девальд И.В.², Исаканова А.О.³, Димчева О.Н.¹

¹ Научно-учебный центр Молекулярной иммуногенетики ГОУ ВПО «Челябинский государственный университет»/ОГУП «Челябинская областная станция переливания крови»

² ГОУ ВПО «Челябинская медицинская академия» Росздрава

³ Городская клиническая больница № 6, г. Челябинск

Резюме. Исследованы полиморфизмы в генах интерлейкина-1 β , рецепторного антагониста интерлейкина-1 и интерлейкина-4 у больных ревматоидным артритом башкирской этнической группы, проживающих на территории Челябинской области. В ходе проведенной работы получено в группе больных повышение частоты генотипа, гомозиготного по высокопродуктивному аллелю гена интерлейкина-1 β , обнаружена ассоциация между генотипом, гомозиготным по аллелю с двукратным повтором гена интерлейкина-4 и возрастом начала атаки заболевания.

Ключевые слова: полиморфизм, гены цитокинов, ревматоидный артрит.

Burmistrova A.L., Stashkevich D.S., Susslova T.A., Devald I.V., Issakanova A.O., Dimcheva O.N.

MOLECULAR BIOLOGY ANALYSIS OF IL-1 β , IL-4, AND IL-1 β R GENE POLYMORPHISMS IN ETHNIC BASHKIR PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS, LIVING IN CHELYABINSK REGION

Abstract. Common polymorphisms of interleukin-1 β , receptor antagonist interleukin-1, and interleukin-4 genes have been studied among the patients with rheumatoid arthritis of Bashkir origin, living in Chelyabinsk Region. As a result of study, an increased frequency of interleukin-1 β homozygosity for a high-producer allele was found. An association has been revealed between the homozygosity for 2-repeat allele of interleukin-4, and the age of disease onset. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 6, pp 631-634)

Адрес для переписки:

454021, г. Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129,
биологический факультет.

Тел.: (351) 799-71-76.

Факс: (351) 742-09-25.

E-mail: stashkevich_dary@mail.ru

Введение

Ревматоидный артрит (РА) является системным воспалительным заболеванием, аутоиммун-

ной природы, для которого характерен выраженный эрозивно-деструктивный полиартрит. В настоящее время РА относят к мультифакторным комплексным заболеваниям, чувствительность к которым определяется генетической составляющей и условиями окружающей среды. Основным генетическим фактором риска для РА являются гены классического иммунного ответа II класса системы HLA [9, 11]. Ассоциация между генами комплекса HLA и развитием РА была показана еще в 1976 г. Stasny P. [9]. Однако генами HLA II класса обеспечивается лишь 30-50% общего семейного риска развития РА (по данным разных авторов). Скрининг генома показал наличие и других генов восприимчивости к РА, рассеянных по всему геному [9, 10]. Среди них большое внимание привлекают гены цитокинов и их рецепторов, продукты которых определяют поляризацию элементарных, локальных и системных цитокиновых полей. Данные о поляризации локальных цитокиновых полей (цитокиновый профиль синовиальной жидкости) чрезвычайно противоречивы, что возможно связано как с гетерогенностью заболевания, так и с полиморфизмом генов цитокинов [6, 10].

Тем не менее, большинство авторов считает, что гены цитокинов определяют не столько предрасположенность к РА, сколько клиническое течение заболевания: промоторные полиморфизмы в генах IL-1 β , IL-1Ra ассоциируются с более тяжелыми клиническими формами РА, а полиморфизм в экзоне IL-4 связан с выраженной деструкцией хряща [10]. Ранее группой авторов показано, что возраст начала заболевания, наличие системных проявлений и иммунологический вариант РА в башкирской популяции не зависят от генов HLA: локусов A, B, DRB1, DQA1, DQB1 [1]. Цель данной работы: оценить частоты встречаемости аллельных форм и генотипов генов цитокинов — IL-1 β , IL-1Ra, IL-4 у больных ревматоидным артритом башкирской этнической группы, проживающих на территории Челябинской области.

Материалы и методы

По данным сайта Всемирной Географии WGEO в Челябинской области по переписи 2002 года проживает 166 372 башкир, что составляет 4,62% от общей популяции (<http://www.wgeo.ru/>). В нашем исследовании было обследовано 60 пациентов с диагнозом РА башкирской этнической группы, проживающих в Челябинской области. Отбор пациентов проводили ассистенты кафедры госпитальной терапии Челябинской Государственной Медицинской Академии вне зависимости от стадии, клинического варианта течения заболевания и возраста начала РА. Средний возраст больных составил 46,5 лет, и сред-

ний возраст заболевания — 38,4 года. У 49 человек обнаружился ревматоидный фактор (РФ), а у 11 человек был серонегативный РА. У 59 больных было отмечено поражение суставов в форме полиартрита, и только у одного человека был олигоартрит [1]. Контрольную группу составляли кадровые доноры ОГУП «Челябинская областная станция переливания крови»: 89 человек. Этническая принадлежность больных РА и здоровых лиц определялась согласно рекомендациям Международного Уоркшоп (1980 г., Лос-Анджелес, США).

Характеристика исследуемых полиморфизмов. Гены IL-1 β и IL-1Ra расположены на второй хромосоме в районе 2q12 [4, 7]. Для исследования полиморфизма по одному нуклеотиду (SNP) в 5 экзоне гена IL-1 β (положение +3953) использовали разновидность ПЦР — ПДРФ — анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. В основе метода лежит ПЦР с последующей обработкой ампликонов ферментом рестрикции Taq I для IL-1 β (+3953).

При гидролизе амплификационного фрагмента гена IL-1 β эндонуклеазой рестрикции Taq I выявлялось три фрагмента размером 550 п.н., 146 п.н. и 404 п.н. Фрагмент 550 п.н. соответствует амплификационному фрагменту, не подвергнувшемуся гидролизу, что указывает на наличие аллеля IL-1 β (+3953) T, гомозиготное состояние обозначено m/m (сокращение от mutant — мутантный аллель). При наличии аллеля C происходит разрезание ампликона на два фрагмента 146 п.н. и 404 п.н., гомозиготность по этому аллелю обозначена w/w (сокращение от wild — аллель дикого типа), а гетерозиготное состояние C/T в данном исследовании обозначено как w/m [4]. Для определения полиморфизма типа варьирующего числа tandemных повторов (VNTR) в гене IL-1Ra использовали ПЦР с праймерами, фланкирующими полиморфный регион в пределах второго интрона, в котором находится VNTR участка длиной 86 п.н. В результате амплификации мы идентифицировали фрагменты ДНК размером 438, 524, 610, и 696 н.п., соответственно, с 2, 3, 4 и 5 копиями tandemных повторов [4]. Эти аллели были обозначены как 2R, 3R, 4R и 5R в данном исследовании.

Ген IL-4 расположен на длинном плече 5 хромосомы [6]. Для исследования VNTR IL-4 проводили ПЦР с праймерами, фланкирующими полиморфный регион в пределах 3-го интрона, в котором находится варьирующее количество tandemных повторов размером 70 н.п. В результате амплификации идентифицировали фрагменты ДНК размерами 255 и 325 н.п., соответственно, с 2 и 3 копиями tandemных повторов. Эти аллели были обозначены как 2R и 3R [4]. Наборы для типирования генов цитокинов любезно предоставлены группой фармакогеномики инсти-

тута Химической Биологии и Фундаментальной Медицины (ИХБФМ СО РАН). Детекция полученных ампликонов проводилась методом вертикального электрофореза в 8% полиакриламидном геле.

Статистическая обработка результатов. Параметрами для определения служили: частоты аллельных вариантов генов цитокинов и их генотипов.

Для оценки частот аллельных вариантов использовался критерий Пирсона, который рассчитывался по формуле [2]:

$$\chi^2 = \frac{N(ab - bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

При расчете достоверности распределения генотипов для каждого полиморфизма данные о частотах встречаемости генотипов сводили в таблицу сопряженности с двумя входами: генотип, состояние здоровья (больной РА, здоровый). Полученную таблицу обрабатывали в ходе иерархического логлинейного анализа, который позволяет рассчитать критерий максимального правдоподобия (G или χ^2_{ML}) и критерий Пирсона (χ^2) [12]. Поскольку в таблицах имелись частоты меньше 5, то ко всем ячейкам добавляли константу $\delta = 0,5$. В иерархическом логлинейном анализе мы использовали отклонения Фримана-Тьюки, которые позволяют определить, за счет каких ячеек комбинаций «генотип – состояние здоровья» образуется общий статистически значимый результат или тенденция к различиям [12]. Для оценки вероятности возникновения заболевания в зависимости от возраста у носителей различных генотипов использовали анализ отношения шансов (шанс – отношение вероятности того, что событие произойдет, к вероятности того, что событие не произойдет) [3]. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, незначимыми при $p > 0,10$; для промежуточных значений p ($0,05 \leq p \leq 0,10$) обсуждали тенденцию к различиям.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы была проведена оценка распределения частот аллелей и генотипов в группах здоровых лиц и больных РА башкирской этнической группы, проживающих в Челябинской области. Было установлено, что частоты аллельных вариантов исследуемых полиморфизмов оказались малоинформативны. Поэтому на следующем этапе мы изучали распределение частот генотипов в группах здоровых лиц и больных РА, для чего применяли иерархический логлинейный анализ. В ходе анализа было показано наличие статистически достоверного взаимодействия между SNP (+3953) IL-1 β и состоянием здоровья (больной РА – здоровый, общий $G = 9,16$, $p =$

$0,01$; $\chi^2 = 8,95$, $p = 0,01$ для 2 степеней свободы). При использовании отклонений Фримана-Тьюки обнаружено, что статистически значимый эффект достигался за счет изменений частот генотипов m/m (T/T) и w/m (C/T) в исследуемых выборках. В группе здоровых лиц снижена частота генотипа m/m (гомозиготного по высокопродуктивному аллелю T), а в группе больных РА частота этого генотипа была высокой (11,7% против 2,3%, $\chi^2 = 4,07$, $p \leq 0,04$ для одной степени свободы). Кроме того, выборка больных РА характеризовалась сниженной частотой гетерозиготного генотипа w/m (15% против 31,5% в выборке здоровых лиц, $\chi^2 = 6,12$, $p \leq 0,02$ для одной степени свободы).

Для частот генотипов гена IL-4 не получено статистически значимых отличий между выборками здоровых лиц и больных РА.

Группа больных РА башкирской этнической группы характеризовалась повышенной частотой аллельного варианта 2r VNTR полиморфизма в гене IL-1Ra, но результаты не достигали статистической значимости (в группе контроля гомозиготность по этому аллелю не обнаружена).

Литературные данные по оценке распределения аллельных форм и генотипов генов IL-1 β , IL-1Ra, IL-4 между выборками здоровых лиц и больных РА различных этнических групп противоречивы: в работе Cantagrel A. et al. [6], проведенной на больных РА европеоидного происхождения, обнаружено достоверное повышение частоты встречаемости аллеля с 2-кратным повтором гена IL-4 у больных РА, а по полиморфизмам генов IL-1 β , IL-1Ra не было различий. Высокопродуктивный аллельный вариант T SNP полиморфизма +3953 в гене IL-1 β связан с выраженным эрозивным артритом только в сочетании с наличием HLA-DR общего эпитопа [6].

Группой исследователей во главе с Carreira P.E. при обследовании испанской популяции показано повышение частоты аллельного варианта с 2-кратным повтором VNTR гена IL-1Ra в группе больных РА по сравнению с группой здоровых лиц, кроме того, гомозиготное состояние по аллелю 2r было ассоциировано с большим числом пораженных суставов в течение первого года заболевания [7].

На втором этапе работы мы провели анализ частот встречаемости генотипов генов IL-1 β , IL-1Ra, IL-4 и возможной ассоциации полиморфизмов IL-1 β , IL-1Ra, IL-4 с наличием системных проявлений, иммунологическим вариантом РА и возрастом начала РА. Считают, что аллельные варианты генов цитокинов во многом определяют выраженность локальной или системной воспалительной реакции и ее исход, включая тканевое повреждение и репарацию [8, 10]. Мы не обнаружили ассоциации между распределением генотипов и такими показателями, как: наличие или отсутствие рев-

матоидного фактора и количество пораженных суставов. Однако была обнаружена ассоциация между возрастом дебюта РА (до и после 40 лет) и частотой встречаемости полиморфизма типа VNTR в гене IL-4 (общий $G = 6,74$, $p = 0,03$; $\chi^2 = 6,99$, $p = 0,03$ для 2 степеней свободы). Продолжая изучение связи двух параметров «VNTR полиморфизм в гене IL-4 – возраст начала РА», используя отклонения Фримана-Тьюки, было установлено повышение частоты генотипа 2г/2г в группе больных с возрастом начала заболевания после 40 лет (35% против 7,7% в группе с ранним РА, $\chi^2 = 9,08$, $p < 0,005$). При использовании анализа отношения шансов установлено, что шанс возникновения РА после 40 лет для носителей генотипа 2г/2г IL-4 в 6,5 раз выше, чем для других генотипов (3г/2г, 3г/3г) IL-4 ($\theta = 6,46$, 95% ДИ = 1,204 – 42,94; $p = 0,026$).

Наши данные не противоречат данным литературы о наличии связи между 2R аллелем гена IL-4 и возрастом начала заболевания и (или) выраженностью клинических симптомов некоторых наследственно-обусловленных заболеваний: Vandenbroeck K. показал ассоциацию между частотой встречаемости 2R аллеля гена IL-4 и поздней атакой множественного склероза у больных рассеянным склерозом (РС), коренных жителей Сардинии [13], Buchs N. [5] продемонстрировал, что 2R аллель IL-4 может быть протективным фактором тяжести деструкции суставов при РА (пациенты с неструктивным артритом имели повышенную частоту встречаемости 2R аллеля).

Полученные в нашем исследовании результаты подтверждают участие полиморфизмов генов IL-1 β , IL-4 в развитии предрасположенности и вариабельности течения некоторых наследственно-обусловленных заболеваний, в том числе и РА.

Заключение

1) Показано, что у больных РА башкирской этнической группы повышена частота гомозиготного варианта по высокопродуктивному аллелю T и снижена частота гетерозиготного варианта гена IL-1 β (C/T) полиморфизма типа SNP в положении +3953.

2) Установлена ассоциация между частотой гомозигот 2г/2г гена IL-4 и возрастом начала заболевания: аллель 2г является маркером замедленного старта РА, а шанс возникновения РА после 40 лет у больных, носителей генотипа 2г/2г, возрастает в 6,5 раз.

Таким образом, полиморфизм SNP +3953 гена IL-1 β можно рассматривать как маркер предрасположенности к ревматоидному артриту, а гомозиготный генотип 2г/2г гена IL-4 может являться маркером позднего (после 40 лет) начала заболевания у башкир.

Список литературы

1. Бурмистрова А.Л., Девальд И.В., Черешнев В.А., Суслова Т.А., Празднов А.С. Иммуногенетический анализ башкирской этнической группы Южно-уральского региона и ассоциация генов HLA I и II классов с ревматоидным артритом у башкир // Иммунология. – 2005. – № 2. – С. 68-71.
2. Зарецкая Ю.М. Клиническая иммуногенетика. – М.: Медицина, 1983. – 208 с.
3. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных: Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
4. Шабалдин А.В., Филипенко М.Л., Воронина Е.Н., Глушков А.Н., Симонова Т.А. Полиморфизм генов антагониста рецептора интерлейкина-1 и интерлейкина-4 при репродуктивных нарушениях // Иммунология. – 2005. – № 1. – С. 6-9.
5. Buchs N., Silvestri T., di Giovine F.S., Chabaud M., Vannier E., Duff G. W., Miossec P. IL-4 VNTR gene polymorphism in chronic polyarthritis. The rare allele is associated with protection: against destruction // Rheumatology. – 2000. – Vol. 39. – P. 1126-1131.
6. Cantagrel A., Navaux F. Interleukin-1 β , Interleukin-1 receptor Antagonist, Interleukin-4, and Interleukin-10 gene polymorphisms relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. – 1999. – Vol. 42. – P. 1093-1100.
7. Carreira P.E., Gonzalez-Crespo M.R., Ciruelo E., Pablos J.L., Santiago B., Gomez-Camara A., Gomez-Reino J.J. Polymorphism of the Interleukin-1 Receptor antagonist gene a factor in susceptibility to rheumatoid arthritis in a Spanish population // Arthritis Rheum. – 2005. – Vol. 52. – P. 3015-3019.
8. Choy Ernest H.S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis // N. Engl. Med. – 2001. – Vol. 344, № 12. – P. 907-916.
9. Dieude P., Cornelis F. Genetic basis of rheumatoid arthritis // Jt. Bone Spine. – 2005. – Vol. 9. – P. 3-7.
10. Harney S., Wordsworth B.P. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis // Tis. Antigens. – 2002. – Vol. 60. – P. 465-473.
11. Lee D.M., Weinblatt M.E. Rheumatoid arthritis // Lancet. – 2001. – Vol. 358. – P. 903-911.
12. Sokal R.R., Rolf F. The principles and practice of statistics in biological research // J. Biometry. – N.Y.: Freeman & Co, 1995. – 850 p.
13. Vandenbroeck K., Martino G., Marrosu M., Consiglio A., Zaffaroni M., Vaccargiu S., Franciotta D., Ruggeri M., Comi G., Grimaldi L.M. Occurrence and clinical relevance of an IL-4 gene polymorphism in patients with multiple sclerosis // J. Neuroimmunol. – 1997. – Vol. 76. – P. 189-192.

поступила в редакцию 24.04.2007

принята к печати 30.05.2007