

# ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ CTLA-4 И PTPN-22 НА РИСК РАЗВИТИЯ АУТОИММУННОГО ТИРЕОИДИТА СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

Биктагирова Э.М.<sup>1</sup>, Кравцова О.А.<sup>1</sup>, Саттарова Л.И.<sup>2</sup>,  
Вагапова Г.Р.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина,  
биолого-почвенный факультет, кафедра биохимии, г. Казань

<sup>2</sup>Межрегиональный клинико-диагностический центр (МКДЦ), иммунологическая лаборатория, г. Казань

**Резюме.** Проблема аутоиммунного тиреоидита (АИТ) до настоящего времени остается актуальной, так как вопросы этиологии, патогенеза, морфологии, классификации, диагностики, терапии и прогноза заболевания не получили еще своего окончательного решения. Так как в основе патогенеза любого аутоиммунного заболевания лежат нарушения тонких молекулярных механизмов регуляции иммунной системой, гены, кодирующие основные ее компоненты, рассматриваются как потенциальные гены-кандидаты предрасположенности к АИТ. К таким генам относятся гены поверхностного антигена цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4) и протеинтирозинфосфатазы 22 (PTPN-22). Нами проведено генотипирование у 298 женщин Республики Татарстан с учетом возраста и биохимических показателей (группа контроля составила 137 человек, больных АИТ — 161) по полиморфизмам +49 A/G, -318 C/T, -1661 A/G гена CTLA-4 и по полиморфному варианту 1858 C/T гена PTPN-22. Генотипирование проводили с помощью полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом. Полученные данные анализировали с помощью  $\chi^2$  с использованием 95% доверительных интервалов. Результаты исследования показали повышенную частоту встречаемости полиморфного аллеля G как по локусу +49 A/G, так и по полиморфизму -1661 A/G гена CTLA-4 в группе больных АИТ ( $P = 0,04$ , ОШ 1,84, 95% ДИ 2,31-1,4;  $P = 0,001$ , ОШ 2,095% ДИ 1,62-2,31, соответственно) с повышенным содержанием антител к тиреоглобулину (ОШ 1,56, 95% ДИ 2,25-3,6; ОШ 1,12, 95% ДИ 1,9-2,75 соответственно) и к тиреопероксидазе (ОШ 1,3, 95% ДИ 1,5-4,1 для генотипа G/G полиморфизма +49 A/G) в сыворотке вне зависимости от возраста ( $p < 0,05$ ). Сочетание генотипов: A/G, C/T и G/G полиморфизмов -1661 A/G, -318 C/T и +49 A/G гена CTLA-4 ассоциировано с повышенным риском предрасположенности к АИТ (ОШ = 7,87, 95% ДИ 2,03-3,25). Полиморфные локусы -318 C/T и 1858 C/T генов CTLA-4 и PTPN-22 (соответственно) не ассоциированы с развитием данной патологии среди женщин РТ. Наши результаты предполагают, что полиморфизм генов CTLA-4 и PTPN-22 может модифицировать индивидуальную восприимчивость к аутоиммунному тиреоидиту.

**Ключевые слова:** аутоиммунный тиреоидит, протеинтирозинфосфатаза, ген антигена цитотоксических Т-лимфоцитов.

*Biktagirova E.M., Kravtsova O.A., Sattarova L.I., Vagapova G.R.*

**ASSOCIATION OF CTLA-4 AND PTPN-22 GENES POLYMORPHISMS WITH INCREASED RISK OF AUTOIMMUNE THYROIDITIS IN TATAR POPULATION**

**Abstract.** The aspects of autoimmune thyroiditis (AIT) remain quite actual, since many issues of etiology, pathogenesis, morphology, classification, diagnostics, therapy and prediction of this disorder are far from final solution. Since disturbances of fine molecular immune mechanisms underlie pathogenesis of either immune disorder, the genes coding its main components, are regarded as potential candidate genes predisposing for AIT, e.g., genes of surface antigen (CTLA-4) and protein tyrosine phosphatase non-receptor 22

**Адрес для переписки:**

420133, Республика Татарстан, г. Казань,  
ул. ак. Лаврентьева, 20-120.  
Тел.: (917) 277-45-55.  
E-mail: elnara-bik@mail.ru

(PTPN-22). We have performed genotyping of 298 Tatar women in Tatar Republic (Russia) with respect to age and biochemical parameters (control group, 137 persons; AIT group, 161 patients). The following gene polymorphisms were tested: +49 A/G, -318 C/T, -1661 A/G of CTLA-4 gene, and 1858 C/T polymorphism of PTPN-22 gene. Genotyping was performed by PCR-RFLP method as described earlier. The data were analyzed using Chi-square test and 95% confidential interval (CI). The frequencies of CTLA-4 -1661 G allele and genotype A/G and +49 G/A G allele and genotype GG carriers were significantly higher in AIT patients than in controls ( $P = 0.04$ , OR 1.84, 95% CI 2.31-1.4;  $P = 0.001$ , OR 2,0 95% CI 1.62-2.31 respectively), with increased contents of serum antibodies to thyroglobulin (OR, 1.56, 95% CI 2.25-3.6; OR 1.12, 95% CI 1.9-2.75, respectively) and to thyroperoxidase (OR 1.3, 95% CI 1.5-4.1 for G/G genotype of +49 A/G polymorphism), independently of age ( $p < 0,05$ ).

We showed that the combinations of A/G, T/C and G/G genotypes of -1661 A/G, -318 T/C and +49 G/A polymorphisms is associated with increased risk of genetic predisposition to ITD in Tatar women (OR 7.87, 95% CI 2.03-3.25). A strong association was also observed between the increased level of antibodies to TPO ( $> 1000$  ME/l) and GG genotype of +49 G/A polymorphism (OR 1.3, 95% CI 1.5-4.1) and antibodies to TG ( $> 100$  ME/l) and genotypes A/G and G/G of CTLA-4 -1661 A/G and +49 G/A polymorphisms (OR 1.56, 95% CI 2.25-3.6; OR 1.12, 95% CI 1.9-2.75, respectively), independently of age. The genotypes -318 T/C and 1858 T/C of CTLA-4 and PTPN-22 genes, respectively, are not associated with AITD in Tatar women ( $p > 0.05$ ). Our results suggest that polymorphisms of CTLA-4 and PTPN-22 genes may modify individual susceptibility to autoimmune thyroiditis in Tatar women. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 1-2, pp 103-114)

**Keywords:** autoimmune thyroiditis, protein tyrosine phosphatase, CTLA gene.

## Введение

Проблема аутоиммунного тиреоидита (АИТ) до настоящего времени остается актуальной, так как вопросы этиологии, патогенеза, морфологии, классификации, диагностики, терапии и прогноза заболевания не получили еще своего окончательного решения. АИТ считается одним из наиболее распространенных заболеваний щитовидной железы (ЩЖ) после йоддефицитных состояний. Его частота среди взрослого населения колеблется от 6 до 11%. Он занимает значительное место в структуре диффузного нетоксического зоба и является наиболее частой причиной развития первичного гипотиреоза. В Республике Татарстан (РТ) около 60% лиц с эндокринной патологией страдают заболеваниями ЩЖ различной природы, из них около 30% женщин после 40 лет и 4,2% детей [1].

Генеалогические и близнецовые исследования показали, что АИТ относится к категории мультифакторных патологий с наследственной предрасположенностью. В последнее время во многих популяциях мира ведутся активные поиски по выявлению ассоциации генов-кандидатов с риском развития аутоиммунных заболеваний ЩЖ. Фенотипическое проявление генетического полиморфизма в значительной мере зависит от генофонда и условий жизни каждой конкретной популяции. Этим и объясняется противоречивость данных по ассоциации полиморфных локусов генов-кандидатов с риском развития АИТ [11].

Так как в основе патогенеза любого аутоиммунного заболевания лежат нарушения тонких молекулярных механизмов регуляции иммунной системой, гены, кодирующие

основные ее компоненты, рассматриваются как потенциальные гены-кандидаты предрасположенности к АИТ. К таким генам относятся, в частности, гены поверхностного антигена цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4) и протеинтирозинфосфатазы 22 (PTPN-22), кодирующие белок-рецептор CTLA-4 и цитоплазматическую лимфоидспецифичную тирозин фосфатазу (LYP) соответственно, основной функцией которых является ингибирование активации Т-лимфоцитов [2, 13].

По данным ряда авторов, полиморфные варианты генов CTLA-4 и PTPN-22 являются маркерами генетической предрасположенности к АИТ у населения европейских стран [6, 7, 9], Туниса, Японии [19]. Для населения Российской Федерации (РФ) генетические маркеры установлены у московской популяции [8]. В РТ подобные исследования ранее не проводились, поэтому целью данного исследования является анализ ассоциации полиморфизмов +49 A/G, -318 C/T, -1661 A/G гена CTLA-4 и полиморфного варианта 1858 C/T гена PTPN-22 с риском развития АИТ у населения РТ.

## Материалы и методы

### Объекты исследования

Генотипирование по полиморфным локусам было проведено у 298 женщин. Группа больных АИТ, включающая 161 пациента, и группа контроля, состоящая из 137 человек, были сформированы на базе иммунологической лаборатории Межрегионального клинко-диагностического центра (ГУ МКДЦ) (г. Казань). Диагноз АИТ устанавливался на основании результатов ультразвукового исследования (УЗИ) ЩЖ в режиме

серой шкалы и цветового доплеровского картирования (ЦДК), данных прицельной тонкоигольной аспирационной биопсии под контролем УЗИ, определения уровней антител (АТ) к тиреопероксидазе (ТПО) и АТ к тиреоглобулину (ТГ), оценки функционального состояния ЩЖ, по содержанию тиреотропного гормона (ТТГ), свободного тироксина (св. Т4) и свободного трийодтиронина (св. Т3) в сыворотке крови, которые определялись иммунохемилюминисцентным методом наборами «Immulite» на автоматическом анализаторе «Immulite» («Diagnostic Products Corporation», Лос-Анджелес, США). Степень активности аутоиммунного процесса оценивалась по концентрации АТ к ТПО в сыворотке крови.

### Выделение ДНК и генотипирование

Геномную ДНК из лейкоцитов венозной крови выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с некоторыми модификациями [14].

Генотипирование полиморфных локусов проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом (табл. 1).

ПЦР проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 20 мМ Трис HCl (pH = 8,8); 50 мМ KCl; 0,01% Твин 20; 2 мМ MgCl<sub>2</sub>; 1 ед. термостабильной Taq-полимеразы; 0,2 мМ dNTP каждого (ООО «СибЭнзим», Москва); 0,5 мкМ каждого из праймеров (НПФ «Литех», Москва), 100–200 нг анализируемой ДНК на амплификаторе «Терцик» (НПФ «ДНК-технология», Москва).

Полиморфизм исследуемых локусов генов CTLA-4 и RPTN-22 выявляли по наличию/отсутствию сайтов рестрикции. В работе использованы рестриктазы производства ООО «СибЭнзим» (Москва) согласно инструкции производителя.

Продукты ПЦР и рестрикции анализировали электрофорезом в 6 и 8% нативном полиакриламидном геле (ПААГ) (соответственно).

### Статистическая обработка данных

Для выявления принадлежности изучаемых признаков к нормальному распределению проводили сравнение выборочных средних и меди-

ан с критическими значениями для нормального распределения ( $p = 0,05$ ). Для описания полученных данных использовали построение доверительных интервалов для истинных долей на основании биномиального распределения. Верхние и нижние границы интервалов находили, используя график 95% доверительных интервалов (95% ДИ) для долей. Описанные доверительные интервалы использовали в качестве критериев значимости для сравнения частот аллелей и генотипов ( $p < 0,05$ ). Также для сравнения использовали критерий согласия ( $\chi^2$ ). В случае таблиц сопряженности 2x2 применяли  $\chi^2$  с поправкой Йейца. В случае отсутствия статистически значимых различий в группах определяли чувствительность используемого критерия с помощью параметра нецентральности. Оценку ассоциации полиморфизмов генов проводили с помощью расчета относительного риска (ОШ) [3].

### Результаты

Частоты встречаемости аллелей и генотипов по полиморфным локусам -1661 A/G, -318 C/T, +49 A/G гена CTLA-4 и полиморфизма 1858 C/T гена RPTN-22 в группе больных АИТ и здоровых лиц представлена в таблице 2. Все изученные полиморфизмы находятся в соответствии с равновесием Харди–Вайнберга ( $p > 0,05$ ).

Проведенный анализ распределения частот аллелей и генотипов по полиморфным вариантам гена CTLA-4 показал статистически значимое увеличение доли гомозиготного генотипа GG и аллеля G по полиморфному локусу +49 A/G в группе больных АИТ, а также гетерозиготного генотипа A/G и аллеля G полиморфизма -1661 A/G (ОШ = 1,84 ДИ 2,31–1,4 и 1,52 ДИ 2,0–1,1 (соответственно)). Для полиморфного варианта -318 C/T гена CTLA-4 и полиморфного локуса 1858 C/T гена RPTN-22 не было показано достоверных различий в распределении частот аллелей и генотипов между группой больных и контроля ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, гомозиготный генотип G/G по полиморфному локусу +49 A/G

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРАЙМЕРОВ, РЕСТРИКТАЗЫ И ДЛИНЫ ОБРАЗУЮЩИХСЯ ФРАГМЕНТОВ

Полиморфизм	Последовательность праймера	Рестриктаза	Длина фрагментов
-1661 A/G гена CTLA-4	N – 5'-TCAAGAGCATCCGCTTGACCT-3' P – 5'-TTGGTGTGATGCACAGAAGCCTTT-3'	Mse I	A: 347+139 G: 486
-318 C/T гена CTLA-4	N – 5'-AAATGAATTGGACTGGATGGT-3' P – 5'-TTACGAGAAAGGAAGCCGTG-3'	Mse I	T: 130+96+21 C: 226+21
+49 A/G гена CTLA-4	N – 5'-AGTCTCACTCACCTTTGCAG-3' P – 5'-GTCCTACCTCTTGAAGACCT-3'	Bbv I	G: 255+56 A: 311
1858 C/T гена RPTN-22	N – 5'-TCACCAgCTTCCTCAACCACA-3' P – 5'-ATAATgTTgCTTCAACggaATT-3'	Xcm I	C: 220 T: 180+40

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПО ПОЛИМОРФИЗМАМ -1661 A/G, -318 C/T И +49 A/G ГЕНА CTLA-4 И ПО ПОЛИМОРФНОМУ ЛОКУСУ 1858 C/T ГЕНА RTPN-22

Аллель/ генотип	Частота встречаемости, доли		p	ОШ (95% ДИ)
	АИТ «+»	АИТ «-»		
-1661 A/G гена CTLA-4				
A	0,732	0,806	0,81	— 1,52 (2,0-1,12)
G	0,267	0,193	0,04	
AA	0,472	0,615	0,78	— 1,83 (2,31-1,4)
AG	0,519	0,371	0,04	
GG	0,007	0,012	0,83	
-318 C/T гена CTLA-4				
C	0,867	0,898	0,61	—
T	0,133	0,102	0,86	—
CC	0,742	0,803	1	—
CT	0,250	0,191	0,87	—
TT	0,008	0,006	0,89	—
+49 A/G гена CTLA-4				
A	0,489	0,652	0,76	— 2,0 (2,31-1,62)
G	0,511	0,348	0,012	
AA	0,214	0,373	0,89	—
AG	0,550	0,557	1	—
GG	0,237	0,070	0,001	4,04 (4,77-3,31)
1858 C/T гена PTPN-22				
C	0,87	0,88	1	—
T	0,12	0,11	1	—
CC	0,78	0,77	1	—
CT	0,17	0,21	0,89	—
TT	0,036	0,0062	0,55	—

и гетерозиготный генотип A/G полиморфизма -1661 A/G гена CTLA-4 являются маркерами генетической предрасположенности к АИТ у населения РТ.

Кроме анализа ассоциации отдельных полиморфных локусов с риском развития АИТ у населения РТ нами проведен сравнительный анализ распределения частот сочетаний генотипов по трем полиморфным локусам гена CTLA-4. Из возможных 27 сочетаний для популяции РТ было выявлено 13: в группе больных АИТ – 11, в группе здоровых – 12 (табл. 3).

При этом самый высокий риск наблюдается при одновременном присутствии гетерозиготных генотипов по промоторной области и гомозиготного по полиморфному аллелю G экзонной части гена (ОШ = 7,87 ДИ 2,03-3,25), а сочетание генотипов по нормальным аллелям гена обладает протективным действием (ОШ = 0,25 ДИ 1,21-1,89).

Особенностью АИТ является наличие нескольких клинических форм, характеризующихся либо с избыточной (гипертиреоз), либо с недостаточной (гипотиреоз), либо с нормальной (эутиреоз) выработкой тиреоидных гормо-

нов [5]. Анализ распределения частот аллелей и генотипов в группах по форме протекания АИТ по исследуемым полиморфным маркерам генов CTLA-4 и RTPN-22 представлен в таблице 4.

По полиморфному варианту -1661 A/G гена CTLA-4 показано отсутствие достоверных различий между тремя исследованными группами. Однако гомозиготный генотип GG встречается только у больных гипотиреозом. Распределение частот аллелей и генотипов по другому полиморфизму промоторной области -318 C/T гена CTLA-4 среди больных АИТ по клинической форме заболевания показывает достоверное увеличение аллеля Т у больных гипертиреозом на фоне его уменьшения у двух других групп. Анализ распределения частот аллелей и генотипов по полиморфному локусу +49 A/G гена CTLA-4 показал отсутствие каких-либо достоверных различий. По полиморфному локусу 1858 C/T гена RTPN-22 также не показано статистически значимых различий по распределению частот аллелей и генотипов у больных по различным клиническим формам заболевания.

ТАБЛИЦА 3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ СОЧЕТАНИЙ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ -1661 А/Г, -318 С/Т И +49 А/Г ГЕНА CTLA-4 СРЕДИ БОЛЬНЫХ АИТ И ЛИЦ ГРУППЫ КОНТРОЛЯ

Сочетание генотипов	Частота встречаемости, доли		ОШ (95% ДИ)	р
	АИТ «+»	АИТ «-»		
aa cc aa	0,0763	0,2500	0,2 (1,21-1,89)	0,001
aa cc ag	0,2288	0,2697	—	0,9
aa cc gg	0,1186	0,0526	—	0,59
aa ct ag	0,0508	0,0395	—	0,88
ag cc aa	0,0508	0,0592	—	1
ag cc ag	0,1949	0,1776	—	1
ag cc gg	0,0339	0,0132	—	0,61
ag ct aa	0,0508	0,0526	—	—
ag ct ag	0,1186	0,0592	—	0,59
ag ct gg	0,0678	0,0066	7,87	0,001
gg ct aa	0,0085	—	—	—
gg ct ag	—	0,0132	—	—
gg tt aa	—	0,0066	—	—

ТАБЛИЦА 4. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ -1661 А/Г, -318 С/Т И +49 А/Г ГЕНА CTLA-4 И ПОЛИМОРФНОГО ЛОКУСА 1858 С/Т ГЕНА PTPN-22 СРЕДИ БОЛЬНЫХ АИТ ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ФОРМЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Аллель Генотип	Частота встречаемости, доли			p
	Гипотиреоз (n = 74)	Гипертиреоз (n = 5)	Эутиреоз (n = 82)	
-1661 A/G гена CTLA-4				
A	0,73	0,6	0,71	1
G	0,27	0,25	0,28	0,89
AA	0,48	0,5	0,44	1
AG	0,5	0,5	0,56	1
GG	0,02	—	—	—
-318 C/T гена CTLA-4				
C	0,89	0,5	0,83	0,87
T	0,10	0,5	0,17	0,049
CC	0,82	0,25	0,70	0,78
CT	0,16	0,5	0,29	0,85
TT	0,02	0,25	0,02	0,58
+49 A/G гена CTLA-4				
A	0,55	0,53	0,46	1
G	1,78	1,86	2,15	1
AA	0,56	0,83	0,25	0,67
AG	0,92	0,99	1,71	0,77
GG	3,84	6,32	3,27	0,79
1858 C/T гена PTPN-22				
C	0,89	0,75	0,83	0,89
T	0,11	0,25	0,16	0,78
CC	0,81	0,66	0,75	0,77
CT	0,17	0,17	0,16	1
TT	0,02	0,17	0,081	0,67

В риске возникновения АИТ определенное значение придается возрасту и полу пациента. Заболевание чаще всего развивается у женщин, соотношение их к мужчинам составляет примерно 10:1-17:1. Причем частота развития заболевания увеличивается с возрастом [16]. Анализ распределения частот аллелей и генотипов в возрастных группах (до 35, 35-50, старше 50) показал отсутствие различий в распределении частот генотипов по всем полиморфным локусам изученных генов. Это означает, что носительство данных полиморфизмов по гену CTLA-4 ассоциировано с риском развития АИТ у женщин в любом возрасте, а по полиморфному локусу 1858 С/Т гена RTPN-22 не ассоциировано (рис. 1).

Важную роль в диагностике АИТ играют антитела (АТ) к различным компонентам ЩЖ, в частности к тиреоглобулину (ТГ) и тиреопероксидазе (ТПО) [2]. Анализ распределения частот аллелей и генотипов в группах больных АИТ с нормальным и повышенным уровнями АТ к ТПО показал достоверное увеличение доли генотипа GG полиморфного локуса +49 А/Г у больных с содержанием АТ к ТПО более 30 МЕ/л (ОШ = 1,12 95% ДИ 1,9-2,75). По полиморфному варианту -1661 А/Г гена CTLA-4 наблюдается наличие гомозиготного генотипа по полиморфному аллелю G у больных с содержанием АТ более 1000 МЕ/л (ОШ = 1,09 95% ДИ 1,01-1,55). Тогда как по полиморфным вариантам -318 С/Т гена CTLA-4 и 1858 С/Т гена RTPN-22 показано отсутствие достоверных различий в распределении частот генотипов в зависимости от уровня АТ к ТПО (рис. 2).

Другим диагностическим маркером АИТ является наличие высокого титра сывороточных АТ к тиреоглобулину (ТГ) [2]. В группе больных с содержанием АТ к ТГ более 100 МЕ/л наблюдается достоверное увеличение частоты генотипа А/Г и генотипа G/G у полиморфных маркеров -1661 А/Г и +49 А/Г (соответственно) (ОШ 1,56, 95% ДИ 2,25-3,6; ОШ 1,12; 95% ДИ 1,9-2,75 соответственно). Отмечено также, что генотип GG по полиморфизму -1661 А/Г наблюдается только у больных с титром АТ более 1000 МЕ/л. По полиморфному варианту 1858 С/Т гена RTPN-22 показано отсутствие его ассоциации с повышенным уровнем АТ к ТГ (рис. 3).

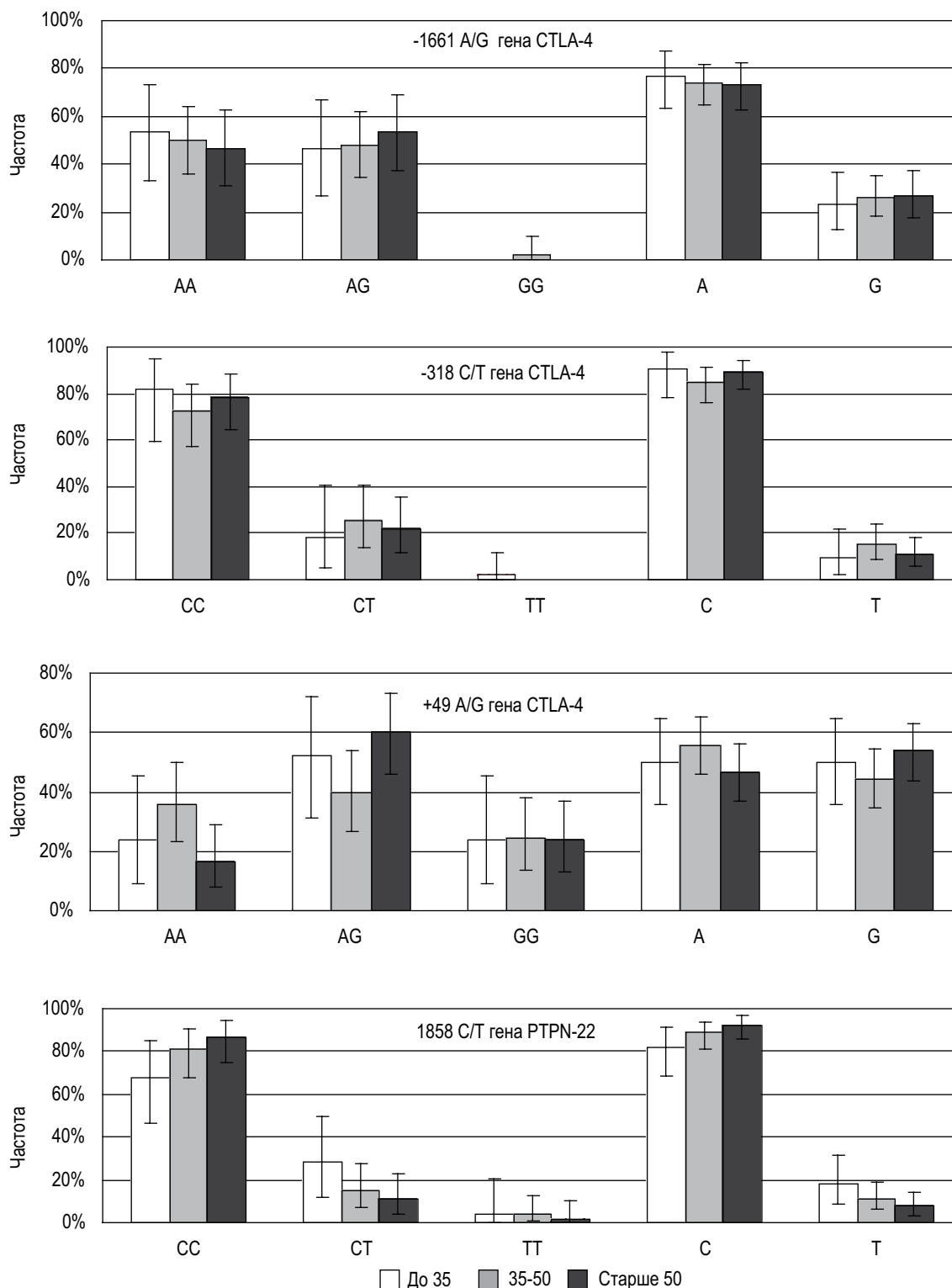
## Обсуждение

АИТ относится к категории мультифакторных патологий с неменделевским типом наследования. Фенотипическое проявление генетического полиморфизма в значительной мере зависит от генофонда и условий жизни каждой конкретной популяции. Этим и объясняется противоречивость данных по ассоциации полиморфных

локусов (генов-кандидатов) с риском развития АИТ [11]. В данной работе исследован вклад полиморфных маркеров -1661 А/Г, -318 С/Т и +49 А/Г гена поверхностного антигена цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), а также маркера 1858 С/Т гена протеинтирозинфосфатазы 22. Выбор генов обусловлен участием их белковых продуктов – рецептора CTLA-4 и белка RTPN-22 в патогенезе АИТ [19].

Изученные нами полиморфные локусы -1661 А/Г и -318 С/Т лежат в промоторной области гена CTLA-4 и, по данным многих авторов, влияют на экспрессию гена. Поскольку промоторные регионы являются сайтами связывания транскрипционных факторов, регуляция экспрессии гена находится под их контролем. По результатам исследований в популяциях Ирана, Туниса, Германии, Канады, Норвегии, Японии и др. найдена ассоциация данных полиморфных вариантов гена с риском развития аутоиммунных заболеваний, увеличение доли аллеля Т и G по полиморфным локусам -318 С/Т и -1661 А/Г (соответственно) приводит к АИТ, болезни Грейвса, сахарному диабету типа 1 (СД1), системной красной волчанке [18]. Вероятно, в основе полученной нами ассоциации полиморфизма -1661 А/Г лежит увеличение концентрации растворимой формы рецептора CTLA-4, так как однонуклеотидные замены (SNP) промоторных участков гена приводит к повышению экспрессии гена, тем самым увеличивается и количество синтезируемого продукта.

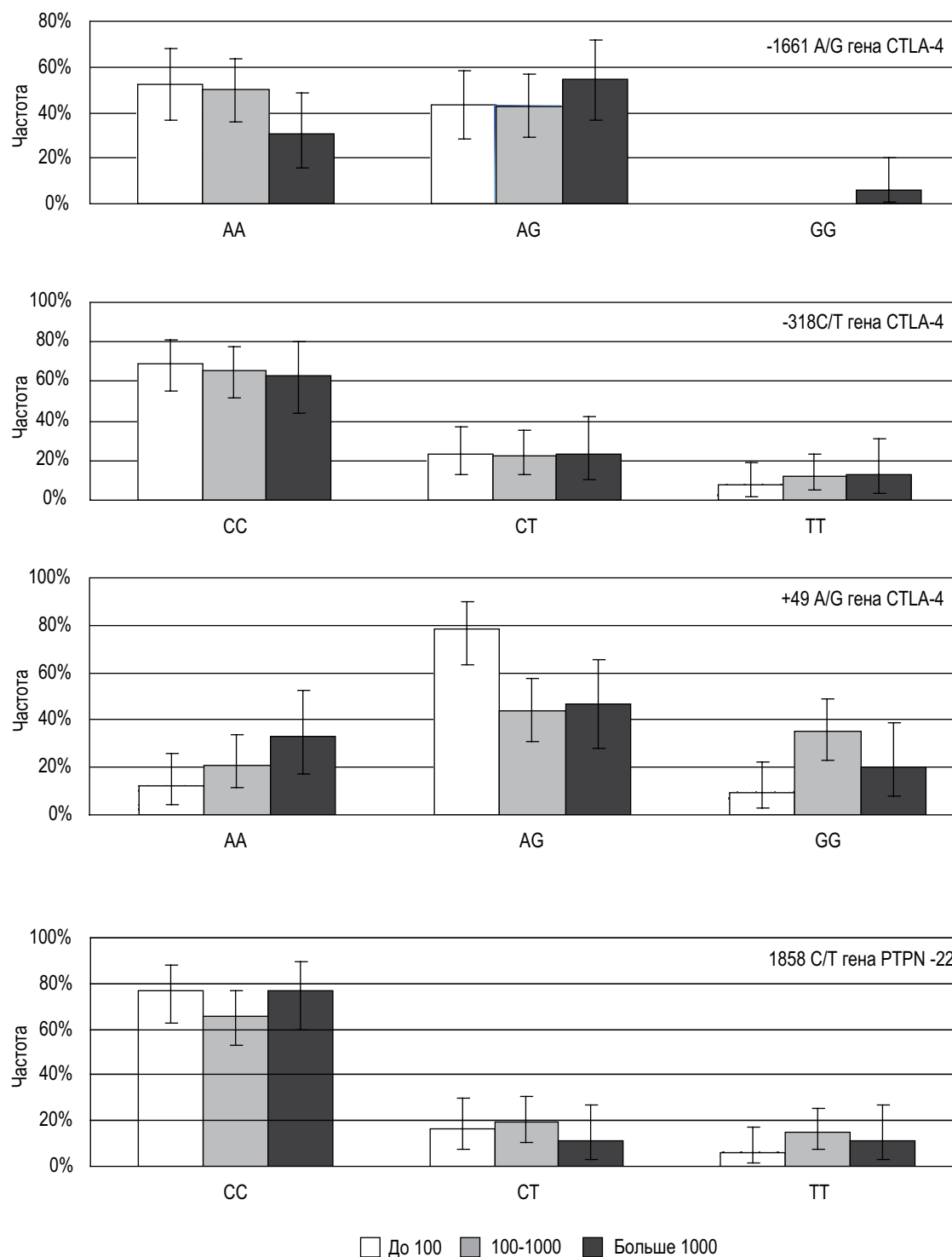
Полиморфизм кодирующей области гена +49 А/Г рассматривается в качестве маркера риска предрасположенности не только к различным аутоиммунным заболеваниям (сахарный диабет, АИТ, болезнь Грейвса, ревматоидный артрит и др.), но и к развитию злокачественных новообразований. Kotsa с соавторами изучали функциональную роль данного полиморфизма и показали увеличение пролиферации Т-клеток у носителей генотипа GG (Ala/Ala) по сравнению с носителями гомозиготного генотипа по нормальному аллелю AA (Thr/Thr) [12]. Во многих популяциях мира отмечается высокая частота встречаемости полиморфного аллеля G у больных указанных выше заболеваниями. К примеру, ассоциация аллеля G (Thr) с предрасположенностью к СД 1 типа была выявлена у испанцев, французов, мексиканцев, американцев, китайцев и корейцев [10]. Однако первым, кто выявил генетическую предрасположенность к аутоиммунным заболеваниям (АИТ, болезнь Аддисона, болезнь Грейвса) у носителей мутантного аллеля в кавказских популяциях, были Yanagawa с соавт. [18]. Исследования, проведенные у японских [19], немецких [9] и русских (Москва) [8] популяций,



**Рисунок 1. Распределение частот аллелей по полиморфизмам -1661 A/G, -318 C/T, +49 A/G гена CTLA-4 и по полиморфному варианту 1858 C/T гена PTPN-22 среди больных АИТ по возрасту**

также подтвердили наличие указанной ассоциации. Среди всех вариантов SNP гена CTLA-4 полиморфизм +49 A/G наиболее изучен, поскольку он затрагивает функцию самого белка-рецептора Т-лимфоцитов. Данная мутация заключается

в замене аденина на гуанин в позиции +49 экзона 1, что приводит к замене треонина на аланин в 17 кодоне аминокислотной последовательности белка. Полиморфизм ассоциирован с неполным гликозилированием сигнального пептида



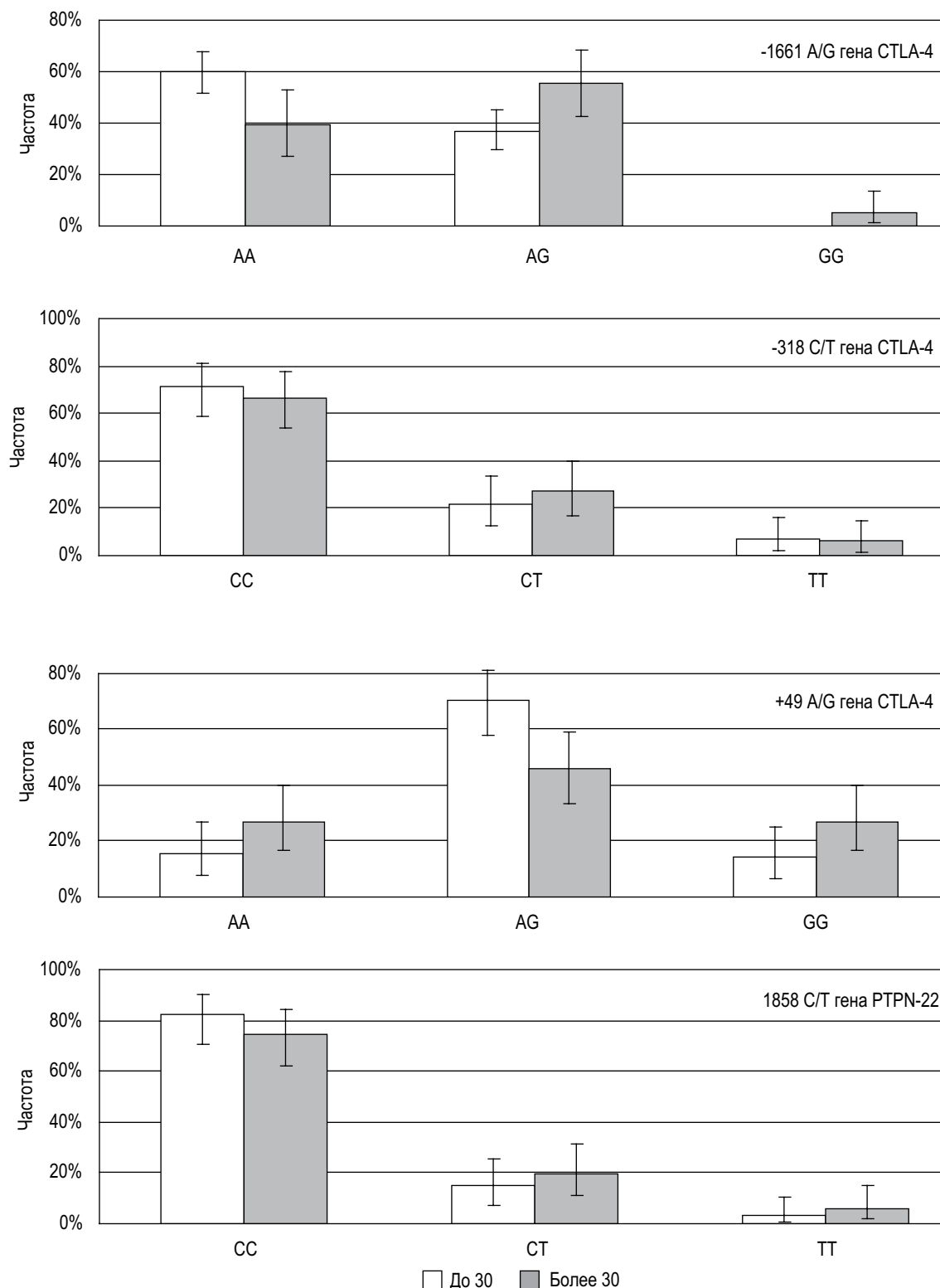
**Рисунок 2. Распределение частот генотипов в группе больных АИТ по уровню содержания АТ к ТПО**

и альтернативным сплайсингом в эндоплазматическом ретикулуме и, таким образом, затрагивает регуляторную способность гена, что очень важно в патогенезе АИТ. Отражение этого мы нашли и в нашей работе. Доля гомозиготного генотипа GG и полиморфного аллеля G увеличена в группе у больных АИТ, при этом носители

генотипа GG в 4 раза больше подвержены риску развития заболевания (ОШ = 4,04 ДИ 4,77-3,31). Таким образом, и для популяции РТ данный локус является показателем генетической предрасположенности к АИТ.

Согласно нашим результатам, полиморфизм +49 A/G кодирующей и -1661 A/G промоторной





**Рисунок 3. Распределение частот генотипов в группе больных АИТ по уровню содержания АТ к ТГ**

области ассоциированы с риском развития АИТ, а локус -318 С/Т – нет, хотя расположены они в одном гене. Wang с соавт. показал увеличение частоты встречаемости Т-аллеля у больных АИТ в популяции японцев. Такие противоречивые данные, полученные нами в ходе исследования,

возможно, объясняются низкой частотой встречаемости Т-аллеля в популяции нашей республики (10-13%). Возможно, для того чтобы увидеть различия в распределении гомозиготного генотипа по аллелю Т, необходимо увеличить выборку.

Полиморфизм 1858 С/Т гена RTPN-22 заключается в замене аргинина на триптофан в 620 кодоне вследствие замены цитозина на тимин в нуклеотиде 1858 и ассоциирован со многими аутоиммунными заболеваниями (ревматоидный артрит, СД 1, системная красная волчанка, болезнь Грейвса и др.). Безрецепторный ген протеинтирозинфосфатазы RTPN-22 локализован на хромосоме 1p13,3-13,1 и кодирует цитоплазматическую лимфоидспецифичную тирозинфосфатазу (LYP), которая вследствие данной замены меняет свою конформацию и не может участвовать в передаче сигнала Т-клеткам путем дефосфорилирования киназ. По данным авторов, у японской популяции аллель Т (содержащий триптофан) практически отсутствовал, тогда как в популяциях Великобритании, Канады, Швеции, Испании, Финляндии и Германии была показана ассоциация полиморфного аллеля со многими аутоиммунными заболеваниями (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, болезнь Грейвса). [18]. Полученные нами данные совпадают с результатами японских исследователей, так как возможно, что отсутствие ассоциации полиморфного локуса 1858 С/Т гена RTPN-22 тоже связано с очень низкой частотой встречаемости полиморфного аллеля и гомозиготного генотипа ТТ (менее 5%) у популяции РТ.

Проведенные ранее исследования показывают наличие корреляции Т- и G-аллелей полиморфизмов -318 С/Т и -1661 А/Г (соответственно) промоторной области и G-аллеля экзонного полиморфизма с повышением экспрессии гена на клеточной поверхности лимфоцитов после их стимуляции, результатом чего является повышение концентрации растворимой формы рецептора. Именно этот процесс является ключевым моментом в патогенезе АИТ [12]. Проведенный нами анализ сочетаний генотипов позволил выявить сочетания аллелей, маркирующих повышенный риск развития АИТ, и согласуется с данными, полученными японскими исследователями. При этом самый высокий риск развития АИТ наблюдался при одновременном присутствии сочетания гетерозиготного генотипа по промоторной области и гомозигота по полиморфному аллелю экзонной части гена, а сочетание генотипов по нормальным аллелям гена обладало протективным действием.

В процессе морфологической эволюции аутоиммунного процесса при АИТ функциональное состояние ЩЖ претерпевает стадийные изменения с практически обязательным исходом в гипотиреоз. Вместе с тем в литературе имеются сообщения о том, что при АИТ длительно существующим гипотиреозом функция ЩЖ может спонтанно нормализоваться с возможным разви-

тием тиреотоксикоза, что может быть обусловлено влиянием АТ на связывание ТТГ с его рецептором [5]. По результатам нашего исследования в группах больных АИТ с гипертиреозом наблюдается достоверное увеличение аллеля Т по полиморфному локусу промоторной области -318 С/Т гена CTLA-4 на фоне его уменьшения в группах больных с гипо- и эутиреозом. Из этого следует, что, возможно, данный полиморфизм промоторной области гена каким-то образом может влиять на выработку тиреоидных гормонов и тем самым повышать риск развития АИТ с гипертиреозом. Но не исключается и предположение о случайном характере такого распределения, так как группа больных гипертиреозом явилась самой малочисленной по сравнению с другими.

Исследование популяции японцев, больных гипотиреозом, показало увеличение частоты встречаемости SNP +49 А/Г (а именно аллеля G у больных АИТ) [19]. Отсутствие какой-либо ассоциации полиморфизмов -1661 А/Г и +49 А/Г гена CTLA-4 и по полиморфизму 1858 С/Т гена RTPN-22 с функцией ЩЖ при АИТ для нашей популяции, возможно, связано с «волнообразным» течением заболевания, т.е. переходом из одного состояния в другое.

В риске возникновения АИТ определенное значение придается возрасту и полу пациента. Заболевание чаще всего развивается у женщин, соотношение их к мужчинам составляет примерно 10:1-17:1. Так, например, Pauls et al., сравнивая женщин старше 35 лет и мужчин кавказской популяции по генному кластеру цитокинов на хромосоме 5q31-q33, показал, что их соотношение составляет 22,2 к 10,6% соответственно [16]. Именно на данной хромосоме находятся все основные гены предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям, в том числе и ген CTLA-4. Однако подобные исследования, проведенные для популяции коренных американцев и японцев, не показали очевидного сцепления данного локуса с риском развития АИТ у женщин молодого возраста. Это, возможно, является отражением влияния факторов окружающей среды на реализацию мутаций в генах-кандидатах и фенотипическое проявление заболевания [14].

Изучения полиморфизмов у разных возрастных групп женщин популяции РТ показал отсутствие различий в распределении частот генотипов по всем трем полиморфным локусам гена CTLA-4 и полиморфизму 1858 С/Т гена RTPN-22. Это означает, что носительство полиморфных локусов гена CTLA-4 ассоциировано с риском развития АИТ в любом возрасте, а реализация патологии зависит от многих факторов.

АИТ является органоспецифическим аутоиммунным заболеванием. При изучении маркеров

предрасположенности к АИТ особый интерес представляет определение влияния полиморфных локусов гена на основное клиническое проявление заболевания — повышение уровня АТ к различным антигенам ЩЖ. Как правило, отмечается повышенный уровень АТ к ТГ и ТПО, реже — к рецептору ТТГ. Уровень содержания АТ к ТГ и к ТПО до 100 и до 30 МЕ/л (соответственно) считается нормой. Наличие в крови АТ к ТГ и/или ТПО в диагностических титрах является серьезным указанием либо на наличие, либо на высокий риск развития аутоиммунной патологии [5].

Известно, что изучаемые нами гены вовлечены в регуляцию Т-клеток, а они, в свою очередь, стимулируют В-клетки к выработке АТ к ТГ и ТПО [17]. В связи с этим в группах больных провели оценку среднего уровня показателей АТ к ТГ и к ТПО среди носителей разных генотипов изучаемых полиморфных маркеров.

Согласно полученным данным, носительство гомозиготных генотипов по полиморфному аллелю экзонного +49 А/Г и промоторного -1661 А/Г полиморфизмов у больных с содержанием АТ к ТПО более 30 МЕ/л и более 1000 МЕ/л соответственно, а также наличие генотипов А/Г и Г/Г у полиморфных маркеров -1661 А/Г и +49 А/Г (соответственно) у больных с содержанием АТ к ТГ более 100 МЕ/л является маркером риска предрасположенности к АИТ с повышенной выработкой АТ к антигенам ЩЖ у популяции РТ. Наши результаты также согласуются с данными других исследований. К примеру, повышение уровня АТ к ТПО и к ТГ ассоциировано с мутациями, происходящими в области генов предрасположенности к АИТ и к гипотиреозу, к которым относится и ген CTLA-4, у популяции Америки, Италии, Великобритании и Северной Ирландии [17]. Тогда как для полиморфного варианта 1858 С/Т гена RPTN-22 показано отсутствие ассоциации с увеличением выработки АТ к компонентам ЩЖ, поскольку изменение конформации белка при мутации препятствует активации Т-клеток.

Таким образом, проблема АИТ до сих пор остается нерешенной. Для каждой отдельной популяции существует определенный набор генетических маркеров предрасположенности к нему в силу ее мультифакторности и полигенности. Фенотипическое проявление генетических полиморфизмов в значительной мере зависит от генотипа и условий жизни каждой популяции. Этим и объясняется противоречивость данных по ассоциации полиморфных локусов генов-кандидатов с риском развития АИТ [11]. Однако молекулярно-генетических исследований в области изучения генов-кандидатов на риск развития

данного заболевания для нашей популяции практически не проводится.

Представленные результаты могут служить основой для определения факторов риска и ранней диагностики АИТ у популяции РТ, а также его профилактики.

## Список литературы

1. Герасимов Г.А. Заболевания щитовидной железы // Здоровье. — 1999 — № 9 — С. 23-27.
2. Дедов И.И., Трошина Е.А., Александрова Г.Ф. Диагностика, лечение и профилактика узловых форм заболеваний щитовидной железы: Руководство для врачей. — М.: Хемис АГ, 1999. — С. 96-102.
3. Животский Л.А. Популяционная биометрия. — М.: Наука, 1991. — С.270.
4. Зефирова Г.С. Аутоиммунный тиреоидит и методы функциональной диагностики // Проблемы эндокринологии. — 1999. — № 12. — С. 16-21.
5. Шилин Д.Е. Исследование антитиреоидных антител и тиреоглобулина в диагностике и контроле терапии заболеваний щитовидной железы // Проблемы эндокринологии. — 1995. — Т. 41. — № 3. — С.17-23.
6. Bowes J., Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility // Rheumatology. — 2008. — Vol. 47. — P. 399-402.
7. Charon A. Chung & Lindsey Criswell RPTN-22: Its role in SLE and autoimmunity // Autoimmunity. — 2007. — Vol. 40, N 8. — P. 582-590.
8. Chistyakov D. Complex association analysis of GD using a Set of Polymorphic Markers // Molecular Genetics and Metabolism. — 2000. — Vol. 70. — P. 214-218.
9. Donner H., Braun J., Seidl C. et al. 17 polymorphism of the cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 Gene in Hashimoto's Thyroiditis and Addison's disease // J. Of clinical endocrinology and metabolism. — 1997. — Vol. 12. — P. 4130-4133.
10. Elsie M.A., Hsuen W., Sabra M.M. A genome-Wide Scan for Autoimmune thyroiditis in the Old Order Amish: Replication of Genetic Linkage on Chromosome 5q11.2-q14.3 // J. Of clinical endocrinology and metabolism. — 2006. — Vol. 88. — P. 1292-1296.
11. Sakai K., Shirasawa S., Ishikawa N. Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese // Human molecular genetics. — 2001. — Vol. 13. — P. 1379-1386.
12. Kotsa K. A., Weetman A.P. CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis // Clin. Endocrinol (Oxf). — 1997 — Vol. 46 — P. 551-554.

13. Magistrelli G.A., Jeannin P., Herbault N. soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells // Eur. J. Immunol. – 1999. – Vol. 29, N 11. – P. 3596-3602.
  14. Masaki Takara, Ichiro Komiya. Assotiation of CTLA-4 gene A/G polymorphism in Japanese type 1 diabetic patients with younger age of onset and AITD // Diabetes Care. – 2000. – Vol. 23. – P. 975-977.
  15. Mathew C.G.P. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. Methods in Molecular Biology // New York. – 1984. – P. 31-31.
  16. Pauls D.L., Zakarija M. Complex Segregation analysis of antibodies to thyroid peroxidase in Old Amish families // Am. J. Med. Gen. – 1993. – Vol. 47. – P. 375-379.
  17. Jaume J.C., Guo J., Pauls D.L. Evidence for genetic transmission of thyroid peroxidase autoantibody epitopic «finger-prints» // J. Clin. Endocrinol Metab. – Vol. 84. – P. 1424-1431.
  18. Velaga Mr., Wilson V. The codon 620 Tryptophan Allele of the Lymphoid tyrosine Phosphate (LYP) Gene is a major determinant of Graves' Disesase // The Journal of Clinical Endocrinology & Matabolism. – 2004. – Vol. 89, N 11. – P. 5862-5865.
  19. Wang L., Dalin Li, Zhenkun Fu. Association of CTLA-4 gene polymorphisms wiht sporadic breast cancer in Chinese Han population // BMC Cancer. – 2007. – Vol. 7. – P. 173-184.
- поступила в редакцию 20.10.2009  
принята к печати 05.11.2009*