

УДК 612.002.2:571.27

Н.С. Шкаруба <sup>1</sup>, Ф.Ф. Васильев <sup>1</sup>, А.Н. Силков <sup>1</sup>, Ю.А. Сенникова <sup>1</sup>, Ю.А. Лопатникова <sup>1</sup>,  
 А.Э. Сизиков <sup>1</sup>, Т.А. Калашникова <sup>2</sup>, Л.П. Сизыкина <sup>2</sup>, Ю.Б. Шулман <sup>3</sup>, С.В. Долгих <sup>3</sup>,  
 В.И. Мазуров <sup>3</sup>, С.В. Сенников <sup>1</sup>

### ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ TNFRI В ПОЗИЦИЯХ -609 И -1207 И TNFRII ТИПА В ПОЗИЦИЯХ -1709 И -3609 СРЕДИ УСЛОВНО-ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

<sup>1</sup> НИИ Клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

<sup>2</sup> РостГМУ (Ростов-на-Дону)

<sup>3</sup> СПбМАПО (Санкт-Петербург)

В работе была изучена частота встречаемости аллельных вариантов генов TNFRI в позициях -609 и -1207 и TNFRII типа в -1709 и -3609 у больных ревматоидным артритом и в группе популяционного контроля. В группе популяционного контроля полученные частоты аллелей и распределение генотипов промотора гена TNFRI для полиморфных точек -609 и -1207 характерны для азиатских популяций, для полиморфизмов гена TNFRII частоты и распределение отличались от европейских и азиатских популяций. Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов промоторных регионов генов TNFRI в позициях -609 и -1207 и TNFRII в позициях -3609 и -1709 у больных ревматоидным артритом и в группе популяционного контроля не выявил статистически значимых различий. Тем не менее, при анализе комбинаций было показано, что в группе больных ревматоидным артритом по сравнению с группой популяционного контроля статистически значимо реже встречается сочетание генотипов TNFRI-609GT + TNFRII-3609CC.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит, фактор некроза опухоли, рецепторы

### THE FREQUENCY OF ALLELIC VARIANTS OF GENES TNFRI AT POSITIONS -609 AND -1207 AND TNFRII AT POSITIONS -1709 AND -3609 IN HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

N.S. Shkaruba <sup>1</sup>, P.P. Vasiliev <sup>1</sup>, A.N. Silkov <sup>1</sup>, J.A. Sennikova <sup>1</sup>, J.A. Lopatnikova <sup>1</sup>,  
 A.E. Sizikov <sup>1</sup>, T.A. Kalashnikova <sup>2</sup>, L.P. Sizyakina <sup>2</sup>, J.B. Shulman <sup>3</sup>, S.V. Dolgikh <sup>3</sup>,  
 V.I. Mazurov <sup>3</sup>, S.V. Sennikov <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

<sup>2</sup> Rostov-on-Don State Medical University, Rostov-on-Don

<sup>3</sup> Medical Academy of Post-Diploma Education, St Petersburg

In this paper we studied the frequency of allelic variants of genes TNFRI at positions -609 and -1207 and TNFRII at positions -1709 and -3609 in patients with rheumatoid arthritis and in population control group. It was shown that the resulting frequency distribution of alleles and genotypes of TNFRI gene promoter in a group of population control is characteristic for Asian populations, for TNFRII gene polymorphisms and the frequency distribution differed from the European and Asian populations. Comparative analysis of allele and genotype frequencies of TNFRI gene promoter at positions -609 and -1207 and TNFRII and -3609 and positions -1709 in patients with rheumatoid arthritis and in population control group showed no statistically significant differences. However, in the analysis of combinations has been shown that in patients with rheumatoid arthritis compared with the control population was significantly less common combination of genotypes TNFRI-609GT + TNFRII-3609CC.

**Key words:** rheumatoid arthritis, tumor necrosis factor, receptors

Ревматоидный артрит (РА) — частое встречающееся воспалительное заболевание суставов, распространенность которого в популяции превышает 1,0 % [1, 2]. Одним из ключевых цитокинов в развитии этого заболевания является TNF- $\alpha$ , роль которого изучена в ряде исследований *in vitro* и *in vivo* и подтверждена в ходе клинических исследований по применению препаратов-блокаторов TNF- $\alpha$  для лечения ревматоидного артрита [3]. TNF- реализует свое действие через два трансмембранных рецептора: рецептор TNF I типа (TNFRI), также известный как p55 или p60, и рецептор TNF II типа (TNFRII), обозначаемый также как p75 или p80. TNFRI — конститутивно экспрессируется практически на всех клетках млекопитающих, тогда как TNFRII экспрессируется преимущественно

на клетках иммунной системы. Домен смерти содержит цитоплазматическая часть TNFRI, но не TNFRII. Через TNFRI реализуется большинство эффектов TNF- $\alpha$ , включая цитотоксический, индукцию роста клеток, активацию NF $\kappa$ B, регуляцию адгезии и индукцию экспрессии генов цитокинов. Было показано, что сигнал, передающийся через TNFRII, важен для пролиферации лимфоидных клеток. Продемонстрировано, что в некоторых типах клеток TNFRII играет роль в реализации эффектов цитотоксичности, а также активации NF $\kappa$ B [4]. И TNFRI, и TNFRII могут быть отделены от поверхности клеток ферментами семейства металлопротеиназ в ответ на воспалительный сигнал. Интересно, что эти отделенные внеклеточные области рецепторов TNF- $\alpha$  (так называемые рас-

творимые рецепторы TNF- $\alpha$ ) сохраняют способность связывать TNF- $\alpha$  и таким образом могут функционировать как эндогенные ингибиторы TNF- $\alpha$  [5]. Уровень растворимых рецепторов TNF- $\alpha$  повышен в синовиальной жидкости и сыворотке крови больных РА [6, 7]. В другой работе продемонстрировано, что сывороточная концентрация растворимых рецепторов TNF- $\alpha$  выше у больных РА по сравнению с условно здоровыми донорами, а при разделении группы больных на пациентов с активным РА и пациентов в ремиссии (по DAS28) было показано, что концентрация растворимых рецепторов TNF- $\alpha$  выше у пациентов в ремиссии [8]. Уровень экспрессии рецепторов, в том числе и к TNF- $\alpha$ , в определенной степени зависит от аллельных вариантов их генов, частота встречаемости которых может значительно меняться при патологических процессах. Таким образом, полиморфные генетические сайты могут рассматриваться как маркеры предрасположенности или резистентности к различным заболеваниям, в патогенезе которых играет свою роль цитокиновая сеть [9, 10]. Целью данного исследования было изучить частоту встречаемости аллельных вариантов генов TNFR1 в позициях -609 и -1207 и TNFR2 типа в -1709 и -3609 в группе популяционного контроля и у больных ревматоидным артритом.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования (образцы цельной крови) получен от условно здоровых доноров: в УФ и НПНСО (ОГУЗ «Новосибирский центр крови»). Выборка популяционного контроля для исследования генотипов сформирована случайным образом из числа жителей г. Новосибирска, согласившихся сдать кровь для исследования (211 человек).

Изучение распределения аллельных вариантов генов TNF- $\alpha$  и его рецепторов проводилось у больных РА, находившихся на госпитализации в клинике ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН (г. Новосибирск), ГОУ ДПО СПб МАПО (г. Санкт-Петербург), ГОУ ВПО Рост ГМУ (г. Ростов-на-Дону). Выборка больных РА составила 466 человек, из них женщин: 86,5 %, мужчин-13,5 %, в возрасте от 18 до 70 лет. Всем донорам были разъяснены цели исследования, у всех пациентов было получено информированное согласие на процедуру забора биологического материала. Диагноз РА верифицирован в соответствии критериями ACR [11].

ДНК из цельной крови выделяли сорбционным методом с помощью набора «Проба-НК» (ООО «ДНК-технология», Россия) согласно инструкции производителя.

Генотипирование TNFR1 по полиморфизмам -609 G/T, -1207 C/G и TNFR2 по полиморфизмам -1709 A/T, -3609 C/T проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей рестрикцией продукта амплификации. ПЦР проводили с использованием амплификатора «PТС-200 DNA Engine» (MJ Research inc., USA). Реакционная смесь в объеме 20 мкл содержала 1 – 2 ед. Taq-ДНК полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск), 0,5 мкМ

каждого из праймеров, 0,25 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 50 – 200 нг геномной ДНК. Реакционный буфер прилагался к ДНК-полимеразе и содержал 60 мМ Tris-HCl (pH 8,5 при 25 °C), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X-100. Для точки TNFR1 -609 применялся AS (Ammonium Sulfate) буфер, содержащий 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25 °C), 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween-20 («Сибэнзим», г. Новосибирск). Режим термоциклирования зависел от состава праймеров и длины амплифицируемого фрагмента и рассчитывался с использованием программы «Primer Premier 5» (Premier Biosoft International, USA). Все праймеры были синтезированы в ЗАО «Биосан», г. Новосибирск. Генотипирование проводилось с использованием опубликованной структуры праймеров [12, 13, 14]. Для генотипирования аллельного полиморфизма гена TNFR2 в позиции -3609, размер продукта 331 п.н. последовательности праймеров были подобраны с использованием программы NCBI/Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>).

Прямой: 5'-ATGCTTTTGTCCATGCAGGT -3'

Обратный: 5'-GCTGTACCCCGTATTAGCTG -3'

Далее проводили рестрикционный анализ продуктов ПЦР-амплификации. Продукты амплификации подвергали рестрикции соответствующими эндонуклеазами: TNFR1 -609 – Bst4C I, TNFR1 – 1207 – Bst8C I, TNFR2 -1709 – DseD I, TNFR2 -3609- Msp I. («СибЭнзим», Новосибирск). Рестрикционная смесь включала 2,5 – 5 мкл амплификата и 5 – 10 единиц активности ферментов фирмы «Сибэнзим» (Новосибирск), далее инкубировали согласно рекомендациям производителя фермента.

Продукты амплификации и рестрикции анализировали с помощью капиллярного электрофореза на станции QIAxcel (Qiagen) или электрофореза в 2% агарозном геле. В качестве маркера молекулярного веса использовали гидролизат плазмиды pUC19, полученный при расщеплении рестриктазой Msp I («Сибэнзим», г. Новосибирск) и QX DNA Size Marker 100bp-3kb (Qiagen). Продукты полимеразной цепной реакции и рестрикции, при разделении в агарозных гелях, визуализировали в ультрафиолетовом свете, молекулярный вес фрагментов оценивался с помощью видеоденситометра и пакета прикладных программ «ImageMaster VDS» (Pharmacia Biotech, USA).

Статистическая обработка проводилась с использованием стандартных подходов. Оценку соответствия частот генотипов равновесию Харди – Вайнберга проводили по критерию  $\chi^2$ . Различия частот аллелей и генотипов устанавливалось с использованием критерия  $\chi^2$  с поправкой Йетса. С помощью программы OpenEpi ([www.openepi.com](http://www.openepi.com)) проводилась оценка отношения шансов и 95% доверительного интервала (OR, CI), оценка относительного риска.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частоты аллелей и генотипов исследованных полиморфизмов промоторных регионов генов ре-

цепторов TNF в позициях -609 и -1207, для рецептора I типа и -3609 и -1709 для рецептора II типа у больных ревматоидным артритом и в выборке популяционного контроля приведены в таблице 1. Распределение генотипов промоторных регионов гена TNFR1 в позициях -609 и -1207 и гена TNFR2 в позициях -3609 и -1709 в выборке популяционного контроля, составленной из условно-здоровых доноров, подчиняется закону Харди-Вайнберга. Для сравнения распределения частот аллелей и генотипов с другими популяциями были использованы сведения по исследуемым полиморфизмам из базы данных NCBI по референтным популяциям (в ss66857510): для европеоидов -CEU-GENO-PANEL, афроамериканцев -AAM-GENO-PANEL и азиатской расы -CHBGENO-PANEL [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/]. Полученные частоты аллелей и распределение генотипов промотора гена TNFR1 для полиморфных точек -609 и -1207 характерны для азиатских популяций, для

полиморфизмов гена TNFR2 отличались от европейских и азиатских популяций.

Распределение частот генотипов полиморфизма гена TNFR1 в позиции -3609 в группе больных ревматоидным артритом имело отклонение от ожидаемого в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга ( $\chi^2 = 5,87; p = 0,02$ ), что свидетельствует о наличии факторов, влияющих на частоту аллелей и генотипов в группе больных. При проведении сравнительного анализа частот аллелей и генотипов промоторных регионов генов TNFR1 в позициях -609 и -1207 и TNFR2 в позициях -3609 и -1709 в исследованных группах мы не выявили статистически значимых различий. Тем не менее, при анализе комбинаций, выявлено сочетание генотипов TNFR1-609GT + TNFR2-3609CC частота которого у больных составила 10,4 % и была статистически значимо ниже таковой в группе популяционного контроля (16,35 %,  $\chi^2 = 4,016, p = 0.045$ ). Отноше-

**Таблица 1**  
Частоты генотипов и аллелей полиморфизмов генов TNFR1 и TNFR2 у больных ревматоидным артритом и условно-здоровых доноров

Полиморфизм	Группа	Частота генотипа, % (количество)			Частота аллеля, % (количество)	
		GG	GT	TT	G	T
TNFR1 (-609 G>T)	РА n = 423	41,8 (177)	43,7 (185)	14,4 (61)	64 (539)	36 (307)
	Контроль n = 208	42,3 (88)	46,2 (96)	11,5 (24)	65 (272)	35 (144)
TNFR1 (-1207 C>G)		<b>CC</b>	<b>CG</b>	<b>GG</b>	<b>C</b>	<b>G</b>
	РА n = 462	25,3 (117)	46,1 (213)	28,6 (132)	48 (447)	52 (477)
	Контроль n = 211	22,7 (48)	49,8 (105)	27,5 (58)	48 (201)	52 (221)
TNFR2 (-1709 A>T)		<b>AA</b>	<b>AT</b>	<b>TT</b>	<b>A</b>	<b>T</b>
	РА n = 436	88,1 (384)	11,5 (50)	0,5 (2)	94 (818)	6 (54)
	Контроль n = 211	88,6 (187)	11,4 (24)	0	94 (398)	6 (24)
TNFR2 (-3609C>T)		<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
	РА n = 466	29 (135)	54,7 (255)	16,3 (76)	56 (525)	44 (407)
	Контроль n = 211	32,7 (69)	54 (114)	13,3 (28)	60 (252)	40 (170)

**Таблица 2**  
Частоты комбинаций генотипов промоторных локусов генов TNFR1 и TNFR2 у больных ревматоидным артритом и условно-здоровых доноров

Генотип TNFR1 -609	Генотип TNFR2 -3609	Частота сочетания в группе РА (n = 423), %	Частота сочетания в группе контроля (n = 208), %
GG	CC	13	13
GG	CT	22,7	25
GG	TT	6,15	4,33
GT	CC	10,4*	16,35
GT	CT	26	23,56
GT	TT	7,33	6,25
TT	CC	4,73	3,85
TT	CT	6,86	5,29
TT	TT	2,84	2,4

**Примечание:** \* – статистически значимое различие в сравнении с группой популяционного контроля ( $p < 0,05$ ).

ние шансов для этого сочетания генотипов было  $OR = 0,5941$  ( $CI_{95} = 0,3668 - 0,9622$ ), при этом относительный риск ревматоидного артрита для носителей этого генотипа был на 5,9 % ниже. Данные сравнительного анализа комбинаций генотипов приведены в таблице 2.

### ВЫВОДЫ

1. Установлено, что частота встречаемости аллельных вариантов гена TNFR1 в группе популяционного контроля составляет следующие значения (в %): -609GG (42,3), -609GT (46,2), -609TT (11,5); -1207CC (22,7), -1207CG (49,8), -1207GG (27,5), что характерно для азиатских популяций.

2. Показано, что частота встречаемости аллельных вариантов гена TNFR2 в группе популяционного контроля составляет следующие значения (в %): -1709AA (88,6), -1709AT (11,4), -1709TT (0); -3609CC (32,7), -3609CT (54), -3609TT (13,3), что отличалось от европейских и азиатских популяций.

3. При исследовании распределения генотипов генов TNFR1 и TNFR2 в группе популяционного контроля и в группе больных ревматоидным артритом не выявлено статистически значимых различий, но при изучении распределения сочетаний генотипов установлено, что больные ревматоидным артритом характеризуются снижением частоты встречаемости сочетания генотипов TNFR1-609GT + TNFR2-3609CC по сравнению с группой популяционного контроля.

*Работа выполнена при поддержке: ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК № 02.740.11.0707).*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Сигидин Я.А., Лукина Г.В. Ревматоидный артрит. — М.: АНКО, 2001. — 328 с.
2. Harris E.D. Jr. Rheumatoid Arthritis: pathophysiology and implications for therapy // *N. Engl. J. Med.* — 1990. — Vol. 322. — P. 1277–1289.
3. Brennan F.M., McInnes I.B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis // *J. Clin. Invest.* — 2008. — Vol. 118 (11). — P. 3537–3545.
4. Parameswaran N., Patial S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages // *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.* — 2010. — Vol. 20, N 2. — P. 87–103.
5. Van Zee K.J., Kohno T., Fischer E., Rock C.S. et al. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate

during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1992. — Vol. 89 (11). — P. 4845–4849.

6. Cope A.P., Aderka D., Doherty M., Engelmann H. et al. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases // *Arthritis Rheum.* — 1992. — Vol. 35. — P. 1160–1169.

7. Steiner G., Studnicka-Benke A., Witzmann G., Höfler E. et al. Soluble receptors for tumor necrosis factor and interleukin-2 in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, reactive arthritis and osteoarthritis // *J. Rheumatol.* — 1995. — Vol. 22 (3). — P. 406–412.

8. Sivalingam S.P., Thumboo J., Vasoo Sh., Thio S.T. et al. In vivo Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Normal and Patients with Rheumatoid Arthritis // *Ann. Acad. Med. Singapore.* — 2007. — Vol. 36. — P. 96–99.

9. Hoogendoorn B. Functional analysis of human promoter polymorphisms // *Human Molecular Genetics.* — 2003. — Vol. 12 (18). — P. 2249–2254.

10. Pastinen T., Ge B., Hudson T.J. Influence of human genome polymorphism on gene expression // *Human Molecular Genetics.* — 2006. — Vol. 15, N 1. — P. 9–16.

11. Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., McShane D.J. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* — 1988. — Vol. 31(3). — P. 315–324.

12. Allen R.A., Lee E.M., Roberts D.H., Park B.K. et al. Polymorphisms in the TNF and TNF-receptor genes in patients with coronary artery disease // *European Journal of Clinical Investigation.* — 2001. — Vol. 31. — P. 843–851.

13. Waschke K.A., Villani A., Vermeire S., Dufresne L. et al. Tumor Necrosis Factor Receptor Gene Polymorphisms in Crohn's Disease: Association with Clinical Phenotypes // *The American Journal of Gastroenterology.* — 2005. — Vol. 100. — P. 1126–1133.

14. Culpan D., Cornish A., Love S., Kehoe P. et al. Protein and gene expression of tumour necrosis factor receptors I and II and their promoter gene polymorphisms in Alzheimer's disease // *Experimental Gerontology.* — 2007. — Vol. 42. — P. 538–544.

### Сведения об авторах

**Шкаруба Надежда Сергеевна** – врач, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН  
**Васильев Филипп Филиппович** – аспирант, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН  
**Силков Александр Николаевич** – старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН  
**Сенникова Юлия Александровна** – кандидат медицинских наук, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН  
**Лопатникова Юлия Анатольевна** – старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН  
**Сизиков Алексей Эдуардович** – заведующий отделением, кандидат медицинских наук, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН  
**Калашникова Татьяна Анатольевна** – кандидат медицинских наук, ГОУ ВПО Рост ГМУ  
**Сизякина Людмила Петровна** – заведующий кафедрой, доктор медицинских наук, профессор, ГОУ ВПО Рост ГМУ  
**Шульман Юлия Борисовна** – врач, ГОУ ДПО СПб МАПО  
**Долгих Сергей Владимирович** – руководитель ЦАТ, кандидат медицинских наук, ГОУ ДПО СПб МАПО  
**Мазуров Вадим Иванович** – член-корр. РАМН, профессор, ГОУ ДПО СПб МАПО  
**Сенников Сергей Витальевич** – заведующий лабораторией, ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14)