

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *IL2RA* У ДЕТЕЙ С СЕРОНЕГАТИВНЫМ ПОЛИАРТИКУЛЯРНЫМ ВАРИАНТОМ ЮВЕНИЛЬНОГО АРТРИТА

Назарова Л.Ш.<sup>1</sup>, Данилко К.В.<sup>1</sup>, Куватова Д.Н.<sup>1</sup>, Малиевский В.А.<sup>1</sup>, Викторова Т.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, Россия, e-mail: lilinaz19@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБУН РАН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН

Согласно классификации Международной лиги ревматологических ассоциаций (ILAR), выделяют два варианта полиарткулярного ювенильного артрита (ЮА): серопозитивный по ревматоидному фактору (РФ) и серонегативный по РФ (РФ-негативный полиартрит). Ранее были установлены ассоциации полиморфных локусов некоторых генов семейства интерлейкинов с развитием различных форм ЮА. Целью настоящего исследования стало изучение возможной взаимосвязи полиморфного локуса rs2104286 гена *IL2RA* с развитием РФ-негативного полиартрита у детей из Республики Башкортостан. Генотипирование 87 пациентов с РФ-негативным полиартритом и 194 индивидов контрольной группы проводилось методами ПЦР с ПДРФ-анализом и ПЦР в реальном времени, а статистическая обработка - с применением точного двустороннего критерия Фишера, логистической регрессии, а также оценкой отношения шансов. Сравнительный анализ полученных данных показал, что распределение частот генотипов и аллелей в общей группе больных с РФ-негативным полиартритом и в контроле было сходным ( $p=1,000$ ). В то же время, после стратификации с учетом гендерных различий было установлено, что у мальчиков с РФ-негативным полиартритом аллель А и генотип АА встречались значимо чаще ( $p=0,011$  и  $p=0,016$ , соответственно), а аллель G и генотип AG – значимо реже, чем у юношей в контроле ( $p=0,011$  и  $p=0,030$ , соответственно). У девочек с РФ-негативным полиартритом частоты генотипов и аллелей не отличались от контрольной группы ( $p=0,248$ ). Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют о наличии ассоциации полиморфного локуса rs2104286 гена *IL2RA* с развитием РФ-негативного полиартрита у мальчиков из Республики Башкортостан.

Ключевые слова: РФ-негативный полиартрит, ювенильный артрит, ассоциация, ген *IL2RA*, полиморфизм, rs2104286

## THE *IL2RA* GENE POLYMORPHISM IN CHILDREN WITH RHEUMATOID FACTOR NEGATIVE POLYARTICULAR JUVENILE ARTHRITIS

Nazarova L.S.<sup>1</sup>, Danilko K.V.<sup>1</sup>, Kuvatova D.N.<sup>1</sup>, Malievsky V.A.<sup>1</sup>, Viktorova T.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State Medical University, Ufa, e-mail: lilinaz19@mail.ru;

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa

According to the classification of International League of Associations for Rheumatology (ILAR) there are two subtypes of polyarticular juvenile arthritis (JA): rheumatoid factor (RF)-positive polyarthritis and RF-negative polyarthritis. Some single nucleotide polymorphisms (SNPs) within cytokines genes have been reported to be associated with different JA subtypes. The aim of the study was to determine whether the *IL2RA* rs2104286 SNP is associated with the development of RF-negative polyarthritis in children from Bashkortostan, Russia. Genotyping of 87 patients with RF-negative polyarthritis and 194 healthy controls was performed by PCR-RFLP and real-time PCR methods. Fisher's exact test, logistic regression method and odds ratio calculation were used for the statistical analysis. Frequencies of alleles and genotypes of the *IL2RA* rs2104286 SNP were similar in patients with RF-negative polyarthritis and in controls ( $p=1,000$ ). At the same time, after dividing the whole groups into subgroups based on gender it was found that the frequencies of rs2104286 allele A and genotype AA were significantly higher ( $p=0,011$  and  $p=0,016$ , correspondingly) and allele G and genotype AG - significantly lower ( $p=0,011$  and  $p=0,030$ , correspondingly) in boys with RF-negative polyarthritis in comparison to controls. There were no significant differences in the frequencies of alleles and genotypes between girls with RF-negative polyarthritis and controls ( $p=0,248$ ). Thus, in this study we revealed the association of the *IL2RA* rs2104286 SNP with the development of RF-negative polyarthritis in boys from Bashkortostan, Russia.

Keywords: RF-negative polyarthritis, juvenile arthritis, association, *IL2RA* gene, polymorphism, rs2104286

На сегодняшний день ювенильный артрит (ЮА) – это одно из наиболее частых и самых инвалидизирующих ревматологических заболеваний в педиатрической практике [1].

Полиартикулярное поражение в дебюте ЮА выявляется в 13-35% случаев и характеризуется вовлечением в патологический процесс 5 и более суставов в течение первых 6 месяцев болезни [7, 9]. Согласно классификации Международной лиги ревматологических ассоциаций (ILAR), в зависимости от наличия или отсутствия у пациента ревматоидного фактора (РФ) выделяют два клинически и прогностически неидентичных варианта полиартикулярного ЮА: серопозитивный по РФ (РФ-позитивный полиартрит) и серонегативный по РФ (РФ-негативный полиартрит) [7]. Следует отметить, что на долю пациентов с РФ-негативным полиартритом в структуре ЮА приходится около 11-28%, в то время как с РФ-позитивным - только 2-7%, однако в некоторых популяциях наблюдается иное соотношение [7, 9]. Этиология РФ-негативного полиартрита, как и ЮА в целом, до настоящего времени точно не установлена, однако предполагается ее мультифакториальный характер, подразумевающий наличие ряда генетических и средовых факторов риска, в совокупности приводящих к нарушению процессов приобретенного иммунитета и развитию аутоиммунного поражения [5, 7]. Ранее были установлены ассоциации полиморфных локусов некоторых генов семейства интерлейкинов (IL) с развитием различных форм ЮА [4, 8]. Одним из таких генов является *IL2RA*, кодирующий альфа субъединицу рецептора к IL-2. В норме IL-2, связываясь с рецептором, расположенным на поверхности клеток, участвует в обеспечении процессов аутоотолерантности в организме [2]. В то же время показано, что увлечение концентрации растворимой формы IL2RA (sIL-2RA) в сыворотке блокирует активность IL-2 и может иметь значение в формировании предрасположенности к аутоиммунным расстройствам [2].

Ген *IL2RA* расположен на коротком плече 10 хромосомы в локусе 10p15.1. Одним из наиболее изученных и функционально значимых полиморфных локусов в данной области является rs2104286, для которого ранее зарубежными учеными было показано наличие взаимосвязи с развитием ЮА и других аутоиммунных заболеваний [4, 6].

**Цель исследования:** изучение возможной взаимосвязи полиморфного локуса rs2104286 гена *IL2RA* с развитием РФ-негативного полиартрита у детей из Республики Башкортостан.

#### **Материалы и методы исследования**

Исследование было одобрено этическим комитетом ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России. После получения добровольного информированного согласия в основную группу было включено 87 пациентов с РФ-негативным полиартритом, состоявших на учете в Республиканской детской клинической больнице (г. Уфа) в 2011-2015 гг., а в контрольную – 194 добровольца без аутоиммунных заболеваний в анамнезе.

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из лимфоцитов периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Изучение полиморфного локуса rs2104286 гена *IL2RA* проводилось методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) (эндонуклеаза рестрикции *NdeI*, «Fermentas») и верифицировалось методом ПЦР в реальном времени с помощью праймеров и зондов фирмы «ДНК-Синтез» (Россия) на приборе StepOnePlus фирмы «Applied Biosystems» (США).

Частоты генотипов и аллелей определялись с использованием программы Microsoft Excel. Для сравнения частот генотипов и аллелей в исследуемых группах рассчитывался точный двусторонний критерий Фишера –  $p(F)$  в программе WinPeri v.11.44. Для оценки риска развития заболевания использовался 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 выборок ожидаемому по Харди-Вайнбергу применялся логистический регрессионный анализ (программа SNPStats [10]). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Средний возраст обследованных пациентов с РФ-негативным полиартритом составил  $10,33 \pm 0,49$  лет, соотношение мальчиков к девочкам 25,3% / 74,7%, а в контрольной группе –  $18,23 \pm 0,07$  лет и 36,1% / 63,9%, соответственно.

Распределение частот генотипов в группах больных с РФ-негативным полиартритом и в контрольной группе соответствовало ожидаемому по Харди-Вайнбергу ( $p=0,42$  и  $p=0,58$ , соответственно), а при проведении сравнительного анализа оказалось сходным в обеих выборках ( $p=1,000$ ) (таблица 1). Приведенный факт нашел свое подтверждение и при исследовании в программе SNPStats, где ни для одной из моделей наследования не было выявлено значимых различий.

**Таблица 1**

Частоты генотипов и аллелей полиморфного локуса rs2104286 гена *IL2RA* в группах пациентов с РФ-негативным полиартритом и здоровых индивидов из Республики Башкортостан

Генотипы и аллели	Пациенты с РФ-негативным полиартритом		Контроль		p	OR (95% CI)
	Абс.	%	Абс.	%		
AA	63	72,41	139	71,65	1,000	1,039 (0,595-1,849)
AG	21	24,14	49	25,26	0,882	0,942 (0,525-1,712)
GG	3	3,45	6	3,09	1,000	1,119 (0,301-4,280)
A	147	84,48	327	84,28	1,000	1,016 (0,629-1,640)
G	27	15,52	61	15,72	1,000	0,985 (0,610-1,589)

Далее было выполнено сравнение основной и контрольной групп с учетом гендерных

различий. При этом было установлено, что у мальчиков с РФ-негативным полиартритом аллель А и генотип АА встречались значимо чаще ( $p=0,011$ ;  $OR=5,486$ , 95% CI 1,395-24,076 и  $p=0,016$ ;  $OR=5,909$ , 95% CI 1,430-26,884, соответственно), а аллель G и генотип AG – значимо реже, чем у юношей в контроле ( $p=0,011$ ;  $OR=0,182$ , 95% CI 0,042-0,717 и  $p=0,030$ ;  $OR=0,204$ , 95% CI 0,045-0,856, соответственно) (таблица 2). По данным программы SNPStats наиболее удачной оказалась лог-аддитивная модель наследования ( $p=0,0056$ ;  $OR=0,18$ , 95% CI 0,04-0,81).

В то же время, распределение частот генотипов и аллелей у девочек с РФ-негативным полиартритом и в контрольной группе оказалось статистически не отличимым ( $p=0,248$ ) (таблица 2).

При сравнительном анализе частот генотипов и аллелей между мальчиками и девочками отдельно в основной и контрольной выборках было также отмечено, что в группе с РФ-негативным полиартритом частота аллеля А и генотипа АА была значимо выше, а аллеля G – ниже у мальчиков, чем у девочек ( $p=0,028$  в обоих случаях), в то время как в контрольной группе наблюдалась обратная ситуация (значимое снижение доли генотипа АА у мальчиков в сравнении с девочками ( $p=0,047$ ), для аллелей выявлена только тенденция ( $p=0,058$ )).

**Таблица 2**

Частоты генотипов и аллелей полиморфного локуса rs2104286 гена *IL2RA* в группах с пациентов с РФ-негативным полиартритом и здоровых индивидов из Республики Башкортостан с учетом гендерных различий

Гендерный признак	Генотипы и аллели	Пациенты с РФ-негативным полиартритом		Контроль		p	OR (95% CI)
		Абс.	%	Абс.	%		
Девочки/ Девушки	АА	43	66,15	95	76,61	0,167	0,597 (0,302-1,135)
	AG	19	29,23	26	20,97	0,213	1,557 (0,767-3,038)
	GG	3	4,62	3	2,42	0,416	1,952 (0,444-8,519)
	А	105	80,77	216	87,10	0,130	0,622 (0,359-1,111)
	G	25	19,23	32	12,90	0,130	1,607 (0,900-2,784)
Мальчики/ Юноши	АА	20	90,91	44	62,86	<b>0,016*</b>	<b>5,909 (1,430-26,884)</b>
	AG	2	9,09	23	32,86	<b>0,030</b>	<b>0,204 (0,045-0,856)</b>
	GG	0	0,00	3	4,29	1,000	0,000 (0,000-3,686)
	А	42	95,45	111	79,29	<b>0,011</b>	<b>5,486 (1,395-24,076)</b>
	G	2	4,55	29	20,71	<b>0,011</b>	<b>0,182 (0,042-0,717)</b>

\* **жирным шрифтом** выделены значимые различия

### Обсуждение

В нашей работе было выполнено изучение возможной взаимосвязи полиморфного локуса rs2104286 гена *IL2RA* с развитием РФ-негативного полиартрита у детей из Республики Башкортостан. В общей группе пациентов и у девочек таковой выявлено не

было, в то же время, оказалось, что у мальчиков маркерами повышенного риска развития РФ-негативного полиартрита являются аллель А и генотип АА (OR=5,486, 95%CI 1,395-24,076 и OR=5,909, 95%CI 1,430-26,884, соответственно), а пониженного – аллель G и генотип AG (OR=0,182, 95%CI 0,042-0,717 и OR=0,204, 95%CI 0,045-0,856, соответственно). Показано, что в рассматриваемом случае наиболее удачной моделью наследования является лог-аддитивная, согласно которой каждая копия аллеля G вносит дополнительный протективный эффект в отношении риска развития РФ-негативного полиартрита у мальчиков (OR=0,18, 95%CI 0,04-0,81).

Полученные нами результаты согласуются с данными исследований, посвященных изучению функциональной значимости полиморфного локуса rs2104286 гена *IL2RA* и свидетельствующих о наличии ассоциации генотипа АА с повышенным уровнем sIL-2RA в сыворотке как здоровых индивидов, так и пациентов с сахарным диабетом 1 типа и множественным склерозом [6].

По имеющимся сведениям полиморфный локус rs2104286 гена *IL2RA* изучался при ЮА в ряде зарубежных работ, однако в России подобное исследование проводится впервые [3, 4]. Так, Hinks с соавт. установили, что минорный аллель G данного полиморфного локуса ассоциирован с пониженным риском развития ЮА у пациентов из Великобритании и Северной Америки. При анализе в подгруппах (согласно классификации ILAR) учеными было показано, что значимые различия сохранились только для пациентов с персистирующим и распространившимся олигоартритом, но не с РФ-негативным полиартритом, что согласуется с нашими результатами [4]. В то же время, при подразделении индивидов с учетом гендерных различий, Hinks с соавт. было установлено, что аллель G служил значимым протективным маркером только для девочек с ЮА, однако в отношении вариантов заболевания аналогичный анализ не проводился [4]. Кроме того, в репликативном исследовании Ellis с соавт. не было выявлено ассоциации изучаемого полиморфного локуса с развитием ЮА у детей из Австралии, хотя в отношении вариантов течения болезни и пола пациентов в указанной работе данные не приведены [3].

В целом, приведенные выше факты свидетельствуют в пользу подтверждения возможной роли полиморфного локуса rs2104286 гена *IL2RA* в формировании предрасположенности к аутоиммунной патологии, и, в частности, к ЮА. Однако, учитывая некоторую противоречивость в результатах ассоциативных исследований, необходимо дальнейшее изучение указанного полиморфного локуса при ЮА на выборках большего объема и, в особенности, при отдельных его вариантах, а также с учетом гендерных различий.

## **Заключение**

В нашем исследовании установлена ассоциация полиморфного локуса rs2104286 гена *IL2RA* с развитием РФ-негативного полиартрита у мальчиков из Республики Башкортостан. Показано, что маркерами повышенного риска данной формы ЮА у мальчиков служат аллель А и генотип АА, а пониженного – аллель G и генотип AG, при этом наиболее удачной моделью наследования является лог-аддитивная.

### Список литературы

1. Алексеева Е. И., Литвицкий П. Ф. Ювенильный ревматоидный артрит: этиология, патогенез, клиника, алгоритмы диагностики и лечения : рук. для врачей, преподавателей, науч. сотр. / Под общ. ред. А. А. Баранова. – М.: ВЕДИ, 2007. – 368 с.
2. Cerosaletti K, Schneider A, Schwedhelm K, et al. Multiple Autoimmune-Associated Variants Confer Decreased IL-2R Signaling in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T Cells of Type 1 Diabetic and Multiple Sclerosis Patients // PLoS ONE. 2013. Vol.8, №12. e. 83811
3. Ellis JA, Chavez RA, Pezic A, et al. Independent replication analysis of genetic loci with previous evidence of association with juvenile idiopathic arthritis // Pediatric Rheumatology Online Journal. 2013. Vol. 11. P. 12.
4. Hinks A, Ke X, Barton A, et al. Association of the *IL2RA/CD25* Gene With Juvenile Idiopathic Arthritis // Arthritis and Rheumatism. 2009. Vol. 60, № 1. P. 251-257.
5. Lin YT, Wang CT, Gershwin ME, Chiang BL. The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis // Autoimmun Rev. 2011. Vol. 10, № 8. P. 482-489.
6. Maier LM, Lowe CE, Cooper J, et al. *IL2RA* Genetic Heterogeneity in Multiple Sclerosis and Type 1 Diabetes Susceptibility and Soluble Interleukin-2 Receptor Production // PLoS Genetics. 2009. Vol. 5, №1. e. 1000322.
7. Petty R. E., Laxer R. M., Lindsley C. B., Wedderburn L. Textbook of pediatric rheumatology. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2016. 736 p.
8. Phelan JD, Thompson SD, Glass DN. Susceptibility to JRA/JIA: complementing general autoimmune and arthritis traits // Genes Immun. 2006. Vol. 7, № 1. P. 1-10.
9. Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis // Lancet. 2007. Vol. 369, № 9563. P. 767-78.
10. Solé X, Guinó E, Valls J, et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies // Bioinformatics. 2006. Vol. 22, №15. P. 1928-1929.

### Рецензенты:

Хисамов Э.Н., д.б.н., профессор кафедры патологической физиологии, ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, г. Уфа;

Корытина Г.Ф., д.б.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории физиологической генетики ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа.