

ВЛИЯНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА rs7308076 ГЕНА *CIT* НА ВЫРАЖЕННОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Селянина Н.В.¹, Арбузова Е.Е.¹, Кривцов А.В.²

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, e-mail: nselyanina@mail.ru;

²ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, e-mail: kriptov@fcrisk.ru

Ген *CIT* (citron rho-interacting serine/threonine kinase), кодирующий цитронкиназу, играет роль в регуляции развития нервной системы, делении и дифференцировке клеток. Снижение экспрессии белка *CIT* ассоциировано с рядом заболеваний нервной системы, в том числе с первичной микроцефалией, биполярным расстройством и шизофренией. У пациентов с рассеянным склерозом (РС) полиморфизм rs7308076 *CIT* показан как влияющий на эффективность терапии препаратами интерферона-бета. Цель исследования – определить ассоциации однонуклеотидного полиморфизма rs7308076 гена *CIT* с клиническими проявлениями рассеянного склероза у больных в Пермском крае. Исследование проведено на выборке из 204 больных РС и 80 здоровых добровольцах. Клиническая оценка проведена по шкалам EDSS (Expanded Disability Status Scale), SCRIPPS, FSS (Fatigue Severity Score), Arm-index, генетическое исследование – методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. В исследуемой выборке не выявлено влияния генотипов полиморфизма rs7308076 *CIT* на развитие РС, выраженность большинства клинических проявлений и скорость прогрессирования данного заболевания. Установлена ассоциация степени поражения пирамидной системы с генотипом C/T у пациентов, получающих интерфероны-бета, и генотипом C/C у больных, принимающих глатирамера ацетат.

Ключевые слова: рассеянный склероз, однонуклеотидный полиморфизм, клинико-генетические ассоциации, интерферон-бета, *CIT*

INFLUENCE OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM rs7308076 OF *CIT* GENE ON CLINICAL MANIFESTATIONS SEVERITY OF MULTIPLE SCLEROSIS

Selyanina N.V.¹, Arbuzova E.E.¹, Krivtsov A.V.²

¹E.A.Vagner Perm State Medical University, Perm, e-mail: nselyanina@mail.ru;

²FBSI FSC Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, e-mail: kriptov@fcrisk.ru

The *CIT* gene (citron rho-interacting serine / threonine kinase) which encodes citronkinase, plays a role in regulating the development of the nervous system, cell division and differentiation. Reduced expression of *CIT* protein is associated with a number of diseases of the nervous system, including primary microcephaly, bipolar disorder and schizophrenia. In patients with multiple sclerosis (MS), the rs7308076 *CIT* polymorphism is shown as influencing on effectiveness interferon-beta therapy. The goal of the study was to identify associations of rs7308076 single nucleotide polymorphism of the *CIT* gene with the clinical manifestations of multiple sclerosis in patients in Perm krai. The study was conducted on a sample of 204 patients with MS and 80 healthy volunteers. Clinical features were evaluated using EDSS (Expanded Disability Status Scale), SCRIPPS, FSS (Fatigue Severity Score), Arm-index scales; genetic research was performed by real-time polymerase chain reaction (PCR). In 204 examined MS people the effects of rs7308076 of *CIT* gene on the MS development, the severity of most clinical manifestations and the rate of its progression were not detected. The association of the severity of the pyramidal system damage was found with the C/T genotype in patients receiving interferon-beta and the C/C genotype in patients taking glatiramer acetate.

Keywords: multiple sclerosis, a single nucleotide polymorphism, clinical and genetic associations, interferon-beta, *CIT*

В настоящее время считается, что в патогенезе рассеянного склероза (РС) значимая роль отводится генетическим факторам. Установлено значение отдельных генов, а также их полиморфных участков в наследственной предрасположенности РС в различных этнических группах, однако даже в одной группе клинико-генетические данные могут быть

противоречивы [1]. В связи с этим изучение генетики РС не теряет своей актуальности, в том числе в Пермском крае, где констатирован средний уровень распространенности заболевания [2].

Основными генетическими факторами предрасположенности к РС считаются гены HLA-системы [1], в то же время участие и других, не связанных с иммунорегуляцией, генов в патогенезе РС показано в ряде исследований. Одним из таких генов является ген *CIT* (citron rho-interacting serine/threonine kinase), кодирующий цитронкиназу – участника деления и дифференцировки клеток. Цитронкиназа играет роль в развитии центральной нервной системы; совместно с белками члена семейства кинезинов, в частности Kinesin family member 14 (KIF14), локализуется в центральной части веретена и способствует эффективному цитокинезу [3]. Белок KIF14 в эксперименте был определен как фактор развития пороков центральной нервной системы, а также недостаточной миелинизации нервных волокон [4]. Однако достоверных данных о влиянии цитронкиназы на процессы миелинизации не получено. Снижение экспрессии белка *CIT* приводит к нарушению цитокинеза и достоверно ассоциировано с развитием аутосомно-рецессивной первичной микроцефалии [5]. Ряд полиморфизмов гена *CIT* связан с риском биполярного расстройства и шизофрении [6].

У пациентов с РС полиморфизм rs7308076 показан как влияющий на эффективность терапии препаратами интерферона-бета [7]. В исследовании S. Bourguiba-Nachemi [8], целью которого было определение влияния данного полиморфизма на риск развития РС у пациентов арабской популяции, не установлено достоверных различий генотипов в группе больных и контроле ($p > 0,05$).

Учитывая вовлеченность гена *CIT* в развитие структурной патологии центральной нервной системы, интерес представляет его изучение и у больных РС в различных популяциях, даже несмотря на недостаточность имеющихся данных.

Цель исследования – определить ассоциации однонуклеотидного полиморфизма rs7308076 гена *CIT* с клиническими проявлениями рассеянного склероза у больных в Пермском крае.

Материалы и методы исследования

Исследуемую группу составили 204 неродственных между собой пациента с достоверным диагнозом «рассеянный склероз». Критериями включения в исследование явились: рецидивирующе-ремиттирующий и вторично прогрессирующий тип течения РС; длительность заболевания с момента первых симптомов не менее 6 месяцев; отсутствие курсов кортикостероидной или цитостатической терапии за последние 6 месяцев, добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями

исключения явились другие дегенеративные заболевания нервной системы, первично-прогрессирующее течение РС, наличие сопутствующих онкозаболеваний, беременности, отказ от участия в исследовании.

Обследование проходило на базе Центра рассеянного склероза и отделения неврологии ГБУЗ ПК «Ордена “Знак почета” Пермская краевая клиническая больница».

Группу контроля составили 80 практически здоровых добровольцев, не имеющих родственников с диагнозом РС.

В ходе клинического осмотра выраженность клинических проявлений оценивалась с помощью шкалы функциональных систем Kurtzke, расширенной шкалы инвалидизации (Expanded Disability Status Scale, EDSS), шкалы неврологического статуса института Scripps, шкалы оценки функции рук Arm-index и шкалы тяжести астении Fatigue Severity Score (FSS) [9]. Скорость прогрессирования заболевания, рассчитанная как отношение балла EDSS к длительности заболевания (в годах), определялась как низкая при значении $\leq 0,25$ балла/год, умеренная $> 0,25$, но $\leq 0,75$ балла/год, или высокая $> 0,75$ балла/год [10].

Мощность исследования рассчитывалась при помощи онлайн-калькулятора GAS Power Calculator (http://csg.sph.umich.edu/abecasis/gas_power_calculator/index.html).

Генетический анализ проводился на образцах ДНК, полученных из цельной венозной крови больных РС методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), в реальном времени с использованием реакционной смеси для проведения ПЦР (ЗАО «Синтол», Россия), праймеров и зондов (Thermo Fisher Scientific, США) для полиморфизма rs7308076 гена *CIT*. Генетический анализ и обработка полученных данных методом аллельной дискриминации проводились с помощью детектирующего амплификатора CFX96 и программного обеспечения CFX Manager 2.1 (Biorad, США).

Статистическая обработка осуществлялась с использованием программного пакета Statistica 10,0 (Statsoft, США) с расчетом коэффициента корреляции Спирмена, критерия Манна–Уитни для независимых групп, а также критерия Краскела–Уоллиса при множественном сравнении. Анализ клинико-генетических ассоциаций проведен с помощью программного обеспечения SNPstats (Institut Català d’Oncologia, Испания). Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Проведение исследования одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России.

Результаты исследования и их обсуждение

Рассчитанная мощность данного исследования равнялась 0,9, что является приемлемой и позволяет судить о достоверности полученных данных.

В группе пациентов с РС преобладали женщины (66,01%). Средний возраст выборки

составил $40,02 \pm 10,82$ года. Средний возраст дебюта заболевания обследуемых составил $29,47 \pm 9,22$ года. Длительность заболевания варьировала в пределах от 6 месяцев до 28 лет, равняясь в среднем $10,55 \pm 6,91$ года.

У большинства больных заболевание носило ремиттирующий характер (83,9%), в остальных случаях – вторично-прогредиентный.

По виду получаемого лечения пациенты распределились следующим образом: 56,31% (n=116) – препараты интерферона-бета, 16,99% (n=35) – глатирамера ацетат, 13,59% (n=28) – натализумаб, 4,37% (n=9) – другие препараты, 8,74% (n=18) – терапию не получали или прекратили прием лекарственных средств не менее чем за 6 месяцев до момента участия в исследовании.

Исследуемая группа характеризовалась умеренной степенью инвалидизации, среднее значение шкалы EDSS составило $4,16 \pm 1,66$ балла. Большинство пациентов (57,28%) имели умеренную скорость прогрессирования РС, средняя скорость прогрессирования заболевания составила $0,66 \pm 0,79$ балла/год.

Выявлена корреляционная связь средней силы между параметром EDSS и возрастом пациента ($R=0,44$; $p=0,00000$), EDSS и длительностью заболевания ($R=0,46$; $p=0,00000$). Общий балл EDSS коррелирует с выраженностью симптомов по каждой функциональной системе шкалы Kurtzke: функциями ствола головного мозга ($R=0,7$; $p=0,00000$), пирамидной системы ($R=0,83$; $p=0,00000$), мозжечка ($R=0,8$; $p=0,00000$), изменением чувствительности ($R=0,59$; $p=0,00000$), контролем тазовых функций ($R=0,74$; $p=0,00000$).

Среднее значение по шкале неврологического статуса Scripps составило $63,89 \pm 18,08$ балла, что обратно пропорционально баллу EDSS ($R=-0,87$; $p=0,000000$), а также оценке пирамидной ($R=-0,84$; $p=0,00000$), координаторной ($R=-0,77$; $p=0,00000$), чувствительной ($R=-0,61$; $p=0,00000$) функциональных систем, функциям ствола головного мозга ($R=-0,7$; $p=0,00000$), тазовым функциям ($R=-0,75$; $p=0,00000$) по шкале Kurtzke.

Средний балл по опроснику тяжести астении FSS составил $4,05 \pm 1,73$. Балльная оценка шкалы FSS коррелировала с результатом EDSS ($R=0,44$; $p=0,000000$), оценкой пирамидной системы ($R=0,39$; $p=0,000000$), функций ствола ($R=0,39$; $p=0,000000$), тазовых органов ($R=0,41$; $p=0,000000$), корковыми функциями ($R=0,46$; $p=0,000000$), а также баллом Arm-index ($R=0,34$; $p=0,000001$).

Шкала оценки функции рук Arm-index использовалась в качестве дополнения к оценке двигательных нарушений. Балл по Arm-index варьировал от 0 до 5, составляя в среднем $1,25 \pm 0,81$. Выраженность нарушений функции рук коррелировала со значением балла EDSS ($R=0,70$, $p=0,000000$), длительностью заболевания ($R=0,30$, $p=0,000006$), а также оценкой пирамидной ($R=0,65$; $p=0,000000$) и координаторной ($R=0,64$; $p=0,000000$)

функциональных систем.

Достоверных различий выраженности клинических проявлений по баллам EDSS ($U=4449,0$; $p=0,44$), Scripps ($U=4719,0$; $p=0,92$), Arm-index ($U=4575,0$; $p=0,64$), FSS ($U=3942,5$; $p=0,05$), а также скорости прогрессирования ($U=4437,0$; $p=0,47$) в группах, выделенных по полу, не получено.

В группе больных, имеющих вторично-прогредиентный тип течения РС, отмечена более выраженная степень поражения нервной системы по изучаемым шкалам (рис. 1).

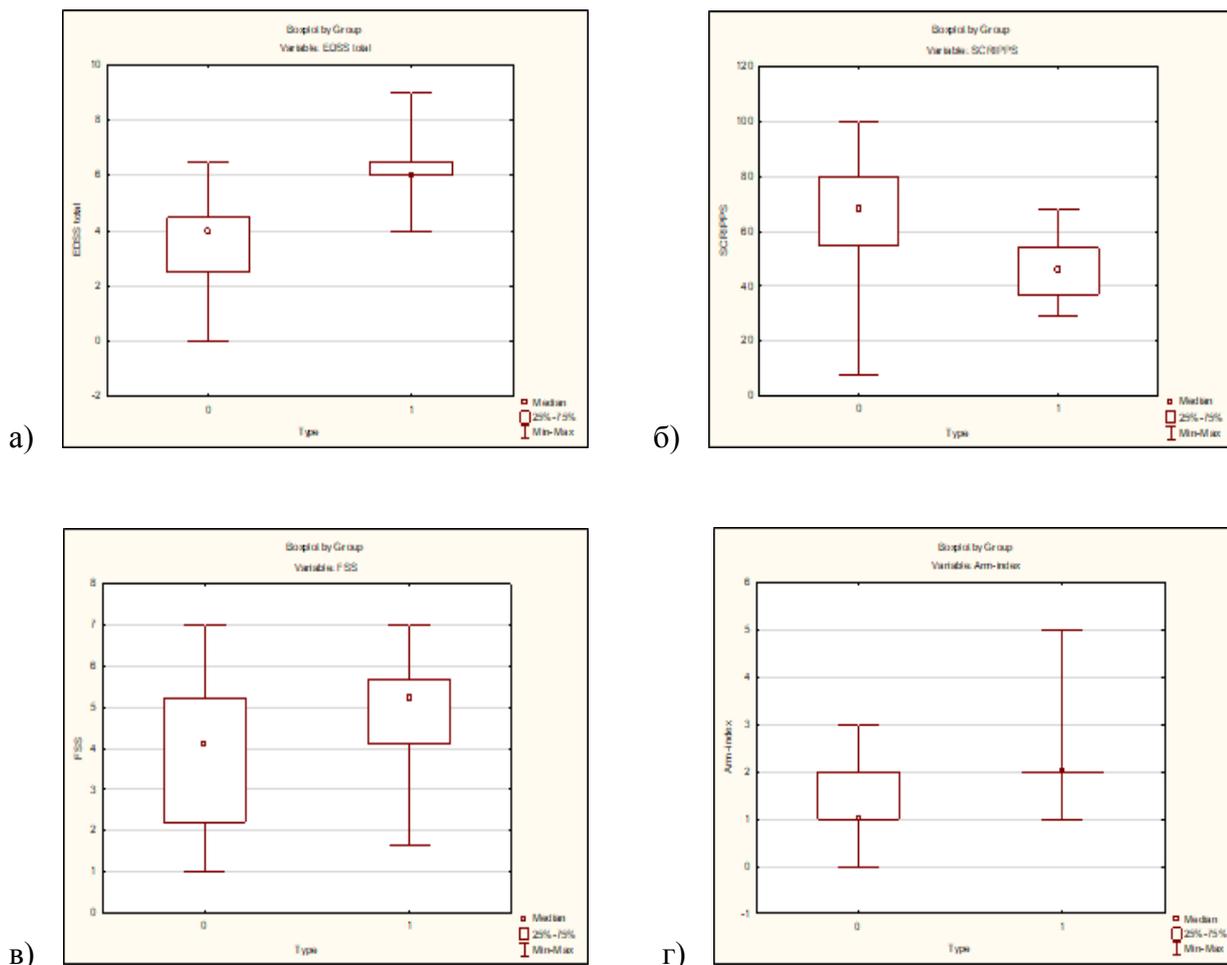


Рис. 1. Степень выраженности поражения нервной системы в зависимости от типа течения РС (0 – рецидивирующе-ремиттирующий тип, 1 – вторично-прогрессирующий тип): а) по шкале EDSS ($p=0,00000$); б) по шкале Scripps ($p=0,00000$); в) по шкале FSS ($p=0,003$); г) по шкале Arm-index ($p=0,000002$)

В группах в зависимости от типа течения РС не установлено различий в значении скорости прогрессирования РС ($p=0,41$) (рис. 2).

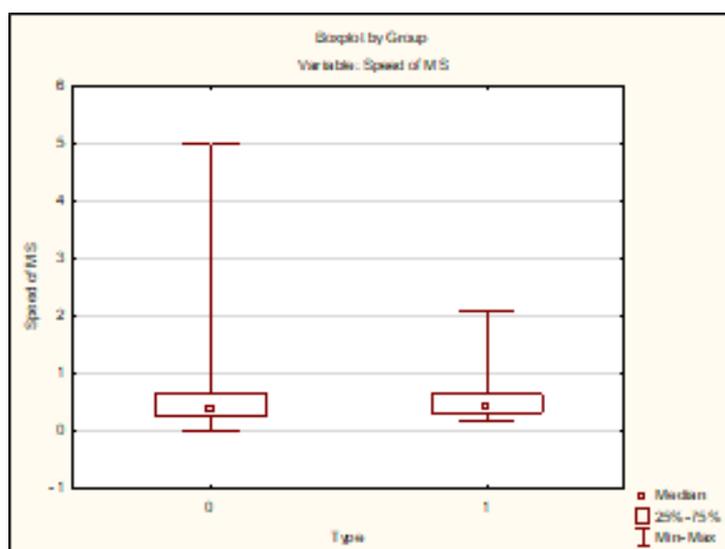


Рис. 2. Значение скорости прогрессирования РС в зависимости от типа течения (0 – рецидивирующе-ремиттирующий тип, 1 – вторично-прогрессирующий тип)

Генетическое исследование по полиморфному маркеру rs7308076 *CIT* в группе больных РС показало распределение частоты генотипов С/С, С/Т, Т/Т – 40,68%, 48,04% и 11,28% соответственно, распределение аллелей С – 64,7% и Т – 35,3%.

В группе контроля также преобладал гетерозиготный генотип (50%), генотип С/С выявлен у 43,75% лиц, Т/Т – у 6,25%. Как и в исследуемой группе, у здоровых лиц чаще встречался аллель С (68,75%).

Достоверных различий генотипов между группой больных РС и контрольной группой получено не было, что представлено в таблице.

Не определена достоверная связь между генотипами полиморфизма rs7308076 *CIT* и баллом EDSS ($p=0,65$), FSS ($p=0,79$), Scripps ($p=0,95$), Arm-index ($p=0,47$) в общей выборке, а также в группах, выделенных по половому признаку.

Также в исследовании не определено зависимости скорости прогрессирования РС от генотипов rs7308076 *CIT* ($p=0,7$).

Не установлено достоверной связи доминирующего аллеля rs7308076 с выраженностью клинической симптоматики по шкалам EDSS ($p=0,12$), Scripps ($p=0,23$), FSS ($p=0,52$), Arm-index ($p=0,34$).

Несмотря на ранее выявленную связь полиморфизма rs7308076 *CIT* с эффективностью терапии препаратами интерферона-бета, в настоящем исследовании определена достоверная связь выраженности пирамидной симптоматики с генотипом С/С в группе пациентов, получающих глатирамера ацетат (OR 0,66, 95% CI 0,08 – 1,24), и генотипа С/Т у пациентов, получающих препараты интерферона-бета (OR 0,45, 95% CI 0,03 – 0,87), $p=0,026$. Корреляций генотипа с общим баллом EDSS, FSS, Arm-index, Scripps в зависимости от

получаемого препарата не получено.

Ассоциация носительства аллелей полиморфизма rs7308076 гена *CIT* с наличием
 рассеянного склероза

Модель наследования	Генотип	Контрольная группа, n (%)	Исследуемая группа, n (%)	OR (95% CI)	p
Кодоминантная	C/C	35 (43,8%)	83 (40,7%)	1,00	0,41
	C/T	40 (50%)	98 (48%)	1,03 (0,60–1,77)	
	T/T	5 (6,2%)	23 (11,3%)	1,94 (0,68–5,51)	
Доминантная	C/C	35 (43,8%)	83 (40,7%)	1,00	0,64
	C/T-T/T	45 (56,2%)	121 (59,3%)	1,13 (0,67–1,91)	
Рецессивная	C/C-C/T	75 (93,8%)	181 (88,7%)	1,00	0,18
	T/T	5 (6,2%)	23 (11,3%)	1,91 (0,70–5,20)	
Сверх-доминантная	C/C-T/T	40 (50%)	106 (52%)	1,00	0,77
	C/T	40 (50%)	98 (48%)	0,92 (0,55–1,55)	

Таким образом, исследование, направленное на выявление ассоциаций однонуклеотидного полиморфизма rs7308076 гена *CIT* и выраженности клинических проявлений рассеянного склероза, не показало значимых результатов на примере выборки больных Пермского края. Несмотря на ранее продемонстрированное влияние данного полиморфизма на эффективность терапии препаратами интерферона-бета, достоверной связи с клиническими показателями, в том числе скоростью прогрессирования, не получено. Выявлена ассоциация генотипа C/T с выраженностью пирамидной симптоматики у пациентов, получающих препараты интерферона-бета, а также генотипа C/C – у получающих глатирамера ацетат.

Выводы

1. В исследуемой выборке не выявлено влияния генотипов полиморфизма rs7308076 *CIT* на развитие рассеянного склероза, выраженность клинических проявлений и скорость его прогрессирования.
2. Впервые установлена ассоциация степени поражения пирамидной системы с генотипом C/T rs7308076 *CIT* у пациентов, получающих препараты интерферона-бета.
3. Установлена корреляция генотипа C/C у больных, принимающих глатирамера ацетат, с выраженностью поражения пирамидной системы.

Список литературы

1. Бойко А.Н., Гусев Е.И. Достижения в изучении проблем рассеянного склероза (обзор) // Доктор. Ру. 2012. № 5. С. 9-15.
2. Желнин А.В. Эпидемиологические и клинические особенности рассеянного склероза в пермском крае // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. № 9 (1). С. 69-71.
3. Gruneberg U., Neef R., Li X., Chan E.H.Y., Chalamalasetty R.B., Nigg E.A., Barr F.A. KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*. 2006. Vol. 172. No 3. P. 363-372. DOI: 10.1083/jcb.200511061.
4. Fujikura K., Setsu T., Tanigaki K., Abe T., Kiyonari H., Terashima T., Sakisaka T. *Kif14* Mutation Causes Severe Brain Malformation and Hypomyelination. *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8. No 1. e53490. DOI: 10.1371/journal.pone.0053490.
5. Basit S., Al-Harbi K.M., Alhijji S.A.M., Albalawi A.M., Alharby E., Eldardear A., Samman M.I. *CIT*, a gene involved in neurogenic cytokinesis, is mutated in human primary microcephaly. *Hum Genet*. 2016. Vol. 135. P. 1199. DOI: 10.1007/s00439-016-1724-0.
6. Nicodemus K.K., Callicott J.H., Higier R.G., Luna A., Nixon D.C., Lipska B.K., Vakkalanka R., Giegling I., Rujescu D., St Clair D., Muglia P., Shugart Y.Y., Weinberger D.R. Evidence of statistical epistasis between DISC1, CIT and NDEL1 impacting risk for schizophrenia: biological validation with functional neuroimaging. *Hum Genet*. 2010. Vol. 127. P. 441. DOI: 10.1007/s00439-009-0782-y.
7. Comabella M., Craig D.W., Morcillo-Suárez C., Río J., Navarro A., Fernández M., et al. Genome-wide Scan of 500 000 Single-Nucleotide Polymorphisms Among Responders and Nonresponders to Interferon Beta Therapy in Multiple Sclerosis. *Arch Neurol*. 2009. Vol. 66. No 8. P. 972-978. DOI: 10.1001/archneurol.2009.150.
8. Bourguiba-Hachemi S., Ashkanani T.K., Kadhem F.J., Almawi W.Y., Alroughani R., Fathallah M.D. ZFAT gene variant association with multiple sclerosis in the Arabian Gulf population: A genetic basis for gender-associated susceptibility. *Mol Med Rep*. 2016. Vol. 14. no 4. P. 3543-3550. DOI: 10.3892/mmr.2016.5692.
9. Шмидт Т.Е., Яхно Н.Н. Рассеянный склероз: руководство для врачей. 5-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2016. 272 с.
10. Гончарова З.А. Клинико-эпидемиологическая характеристика рассеянного склероза (проспективное 20-летнее исследование): автореф. дис. ... докт. мед. наук. Иваново, 2013. 40 с.