

РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ IL17A И ЦИТОХРОМА P450 ПРИ БОЛЕЗНИ ГРЕЙВСА



Кодиров Аваз Эшмаматович¹, Зиядуллаев Шухрат Худойбердиевич¹, Ким Антонина Амуровна¹, Камалов Зайнитдин Сайфутдинович², Рузибакиева Малика Руслановна², Олимжонова Фарангиз Жасур кизи³

1 - Самаркандский государственный медицинский университет, Республика Узбекистан, г. Самарканд;

2 - Институт иммунологии и геномики человека Академии Наук Республики Узбекистан, г. Ташкент;

3 - Ташкентский государственный стоматологический институт, Республика Узбекистан, г. Ташкент

ГРЕЙВС КАСАЛЛИГИДА IL17A ГЕНЛАРИ ВА P450 ЦИТОХРОМИ ПОЛИМОРФ ТУРЛАРИНИНГ АҲАМИЯТИ

Қодиров Аваз Эшмаматович¹, Зиядуллаев Шухрат Худойбердиевич¹, Ким Антонина Амуровна¹, Камалов Зайнитдин Сайфутдинович², Рузибакиева Малика Руслановна², Олимжонова Фарангиз Жасур кизи³

1 – Самарканд давлат тиббиёт университети, Ўзбекистон Республикаси, Самарканд ш.;

2 – Ўзбекистон Республикаси Фанлар Академияси одам иммунологияси ва геномикаси институти, Тошкент ш.;

3 – Тошкент давлат стоматология институти, Ўзбекистон Республикаси, Тошкент ш.

ROLE OF IL17A AND CYTOCHROME P450 POLYMORPHIC VARIANTS IN GRAVES DISEASE

Kodirov Avaz Eshmamatovich¹, Ziyadullaev Shukhrat Khudoyberdievich¹, Kim Antonina Amurovna¹, Kamalov Zainitdin Sayfutdinovich², Ruzibakieva Malika Ruslanovna², Olimjonova Farangiz Jasur kizi³

1 - Samarkand State Medical University, Republic of Uzbekistan, Samarkand;

2 - Institute of Immunology and Human Genomics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent;

3 - Tashkent State Dental Institute, Republic of Uzbekistan, Tashkent

e-mail: info@sammu.uz

Резюме. Диффуз токсик буқоқ катталарда жуда кенг тарқалган, болаликда нисбатан кам учрайди, аммо жуда жиддий касаллик. ДТБ патогенезида етакчи рол иммунитет тизимининг номуносиблиги билан боғлиқ бўлиб, бу қалқонсимон без хужайраларининг аутоиммун зарарланишига асос бўлган аутоантителоларининг шаклланиши устидан иммун назоратининг бузилишига олиб келади. Ушбу тадқиқотда Грейвс касаллиги билан оғриган беморларда IL-17A генининг G-197A (rs 2275913) полиморф минтақасининг аллел ва генотип частоталарининг тарқалиши ўрганилди ва касалликнинг ривожланишига қўйган ҳиссаси аниқланди. Аҳоли назорати гуруҳига қалқонсимон без патологияси бўлмаган 66 донор киритилган. IL-17A иммун жавоб генининг (rs 2275913) полиморф ҳудудини генотиплаш полимераза занжири реакцияси (ПЗР) орқали аллелга хос праймерлар ва агароз желлида реакция маҳсулотларини электрофоретик аниқлаш орқали амалга оширилди. Бизнинг натижаларимиздан ДТБ ривожланиши учун хавф белгиси А аллели ва гомозигот АА генотипидир. А197 аллелининг сезиларли ўсиши диффуз токсик буқоқ каби касалликнинг патогенезида тизимли яллиғланиш реакцияларининг иштирокини тасдиқлайди.

Калит сўзлар: IL17A генлари, P450 цитохроми, Грейвс касаллиги.

Abstract. Diffuse toxic goiter is quite common in adults, relatively rare in childhood, but quite a serious disease. The leading role in the pathogenesis of DTG is given to the imbalance of the immune system, which leads to impaired immune control over the formation of autoantibodies, which underlies the autoimmune damage to thyroid cells. In the present study, the distribution of allele and genotype frequencies of the polymorphic region G-197A (rs2275913) of the IL-17A gene in patients with Graves' disease was studied and the contribution to the development of the disease was established. The population control group included 66 donors without thyroid pathology. Genotyping of the polymorphic region of the IL-17A immune response gene (rs2275913) was carried out by polymerase chain reaction (PCR) with allele-specific primers and electrophoretic detection of reaction products in agarose gel. From our results, the risk marker for the devel-

Актуальность. Патология щитовидной железы (ЩЖ) является одним из самых распространенных заболеваний, опережая даже сахарный диабет. Самая высокая распространённость среди заболеваний щитовидной железы приходится на диффузный токсический зоб (ДТЗ), или болезнь Грейвса [1,2].

Ведущая роль в патогенезе ДТЗ отводится дисбалансу иммунной системы, которая приводит к нарушениям иммунного контроля за формированием аутоантител, что и лежит в основе аутоиммунного поражения клеток ЩЖ [3,4]. Выявление генетических ассоциаций с болезнью ДТЗ обосновано, взаимосвязанность, а также главная значимость генов МНС, гена сериновойэстеразы цитотоксических Т-лимфоцитов, а также гена антагониста рецептора интерлейкина-1 развитие ДТЗ. В исследуемых работах было выявлено негативная взаимодействие по выявлению полиморфного маркера His60Arg, ген, который шифрует 3 субъединицу функциональной протеосомы LMP2, а также иным полиморфным маркером Pro52Thr, ген, который шифрует интероцептор тиреотропина вместе с ДТЗ [5,6]. Кроме того, изучения связи распределения аллелей, а также генотипов в группе здоровых, а также пациентов с ДТЗ, полиморфного микросателлитного маркера, в интроне 2 антогониста рецептора ИЛ-1, были выявлены отличия в частоте встречаемости аллеля 2 и генотипов 2/4 также 4/4.

Одну из главных ролей в изучении генетической предрасположенности к развитию АИЗ ЩЖ является наличие данной патологии в семейном анамнезе [7,8]. Проведенные исследования по геномному скринингу, обнаружили гены кандидаты предрасположенности к АИЗ 3-х видов: тиреоидспецифические гены, гены комплекса HLA, не-HLA иммунорегуляторные гены. К последней группе принадлежат гены *CTLA4*, *PTPN22* [9,10]. Аллель *CTLA4* кодирует трансмембранный регуляционный протеин, который экспрессируется на активированных Т-клетках. *CTLA4* вместе с *CD28* вместе с его лигандом *B7* на АПК влияет на активацию Т-клеток, а также представляется важным звеном для устойчивого взаимодействия Т-клеток и АПК. В ряде исследований на европеоидной, а также азиатской популяции показана взаимосвязь однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) A49G гена *CTLA4* с выработкой антител к составляющим ткани ЩЖ, восприимчивостью к ДТЗ, а также АИТ [6,11].

Ген интерлейкина-17 (IL-17) впервые был найден в кДНК Т-клеток мыши в 1993 году. Белок вначале был назван цитотоксическим Т-

лимфоцит-ассоциированным антигеном 8 (CTLA-8), поскольку его аминокислотная последовательность сильно отличалась от других известных на тот момент цитокинов, но имела высокую гомологию (57%) с открытой рамкой считывания Т-лимфотропного вируса *Herpesvirus saimiri* [12]. В 1995 году в связи с открытием специфического рецептора к этому белку, он был отнесен к классу интерлейкинов [13]. Годом позже было показано, что при ревматоидном артрите IL-17 индуцирует синтез других цитокинов (IL-6 и IL-8) в синовиоцитах [14]. Эти исследования явились началом изучения роли IL-17 при развитии иммуновоспалительных заболеваний. IL-17 играет ключевую роль в защите организма от внеклеточных бактериальных и грибковых инфекций [15]. Однако чрезмерная продукция этого белка ассоциирована с иммуновоспалительными аутоиммунными заболеваниями (например, псориаз, псориазный артрит, ревматоидный артрит, болезнь Бехтерева-Штрюмпелля-Мари, системная красная волчанка) [16].

Ферменты группы *CYP3A5* принимают участие в метаболизме примерно 60% всех лекарственных препаратов и отвечают за реализацию лекарственных эффектов практически во всех случаях. Поэтому многие генетические исследования *CYP3A5* связаны с изучением влияния полиморфизмов на эффективность терапии при различных заболеваниях: артериальной гипертонии, инфаркте миокарда, раке молочной железы [17,18]. Как известно, исследуемый полиморфизм *CYP3A5* (A6986G, rs776746) исследуется не только в области фармакогенетического тестирования, но и может отражать предрасположенность к различным заболеваниям.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явилось изучить распределение частот аллелей и генотипов полиморфного участка G-197A (rs2275913) гена *IL-17A* и A6986G (rs776746) гена *CYP3A5* у пациентов с болезнью Грейвса и установить вклад в развитии заболевания.

Материалы и методы исследования. Основную группу составили 97 больных с болезнью Грейвса. Группа обследованных состояла из лиц, наблюдавшихся на кафедре эндокринологии Самаркандского государственного медицинского университета. В исследуемую группу контроля вошли 66 донора без патологии щитовидной железы.

Материалом для выделения ДНК служила венозная кровь из локтевой вены (для забора крови использовались вакутайнеры Beckton-

Dickinson) с антикоагулянтом/консервантом 15% трикалийным EDTA (Ethenedianin-tetra acetic acid). Кровь для дальнейшей обработки могла сохраняться до 24 часов при температуре не выше +4°C. Для получения геномной ДНК использовали двухэтапный метод лизиса клеток крови. Дальнейшая очистка лизатов лейкоцитарной массы основана на методе спиртово-солевой обработки по S. Miller и соавт. (1988) в модификации, предложенной лабораторией Стенфордского Университета.

Генотипирование полиморфных участков генов иммунного ответа и цитохрома P450 проведено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с аллель-специфичными праймерами (НПФ «Литех», Москва) и электрофоретической детекцией продуктов реакции в агарозном геле. Протестирован ОНП ИЛ-17 G-197A (rs2275913). Идентификацию продуктов амплификации и их распределение по отношению к маркеру длин проводили в ультрафиолетовом свете (310 нм) после электрофореза в течение 15 минут при напряжении 300 В (в обоих случаях пробег составил 3-4 см) и окрашивания бромистым этидием.

Распределение генотипов в исследуемых полиморфных локусах было изучено с использованием логистического регрессионного анализа и с проверкой на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Учитывали соответствие больных и лиц контрольной группы по полу и возрасту. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакетов программ Microsoft Excel, SISA9.17® и в статистическом программном пакете SISA, Arlequin 3.5.2. и ряда формул.

Результаты и обсуждение. В данном исследовании нами изучен характер распределения

частот аллелей и генотипов полиморфного варианта G-197A (rs2275913) гена ИЛ-17A у больных с ДТЗ. Как видно из полученных нами результатов, рисковым маркером для развития ДТЗ является аллель А и гомозиготный генотип АА (12,37% и 3,03% соответственно; OR = 4,518; 95% CI: 0.977 > 4.518 > 20.899; $\chi^2 = 4.365$ ($p = 0.03669$)).

Далее при сравнительном анализе генотипов GG, были выявлены достоверные различия между больными с ДТЗ и контрольной группой (51,55% и 72,7% соответственно; OR = 0,399; 95% CI: 0.204 > 0.399 > 0.781; $\chi^2 = 7.349$ ($p = 0.006709$)). При анализе гетерозиготного генотипа GA также были выявлены различия между частотой встречаемости у больных с ДТЗ и контрольной группой (36,08% и 24,24% соответственно; OR = 1,764; 95% CI: 0.877 > 1.764 > 3.549; $\chi^2 = 2,561$), однако они не достигали истинной значимости.

При исследовании полиморфного участка A6986G (rs776746) гена CYP3A5 генотип АА обнаружен был в 2,06% ($n = 2$), GA генотип встречался у 13,4% ($n = 13$), GG у 84,54% ($n = 82$) обследованных, частота встречаемости А аллеля составила 8,76% ($n = 17$), частота G аллеля – 91,24% ($n = 177$).

При анализе полученных результатов, было выявлено, что в данной выборке больных не было выявлено достоверных различий в частоте встречаемости аллелей и генотипов, в сравнении с практически здоровыми лицами. Так аллель А встречается с показателем OR=1,44, $\chi^2 = 0,735$, Wald 95% CI: 0.623 > 1.441 > 3.332. В свою очередь маркер G встречался реже в группе больных, по сравнению с практически здоровыми лицами (OR=0,694, $\chi^2 = 0,735$, Wald 95% CI: 0.3 > 0.694 > 1.605), однако различия не достигали истинной значимости. Для генотипа GG было характерно распределение подобное аллельному распределению в данной выборке исследуемых лиц.

Таблица 1. Распределение частот аллелей и генотипов гена ИЛ-17AG-197A у больных ДТЗ

Аллели и генотипы	Пациенты, n=97	Контроль, n=66	χ^2	OR (95% CI)
G	135-69,59%	112-84,85%	9.964 ($p=0.001596$)	1.39 > 2.447 > 4.309
A	59-30,41%	20-15,15%		
GG	50-51,55%	48-72,73%	7.349 ($p=0.006709$)	0.204 > 0.399 > 0.781
GA	35-36,08%	16-24,24%	2.561 ($p=0.109524$)	0.877 > 1.764 > 3.549
AA	12-12,37%	2-3,03%	4.365 ($p=0.03669$)*	0.977 > 4.518 > 20.899

Таблица 2. Распределение частоты встречаемости однонуклеотидного варианта CYP3A5 (A6986G, rs776746) в группе практически здоровых лиц и у пациентов с ДТЗ в узбекской популяции

Аллели и генотипы	Пациенты, n=97	Контроль, n=66	χ^2	OR (95% CI)
G	177-91,24%	135-93,75%	0.735 ($p=0.391261$)	0,694118 > 0.694 > 1,605
A	17-8,76%	9-6,25%		
GG	82-84,54%	64-88,89%	0.666 ($p=0.414463$)	0.273 > 0.683 > 1.712
GA	13-13,40%	7-9,72%	0.536 ($p=0.463958$)	0.542 > 1.437 > 3.807
AA	2-2,06%	1-1,39%	0.107 ($p=0.743197$)	0.133 > 1.495 > 16.811

GG генотип встречался чаще в группе здоровых по сравнению с группой пациентов с ДТЗ в 1,05 раз, тогда как генотип GA встречался реже в группе здоровых по сравнению с группой больных ДТЗ, но результат также не был достоверно значимым. Генотип AA, хотя и определяется чаще в группе больных ДТЗ в 1,48 раз, но тоже не достигал истинной значимости.

IL-17 стал важной терапевтической мишенью при лечении различных хронических воспалительных заболеваний человека. Наиболее изученными членами семейства являются IL-17A и IL-17F, которые могут существовать в виде гомодимеров или гетеродимера IL-17A/F [19,20]. Полиморфизм генов IL-17A и IL-17F активно исследуется в настоящее время. Актуальность таких работ обусловлена требованиями современной персонализированной медицины. Ведется поиск мутаций (генетических маркеров), связанных с предрасположенностью человека к тому или иному заболеванию, а также выясняются возможные причины неэффективности в ряде случаев антицитокиновой терапии. К настоящему времени найдено около полусотни вариантов полиморфизма одиночных нуклеотидов в генах IL-17A и IL-17F, однако, лишь в некоторых случаях исследован результат такой замены [21].

Полученные данные в настоящем исследовании по изучению распределения частот аллельных вариантов, генотипов и ассоциации SNPs гена цитокина IL-17A (G197A, rs2275913) с диффузным токсическим зобом могут быть использованы в качестве маркерных признаков генетической характеристики данного патологического состояния. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что аллельные варианты и генотипы полиморфного маркера CYP3A5 (A6986G, rs776746) не являются достоверно значимыми маркерами предрасположенности к развитию ДТЗ в данной выборке.

Заключение. Таким образом, достоверное повышение A197 аллели подтверждает вовлеченность системных воспалительных реакций в патогенез такого заболевания как диффузный токсический зоб.

Литература:

1. Рымар О.Д., Пьянкова А.К., Максимов В.Н., Мустафина С.В. Семейные случаи аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // *Клин.иэкспер. тиреолог.* – 2013. – Т. 9, №4. – С. 39-45.
2. Vanderpump M.P. The epidemiology of thyroid disease // *Brit. Med. Bull.* – 2011. – Vol. 99. – P. 39-51.
3. Витман А.П. Заболевания, связанные с аутоиммунитетом щитовидной железы: объяснения расширяющегося спектра //

Клин.эндокринолог. (Oxf.) – 2011. – Vol. 74. – P. 411-418.

4. Фаам Б., Данешпур М.С., Азизи Ф. и др. Связь между полиморфизмом генов ТПО и уровнем анти-ТПО в тегеранской популяции: TLGS // *Ген.* – 2012. – Т. 498, №1. – С. 116-119.
5. Никитин Ю.П., Рымар О.Д., Максимов В.Н. и др. Полиморфизм A49G гена цитотоксического Т-лимфоцит-связанного иммуноглобулина 4 (CTLA4), связь с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы в популяции Новосибирска // *Клин.иэкспер. тиреолог.* – 2008. – Т. 4, №4. – С. 41-45.
6. Ting W.H., Chien M.N., Lo F.S. et al. Association of cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) gene polymorphisms with autoimmune thyroid disease in children and adults: Case-control study // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, №4/ – P. e0154394.
7. Рымар О.Д., Пьянкова А.К., Максимов В.Н., Мустафина С.В. Семейные случаи аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // *Клин.иэкспер. тиреолог.* – 2013. – Т. 9, №4. – С. 39-45.
8. Чистяков Д., Савостанов К., Туракулов Р. Скрининг SNP в 18 позиционных генах-кандидатах, расположенных в локусе GD-1 на хромосоме 14q23 – q32, на предрасположенность к болезни Грейвса: исследование TDT // *Мол.генет.Метаб.* – 2004. – Vol. 83, №3. – P. 264-270.
9. Kucharska A.M., Wisniewska A., Popko K., Demkow U. Association between the polymorphism A/G at position 49 of exon 1 of the CTLA-4 gene and antithyroid antibody production in children with Hashimoto's thyroiditis // *Horm. Res. Paediatr.* – 2012. – Vol. 78, №2. – P. 67-72.
10. Tomer Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future // *Thyroid.* – 2010. – Vol. 20, №7. – P. 715-725.
11. Никитин Ю.П., Рымар О.Д., Максимов В.Н. и др. Полиморфизм A49G гена цитотоксического Т-лимфоцит-связанного иммуноглобулина 4 (CTLA4), связь с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы в популяции Новосибирска // *Клин.иэкспер. тиреолог.* – 2008. – Т. 4, №4. – С. 41-45.
12. Rouvier, E., Luciani, M.F., Mattéi, M.G., Denizot, F., and Golstein, P. (1993) CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimirigene. *J. Immunol.*, 150, 5445–5456.
13. Yao, Z., Fanslow, W.C., Seldin, M.F., Rousseau, A.-M., Painter, S.L., Comeau, M.R., Cohen, J.I., and Spriggs, M.K. (1995) Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*, 3, 811–821

14. Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J.J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., Das Mahapatra, B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J., and Lebecque, S. (1996) T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.*, 183, 2593–2603
15. Cypowyj, S., Picard, C., Maródi, L., Casanova, J.-L., and Puel, A. (2012) Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. *Eur. J. Immunol.*, 42, 2246–2254.
16. Beringer, A., Noack, M., and Miossec, P. (2016) IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting *Trends Mol. Med.*, 22, 230–241.
17. Минушкина, Л. О. Генетические факторы при гипертонической болезни: связь с особенностями течения, развитием осложнений, эффективностью терапии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.06 / Л. О. Минушкина; Каф. кардиологии и общ. терапии ФГУ «Учеб. -науч. мед. центр» Упр. делами Президента РФ, - М., 2008. - 48 с.,
18. Picard N., Djebli N., Sauvage F. L. et al. Metabolism of sirolimus in the presence or absence of cyclosporine by genotyped human liver microsomes and recombinant cytochromes P450 3A4 and 3A5 // *Drug. Metab. Dispos.* - 2007. - Vol. 35, № 3. - P. 350-355.
19. Onishi, R.M., and Gaffen, S.L. (2010) Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, 129, 311–321.
20. Reynolds, J.M., Angkasekwinai, P., and Dong, C. (2010) IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21, 413–423.
21. Gaffen, S.L. (2009) Structure and signaling in the IL-17 receptor family. *Nat. Rev. Immunol.*, 9, 556–567.

**РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ
IL17A И ЦИТОХРОМА P450 ПРИ БОЛЕЗНИ
ГРЕЙВСА**

*Кодиров А.Э., Зиядуллаев Ш.Х., Ким А.А., Камалов З.С.,
Рузибакиева М.Р., Олимжонов Ф.Ж.*

Резюме. Диффузный токсический зоб достаточно часто встречается у взрослых, относительно редкое в детском возрасте, но достаточно тяжелое заболевание. Ведущая роль в патогенезе ДТЗ отводится дисбалансу иммунной системы, которая приводит к нарушениям иммунного контроля за формированием аутоантител, что и лежит в основе аутоиммунного поражения клеток ЩЖ. В настоящем исследовании изучено распределение частот аллелей и генотипов полиморфного участка G-197A (rs2275913) гена ИЛ-17А у пациентов с болезнью Грейвса и установлен вклад в развитии заболевания. В группу популяционного контроля вошли 66 донора без патологии щитовидной железы. Генотипирование полиморфного участка гена иммунного ответа ИЛ-17А (rs2275913) проведено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с аллель-специфичными праймерами и электрофоретической детекцией продуктов реакции в агарозном геле. Из полученных нами результатов, рисковым маркером для развития ДТЗ является аллель А и гомозиготный генотип АА. Достоверное повышение А197 аллели подтверждает вовлеченность системных воспалительных реакций в патогенез такого заболевания как диффузный токсический зоб.

Ключевые слова: гены IL17A, цитохрома P450, болезнь Грейвса.