

Полиморфизм гена фактора роста сосудистого эндотелия *ФРСЭ -2578 А/С* в комбинации с полиморфизмами генов цитокинов среди пациентов с ревматоидным артритом

В.И. Коненков, М.А. Королев, А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев, Ю.Б. Убшаева

ФГБУ «НИИ
клинической
и экспериментальной
лимфологии» СО
РАМН, Новосибирск

Research Institute of
Clinical and
Experimental
Lymphology, Siberian
Branch, Russian
Academy of Medical
Sciences, Novosibirsk

Контакты: Виктор
Федорович Прокофьев
vf_prok@mail.ru

Contact: Viktor
Fedorovich Prokofyev
vf_prok@mail.ru

Поступила 19.03.12

Цель — изучение распределения генотипов гена фактора роста сосудистого эндотелия (ФРСЭ) и их комбинаций с генотипами других цитокинов среди больных ревматоидным артритом (РА) и здоровых лиц.

Материал и методы. Обследовано 509 женщин европеоидного происхождения из восточных регионов России, включая 374 здоровых в возрасте 23–64 лет и 135 больных РА в возрасте от 27 до 66 лет. Исследовался однонуклеотидный полиморфизм промоторного региона генов *ФРСЭ -2578 С/А*, фактора некроза опухоли α (*ФНО α*) -863 С/А, *ФНО α* -308 G/А, *ФНО α* -238 G/А, интерлейкина (*ИЛ*) 1 β -31 С/Т, *ИЛ4* -590 С/Т, *ИЛ6* -174 G/С, *ИЛ10* -1082 G/А и *ИЛ10* -592 А/С методом анализа полиморфизма длин рестриктивных фрагментов.

Результаты. Анализ частот генотипов *ФРСЭ* в сочетании с генотипами других цитокинов выявил ряд высоко достоверных генетических различий между группами здоровых и больных РА лиц. Среди комбинированных генетических признаков (КГП), частота которых достоверно повышена при РА, преобладают гетерозиготные генотипы СА в полиморфной позиции *ФРСЭ -2578 С/А*. Среди КГП, позитивно ассоциированных с РА, в состав которых входят гомозиготные варианты *ФРСЭ -2578*, преобладают генотипы АА, тогда как все 100% гомозиготных генотипов, частота которых значимо снижена при РА, соответствуют варианту СС. В состав КГП, частота которых изменена при РА, наряду с генотипами *ФРСЭ*, наиболее часто входят генотипы *ИЛ1 β* , *ИЛ4*, *ИЛ10*, *ИЛ6* и *ФНО α* .

Заключение. Для изучения патогенеза РА необходимо комплексное исследование роли генов факторов регуляции ангиогенеза и воспаления.

Ключевые слова: фактор роста сосудистого эндотелия, гены цитокинов, ревматоидный артрит.

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (*VEGF* -2578 A/C) GENE POLYMORPHISM IN COMBINATION WITH CYTOKINE GENE POLYMORPHISMS AMONG PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

V.I. Konenkov, M.A. Korolev, A.V. Shevchenko, V.F. Prokofyev, Yu.B. Ubshaeva

Objective: to study the distribution of the genotypes of the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene and their combinations with those of other cytokines among patients with rheumatoid arthritis (RA) and healthy individuals.

Subjects and methods. 509 Europeoid women from the eastern regions of Russia, including 374 healthy individuals aged 23–64 years and 135 RA patients aged 27–66 years, were examined. The single nucleotide polymorphism in the promoter region of the genes of *VEGF* -2578 C/A, tumor necrosis factor- α (*TNF- α*) -863 C/A, *TNF- α* -308 G/A, *TNF- α* -238 G/A, and interleukin (*IL*) 1 β -31 C/T, *IL4* -590 C/T, *IL6* -174 G/C, *IL10* -1082 G/A, and *IL10* -592 A/C was studied by restriction fragment length polymorphism analysis.

Results. Analysis of the frequency of the genotypes of *VEGF* in combination with other genotypes has revealed a number of highly significant genetic differences between the groups of healthy individuals and RA patients. Among the combined genetic signs (CGS), whose frequency is significantly increased in RA, there is a predominance of heterozygous CA genotypes at the polymorphic position of *VEGF* -2578 C/A. Among the CGS positively associated with RA, which include homozygous *VEGF* -2578 variants, there is a preponderance of AA genotypes whereas all 100% of the homozygous genotypes, whose frequency is significantly decreased in RA, correspond to the variant of CC. The CGS whose frequency is altered in RA along with *VEGF* genotypes most commonly include the genotypes of *IL1 β* , *IL4*, *IL10*, *IL6*, and *TNF- α* .

Conclusion. The pathogenesis of RA calls for comprehensive investigation of the role of the angiogenesis and inflammation regulation genes.

Key words: vascular endothelial growth factor, cytokine genes, rheumatoid arthritis.

Воспалительный процесс в синовиальной ткани при ревматоидном артрите (РА) сопровождается значительными изменениями ангиогенеза, проявляющимися как развитием паннуса, так и выраженной ишемией тканей. Тканевая гипоксия, в свою очередь, является мощным стимулом продукции целого ряда протеолитических ферментов, индуцирующих как деструкцию тканей, так и воспалительные изменения [1], сопровождающиеся повышенной выработкой фактора роста сосудистого эндотелия (ФРСЭ) [2].

ФРСЭ — семейство структурно близких между собой белков, которые, вместе с рецепторами (ФРСЭР), играют существенную роль в развитии и регуляции деятельности кровеносных и лимфатических сосудов. ФРСЭ подразделяют на ФРСЭ-А, ФРСЭ-В, ФРСЭ-С, ФРСЭ-Д, ФРСЭ-Е, плацентарные факторы роста (ПФР) 1 и 2, а также их лиганды: ФРСЭР1, -2 и -3. ФРСЭР — трансмембранные тирозинкиназные рецепторы, которые связывают лиганд ФРСЭ. ФРСЭР1 (Flt-1) и ФРСЭР2

(KDR/Flk-1) экспрессируются эндотелиальными клетками, в то время как ФРСЭР3 (Flt-4) — клетками лимфатического и сосудистого эндотелия. ФРСЭР2 отвечает преимущественно за ангиогенез и быстрый рост эндотелиальных клеток. Как правило, ФРСЭР имеют семь внеклеточных иммуноглобулин-подобных регионов, ответственных за закрепление ФРСЭ, и внутриклеточную тирозинкиназу [3].

При РА отмечено значительное повышение концентрации ФРСЭ как в сыворотке крови, так и в синовиальной жидкости, причем это повышение коррелирует и с клиническими признаками деструкции суставов, и с уровнем таких лабораторных показателей активности РА, как СОЭ и уровень С-реактивного белка (СРБ) [4, 5]. В культуре клеток показана значительно более высокая продукция ФРСЭ мононуклеарами пациентов с тяжелым РА, по сравнению с клетками пациентов с легким течением болезни [6]. Сходные данные были получены и в экспериментальной модели артрита, индуцированного коллагеном, у мышей. Тяжесть развивавшегося у них патологического процесса коррелировала с концентрацией ФРСЭ в синовиальной жидкости [7].

Наличие полиморфных участков в регуляторных регионах генов ФРСЭ свидетельствует об их влиянии на уровень экспрессии мРНК этих генов и уровень продукции самих белковых макромолекул. Исходя из этого наличие у пациентов с РА различных комбинаций генотипов полиморфных участков генов ФРСЭ может оказывать существенное воздействие на базовый уровень продукции и концентрации этого регуляторного фактора и в значительной мере влиять на течение и активность воспалительного процесса в синовиальной ткани.

Известно, что гены *ФРСЭ-А*, *-В*, *-С* и *ПФР* высокоомологичны и однонуклеотидные замены в промоторном регионе генов оказывают определенное влияние на уровень продукции белков. Аллели *-2578 С*, *-1154 G* и *-634 С* ассоциированы с высоким уровнем экспрессии ФРСЭ-А. Однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) ФРСЭ в позициях *-2578* и *-1154*, расположенных в пределах промоторного региона, влияет на синтез ФРСЭ-А стимулированными периферическими мононуклеарами [8]. Генотип *ФРСЭ-А -634 СС* связан с более высокой сывороточной концентрацией ФРСЭ у здоровых лиц и с повышенной продукцией ФРСЭ мононуклеарами, стимулированными липополисахаридами, по сравнению с *СG*- и *GG*-генотипами [9, 10]. Аллель *ФРСЭ +813 Т* связан со значительным снижением уровня ФРСЭ в плазме у здоровых мужчин. Аллель в позиции *ФРСЭ +813 Т* может уменьшать специфичность этого мотива, приводя к уменьшению экспрессии ФРСЭ. В 3'-нетранслируемом регионе гена выявлена полиморфная позиция в положении *+936*, влияющая на уровень ФРСЭ в плазме крови. Уровни ФРСЭ в плазме у носителей аллеля *ФРСЭ +936 Т* снижены [11, 12].

До сих пор практически отсутствуют данные о полиморфизме генов ФРСЭ среди пациентов европеоидного происхождения с РА. Сообщалось лишь об изменении частоты распределения ряда полиморфизмов этого гена среди пациентов монголоидного происхождения с РА, в частности среди корейцев [9]. Исходя из этого целью настоящего исследования стало изучение частоты некоторых аллелей и генотипов гена ФРСЭ среди европеоидных пациентов с РА, проживающих в восточных регио-

нах России, в сравнении с группой здоровых лиц. Нами также проведен анализ сочетаемости генотипов ФРСЭ с генотипами других интерлейкинов (ИЛ), ассоциированных с течением РА.

Материал и методы

В исследование включено 374 здоровых женщины европеоидного происхождения в возрасте от 23 до 64 лет и 135 женщин с достоверным РА в возрасте от 27 до 66 лет. Диагноз РА соответствовал критериям Американской коллегии ревматологов (ACR) 1987 г. Распределение больных по рентгенологическим стадиям по Steinbrocker было следующим: II стадия — 32,6%, III стадия — 41,5% и IV стадия — 25,9%. Преобладали больные со II и III функциональными классами (ACR, 1992 г.). Степень активности с учетом DAS28 определена как низкая и умеренная в 38,5% случаев, в 61,5% — как высокая. DAS28 в среднем составлял $5,58 \pm 1,22$. Пациенты находились на стабильной терапии базисными противовоспалительными препаратами. Работа проведена с соблюдением принципов добросовестности и конфиденциальности, получено разрешение локального этического комитета.

Генотипирование. Исследовался ОНП промоторного региона генов *ФРСЭ -863 С/А*, *ФНОα -308 G/А*, *ФНОα -238 G/А*, *ИЛ1β -31 С/Т*, *ИЛ4 -590 С/Т*, *ИЛ6 -174 G/С*, *ИЛ10 -1082 G/А* и *ИЛ10 -592 А/С*, *ФРСЭ -2578 С/А* [13, 14]. Генотипирование осуществляли методом анализа полиморфизма длин рестриктивных фрагментов.

Участки промоторного региона генов амплифицировали с использованием пары специфичных праймеров, затем продукты амплификации подвергали гидролизу соответствующими эндонуклеазами рестрикции («СибЭнзим», Новосибирск). Электрофорез проводили в 2% агарозном геле.

Статистика. При статистическом анализе результатов исследований использовали такие показатели, как частота генов, генотипов и их комбинаций [15], специфичность [16], отношение шансов (ОШ) с вычислением 95% доверительного интервала (ДИ). Расчет величины ОШ проводили по методу Вульфа–Холдейна, который допускает возможность определения ОШ по таблице 2×2 для случаев, когда ячейка в таблице имеет значение ноль [17, 18]. Частоту аллелей генов цитокинов вычисляли методом прямого подсчета по формуле: $f = n/2N$, где n — число случаев выявления данного аллеля (у гомозигот он учитывался дважды), $2N$ — удвоенное число обследованных. Частоту отдельных генотипов и их комбинаций определяли как процентное отношение индивидов, несущих генотип (комбинацию генотипов), к общему числу обследованных в группе по формуле: $f = n/N$, где n — число лиц, имеющих данный генотип (комбинацию), N — число обследованных. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга [15]. Достоверность различий частот распределения изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по критерию χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц [19].

Результаты

Проведенное исследование показало, что среди здоровых жительниц России европеоидного происхож-

дения и женщин, страдающих РА, аллельные варианты и генотипы полиморфного участка промоторного региона гена *ФРСЭ* распределены практически с одинаковой частотой. Характер их распределения в обеих группах соответствует другим европеоидным популяциям, например жителям Великобритании [20]. Аналогичные данные получены нами и при сопоставлении частот гомозиготных и гетерозиготного генотипов этого гена в точке полиморфизма -2578 А/С. Сходные результаты получены и корейскими исследователями, показавшими

отсутствие достоверных различий в частоте распространения аллелей и генотипов гена *ФРСЭ* в точке полиморфизма -2578 А/С между группами здоровых лиц и пациентов с РА [9].

Комплексный анализ частот генотипов *ФРСЭ* в данной точке полиморфизма в сочетании с генотипами целого ряда генов таких цитокинов, как гены *ИЛ1β* -311 С/Т, *ИЛ4* -590 С/Т, *ИЛ10* -592 А/С, *ИЛ6* -174 Г/С, и гена *ФНОα* в позициях -238 Г/С, -308 А/Г, -863 А/С с выраженной провоспалительной и проангиогенной активно-

Таблица 1 Комбинации генотипов *ФРСЭ* с генотипами цитокинов, ассоциированных с предрасположенностью к развитию РА

Полиморфизмы	Комбинации генотипов	РА			Контроль			ОШ	95% ДИ	p	СП
		n	N	%	n	N	%				
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-308	CA-GA	20	133	15,04	21	304	6,91	2,39	1,25–4,57	0,0116	93,09
<i>ФРСЭ</i> 2578:ИЛ10-592	CA-AA	9	132	6,82	2	294	0,68	10,68	2,28–50,16	0,0006	99,32
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ИЛ10-592	CA-CC-AA	9	132	6,82	2	294	0,68	10,68	2,28–50,16	0,0006	99,32
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-308:ИЛ1β-31	CA-GA-TT	12	133	9,02	9	299	3,01	3,20	1,31–7,78	0,0131	96,99
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-308:ИЛ10-592	CA-GG-AA	7	132	5,30	2	294	0,68	8,18	1,67–39,91	0,0048	99,32
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-238:ИЛ10-592	CA-GG-AA	8	132	6,06	2	282	0,71	9,03	1,67–43,15	0,0022	99,29
<i>ФРСЭ</i> 2578:ИЛ1β-31:ИЛ10-592	CA-TC-AA	4	132	3,03	0	289	0,00	20,28	1,08–379,41	0,0094	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ИЛ4-590:ИЛ10-592	CA-CC-AA	5	132	3,79	0	293	0,00	25,32	1,39–461,38	0,0027	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ИЛ6-174:ИЛ10-592	CA-GC-AA	5	132	3,79	1	287	0,35	11,26	1,30–97,36	0,0131	99,65
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-308:ИЛ6-174	CA-CA-GG-CC	6	133	4,51	2	297	0,67	6,97	1,39–34,99	0,0125	99,33
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-308:ИЛ10-592	CA-CC-GG-AA	7	132	5,30	2	294	0,68	8,18	1,67–39,91	0,0048	99,32
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-238:ИЛ1β-31	AA-CC-GG-TT	16	133	12,03	15	287	5,23	2,48	1,19–5,18	0,0164	94,77
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-238:ИЛ10-592	CA-CC-GG-AA	8	132	6,06	2	282	0,71	9,03	1,67–43,15	0,0022	99,29
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ИЛ1β-31:ИЛ10-592	CA-CC-TC-AA	4	132	3,03	0	289	0,00	20,28	1,08–379,41	0,0094	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ИЛ4-590:ИЛ10-592	CA-CC-CC-AA	5	132	3,79	0	293	0,00	25,32	1,39–461,38	0,0027	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ИЛ6-174:ИЛ10-592	CA-CC-GC-AA	5	132	3,79	1	287	0,35	11,26	1,30–97,36	0,0131	99,65
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-308:ФНО-238:ИЛ10-592	CA-GG-GG-AA	6	132	4,55	2	282	0,71	6,67	1,33–33,49	0,0147	99,29
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-308:ИЛ1β-31:ИЛ6-174	CA-GA-TT-GG	4	133	3,01	0	292	0,00	20,33	1,09–380,36	0,0093	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-308:ИЛ1β-31:ИЛ10-592	CA-GA-TT-CA	6	132	4,55	2	289	0,69	6,83	1,36–34,32	0,0135	99,31
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-308:ИЛ6-174:ИЛ10-592	CA-GA-GC-CA	7	132	5,30	3	287	1,05	5,30	1,35–20,84	0,0132	98,95
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-238:ИЛ4-590:ИЛ10-592	CA-GG-CC-AA	4	132	3,03	0	282	0,00	19,79	1,06–370,26	0,0100	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ИЛ1β-31:ИЛ4-590:ИЛ10-592	AA-TT-CC-CA	6	132	4,55	2	288	0,69	6,81	1,36–34,20	0,0136	99,31
<i>ФРСЭ</i> 2578:ИЛ4-590:ИЛ6-174:ИЛ10-592	CA-CC-GC-AA	4	132	3,03	0	286	0,00	20,07	1,07–375,49	0,0096	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-308:ФНО-238:ИЛ6-174	CA-CA-GG-GG-CC	6	133	4,51	2	285	0,7	6,69	1,33–33,58	0,0146	99,30
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-308:ФНО-238:ИЛ10-592	CA-CC-GG-GG-AA	6	132	4,55	2	282	0,71	6,67	1,33–33,49	0,0147	99,29
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-308:ИЛ1β-31:ИЛ4-590	CC-CA-GG-TT-CT	4	133	3,01	0	298	0,00	20,75	1,11–388,14	0,0088	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-308:ИЛ1β-31:ИЛ6-174	AA-CC-GG-TT-GC	10	133	7,52	7	292	2,40	3,31	1,23–8,90	0,0169	97,60
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-238:ИЛ4-590:ИЛ10-592	CA-CC-GG-CC-AA	4	132	3,03	0	282	0,00	19,79	1,06–370,26	0,0100	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ИЛ1β-31:ИЛ4-590:ИЛ10-592	CA-CA-TT-CT-CA	4	132	3,03	0	288	0,00	20,21	1,08–378,10	0,0095	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ИЛ4-590:ИЛ6-174:ИЛ10-592	CA-CC-CC-GC-AA	4	132	3,03	0	286	0,00	20,07	1,07–375,49	0,0096	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-308:ФНО-238:ИЛ6-174:ИЛ10-592	CA-GA-GG-GC-CA	7	132	5,30	3	275	1,09	5,08	1,29–19,96	0,0156	98,91
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-308:ИЛ4-590:ИЛ6-174:ИЛ10-592	CA-GA-CC-GC-CA	5	132	3,79	1	286	0,35	11,22	1,30–97,03	0,0133	99,65
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-238:ИЛ1β-31:ИЛ4-590:ИЛ10-592	AA-GG-TT-CC-CA	6	132	4,55	2	277	0,72	6,55	1,30–32,89	0,0157	99,28
<i>ФРСЭ</i> 2578:ИЛ1β-31:ИЛ4-590:ИЛ6-174:ИЛ10-592	CA-TT-CT-GG-CA	4	132	3,03	0	281	0,00	19,72	1,05–368,95	0,0101	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-308:ФНО-238:ИЛ1β-31:ИЛ4-590	CC-CA-GG-GG-TT-CT	4	133	3,01	0	287	0,00	19,98	1,07–373,87	0,0097	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-308:ФНО-238:ИЛ1β-31:ИЛ6-174	AA-CC-GG-GG-TT-GC	10	133	7,52	6	280	2,14	3,71	1,32–10,44	0,0126	97,86
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-308:ИЛ1β-31:ИЛ4-590:ИЛ10-592	CA-CA-GG-TT-CT-CA	4	132	3,03	0	288	0,00	20,21	1,08–378,10	0,0095	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-238:ИЛ1β-31:ИЛ4-590:ИЛ10-592	CA-CA-GG-TT-CT-CA	4	132	3,03	0	277	0,00	19,44	1,04–363,72	0,0105	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-308:ФНО-238:ИЛ4-590:ИЛ6-174:ИЛ10-592	CA-GA-GG-CC-GC-CA	5	132	3,79	1	275	0,36	10,79	1,25–93,29	0,0151	99,64
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-238:ИЛ1β-31:ИЛ4-590:ИЛ6-174:ИЛ10-592	CA-GG-TT-CT-GG-CA	4	132	3,03	0	270	0,00	18,95	1,0–354,57	0,0113	100,00
<i>ФРСЭ</i> 2578:ФНО-863:ФНО-308:ФНО-238:ИЛ1β-31:ИЛ4-590:ИЛ10-592	CA-CA-GG-GG-TT-CT-CA	4	132	3,03	0	277	0,00	19,44	1,04–363,72	0,0105	100,00

Примечание. Здесь и в табл. 2: n – число носителей комбинаций генотипов; N – общее число обследованных; % – частота комбинаций генотипов; ОШ – отношение шансов; 95% ДИ – 95% доверительный интервал для ОШ; СП – специфичность в %.

стью, выявил целый ряд высоко достоверных различий между сопоставляемыми группами здоровых и больных РА женщин. Анализ частот всех комбинаций исследуемого генотипа гена *ФРСЭ* в точке -2578 А/С с генотипами пяти исследуемых генов цитокинов: *ИЛ1β*, *ИЛ4*, *ИЛ6*, *ИЛ10* и *ФНОα* — проводился последовательно. При этом на первом этапе исследовались различия в частоте аллелей и генотипов самого гена *ФРСЭ*, на последующих этапах анализировалась частота комбинаций генотипов гена *ФРСЭ* с одним, двумя, тремя и большим числом исследуемых генотипов. В дальнейшем программа отбирает из всего большого массива данных комбинированные генетические признаки, частота которых достоверно различается между сравниваемыми группами здоровых и больных РА. После проверки характера распределения генотипов на соответствие распределению Харди–Вайнберга и вхождению ОШ в 95% ДИ проводится дополнительная селекция достоверности различий. Проведенный таким образом анализ выявил 103 комбинированных генетических признака, частота которых различна в группах здоровых и больных РА с заданным уровнем достоверности различий по двустороннему критерию Фишера ($p < 0,05$). Для 54 из них достоверность различий составила $p < 0,02$ (табл. 1, 2). Данному уровню достоверности различий соответствуют 54 комбинированных генетических признака. 41 из 54 встречается при РА достоверно чаще, чем в контроле, и 13 ассоциируются с определенной резистентностью к развитию РА, так как частота их среди пациентов с РА значительно снижена по сравнению со здоровыми лицами.

Анализ характера генотипов *ФРСЭ*, частота которых значительно различается у здоровых женщин и пациенток с РА, показал, что в обеих группах преобладают гетерозиготные варианты генотипа АС. Среди гомозиготных вариантов, частота которых повышена при РА, преобладают генотипы АА, тогда как все 100% гомозиготных генотипов, частота которых значимо снижена при РА, соответствуют только варианту СС. Согласно сложившимся представлениям, аллельные варианты СС гена *ФРСЭ* в точке полиморфизма -2578 ассоциированы с повышенным уровнем продукции [21]. Исходя из этого можно предположить, что для пациенток с РА характерно носительство генотипов, ассоциированных с более низким

базальным уровнем продукции этого проангиогенного фактора роста.

Обращает на себя внимание, что среди комбинаций генотипов *ФРСЭ* с генотипами *ИЛ6* есть все комбинации генотипов, частота которых снижена среди пациенток с РА. Гомозиготные варианты последнего гена в точке полиморфизма -174 G/С не выявлены ни в одном случае. Наряду с этим среди комбинаций генотипов *ФРСЭ/ИЛ6*, частота которых при РА высока, практически каждый третий генотип представлен гомозиготными вариантами СС или GG.

Сходные результаты получены нами и для гомозиготного генотипа ТТ гена *ИЛ1β*, который выявляется практически во всех комбинациях генотипов (94,11%), ассоциированных с предрасположенностью к развитию РА. Эти данные показывают, что предрасположенность к таким системным воспалительным заболеваниям, как РА, может быть во многом связана с особенностями цитокинового генотипа человека, поскольку генотип ТТ гена *ИЛ1β* ассоциирован с высоким уровнем продукции этого цитокина обладающего выраженными провоспалительными свойствами [22, 23].

При изучении частоты генотипов *ИЛ10* в точке полиморфизма -592 А/С среди комбинаций генотипов, включающих генотипы *ФРСЭ*, было установлено, что среди комбинированных генетических признаков, частота которых повышена среди пациентов с РА, преобладают гомозиготные варианты АА, тогда как среди комплексных признаков, частота которых при РА снижена, в 100% случаев установлен генотип СС. Аллель С в этом полиморфизме ассоциирован с высоким уровнем продукции *ИЛ10*, обладающего выраженной противовоспалительной активностью, поэтому наличие генотипа СС может препятствовать развитию системного воспаления при РА [24]. Наличие в геноме аллелей А этого гена может способствовать ослаблению противовоспалительной активности и формированию предрасположенности к развитию РА.

Обсуждение

Молекулярные механизмы участия *ФРСЭ* и *ФРСЭР-1/Flt-1* в патологическом ангиогенезе при РА пока изучены недостаточно. В эксперименте удаление

Таблица 2 Комбинации генотипов *ФРСЭ* с генотипами цитокинов, ассоциированных с резистентностью к развитию РА

Полиморфизмы	Комбинации генотипов	РА			Контроль			ОШ	95% ДИ	p	СП
		n	N	%	n	N	%				
<i>ФРСЭ</i> 2578: <i>ФНО</i> -863: <i>ИЛ1β</i> -31	СС-СС-ТТ	2	133	1,50	23	299	7,69	0,18	0,04–0,79	0,0122	92,31
<i>ФРСЭ</i> 2578: <i>ИЛ1β</i> -31: <i>ИЛ4</i> -590	СС-ТТ-СС	3	133	2,26	26	298	8,72	0,24	0,07–0,81	0,0119	91,28
<i>ФРСЭ</i> 2578: <i>ФНОα</i> -863: <i>ФНО</i> -308: <i>ИЛ1β</i> -31	СС-СС-GG-ТТ	1	133	0,75	18	299	6,02	0,12	0,02–0,90	0,0106	93,98
<i>ФРСЭ</i> 2578: <i>ФНОα</i> -308: <i>ИЛ1β</i> -31: <i>ИЛ6</i> -174	СА-GG-TC-GC	4	133	3,01	34	292	11,64	0,24	0,08–0,68	0,0030	88,36
<i>ФРСЭ</i> 2578: <i>ИЛ1β</i> -31: <i>ИЛ6</i> -174: <i>ИЛ10</i> -592	СА-TC-GC-CC	0	132	0,00	23	282	8,16	0,04	0,00–0,69	0,0001	91,84
<i>ФРСЭ</i> 2578: <i>ФНО</i> -863: <i>ИЛ1β</i> -31: <i>ИЛ6</i> -174: <i>ИЛ10</i> -592	СА-СС-TC-GC-CC	0	132	0,00	17	282	6,03	0,06	0,00–0,96	0,0022	93,97
<i>ФРСЭ</i> 2578: <i>ФНО</i> -308: <i>ФНО</i> -238: <i>ИЛ1β</i> -31: <i>ИЛ6</i> -174	СА-GG-GG-TC-GC	3	133	2,26	30	280	10,71	0,19	0,06–0,64	0,0029	89,29
<i>ФРСЭ</i> 2578: <i>ФНО</i> -308: <i>ИЛ1β</i> -31: <i>ИЛ4</i> -590: <i>ИЛ6</i> -174	СА-GG-TC-CC-GC	2	133	1,50	26	291	8,93	0,16	0,04–0,67	0,0028	91,07
<i>ФРСЭ</i> 2578: <i>ФНО</i> -308: <i>ИЛ1β</i> -31: <i>ИЛ6</i> -174: <i>ИЛ10</i> -592	СА-GG-TC-GC-CC	0	132	0,00	20	282	7,09	0,05	0,00–0,81	0,0008	92,91
<i>ФРСЭ</i> 2578: <i>ФНО</i> -238: <i>ИЛ1β</i> -31: <i>ИЛ6</i> -174: <i>ИЛ10</i> -592	СА-GG-TC-GC-CC	0	132	0,00	20	270	7,41	0,05	0,00–0,77	0,0004	92,59
<i>ФРСЭ</i> 2578: <i>ФНО</i> -308: <i>ФНО</i> -238: <i>ИЛ1β</i> -31: <i>ИЛ4</i> -590: <i>ИЛ6</i> -174	СА-GG-GG-TC-CC-GC	1	133	0,75	22	280	7,86	0,09	0,01–0,67	0,0021	92,14
<i>ФРСЭ</i> 2578: <i>ФНО</i> -308: <i>ФНО</i> -238: <i>ИЛ1β</i> -31: <i>ИЛ6</i> -174: <i>ИЛ10</i> -592	СА-GG-GG-TC-GC-CC	0	132	0,00	17	270	6,30	0,05	0,00–0,92	0,0012	93,70
<i>ФРСЭ</i> 2578: <i>ФНО</i> -863: <i>ФНО</i> -308: <i>ФНО</i> -238: <i>ИЛ1β</i> -31: <i>ИЛ4</i> -590: <i>ИЛ6</i> -174	СА-СС-GG-GG-TC-CC-GC	1	133	0,75	16	280	5,71	0,13	0,02–0,95	0,0161	94,29

области тирозинкиназы (ТК) из ФРСЭР1 снижало риск развития и тяжесть артрита у животных. Синовиальная гиперплазия, воспалительная инфильтрация, разрушение хрящевой и костной ткани были менее выраженными у ФРСЭР1 ТК-мышей по сравнению с диким типом. ФРСЭР1 ТК-дефицитные клетки костного мозга отличались снижением скорости дифференцировки. Кроме того, дифференцированные *in vitro* макрофаги характеризовались снижением фагоцитоза, секреции ИЛ6 и ФРСЭ-А. Эти результаты свидетельствуют о том, что ФРСЭР1 ТК влияет на пролиферацию гемопоэтических клеток и участвует в развитии хронического воспаления [25].

На ранней стадии РА воспаление может сопровождаться гипоксией синовиальной ткани, которая способствует увеличению секреции протеолитических ферментов, увеличению сосудистой проницаемости и повышению активности воспалительного процесса. Поскольку ФРСЭ является эндотелиальным клеточно-специфичным фактором ангиогенеза, потенциальная возможность увеличения его секреции может иметь большое значение для возникновения РА. Характерная для РА гипоксия суставов может стимулировать выработку ФРСЭ и ангиогенез. При РА сывороточная концентрация ФРСЭ выше, чем у здоровых, и коррелирует со стадией болезни и маркерами воспаления, такими как скорость оседания эритроцитов (СОЭ) и уровень СРБ. Уровень ФРСЭ в синовиальной жидкости при РА выше, чем при остеоартрозе. Высокий уровень РНК ФРСЭ и экспрессии белка отмечается в эндотелиальных клетках сосудов синовиальной оболочки при РА [4, 5, 26].

Гиперплазия синовиальной оболочки сопровождается формированием большого количества новых кровеносных сосудов. Показано, что генотипы ФРСЭ в точке полиморфизма +936 Т связаны с увеличенным риском развития РА. У пациентов с продолжительностью РА больше 12 лет частота генотипа СС была выше, чем частота генотипов СТ и ТТ. Возможно, продолжительность жизни у носителей аллеля Т ниже из-за развития кардиоваскулярных осложнений РА.

Анализ гаплотипов ФРСЭ, включающих позиции -2578 и -1154 промоторной области, -634 5'-нетранслируемого региона и +936 3'-нетранслируемого региона среди монголоидов, показал, что гаплотипы CGCT и AAGT (-2578, -1154, +634 и +936 соответственно) чаще встречались у пациентов с РА в возрасте до 43 лет [6].

При анализе результатов сравнительного исследования частоты комбинированных генетических признаков, включающих генотипы ФРСЭ, обращает на себя внимание высокая прогностическая значимость этих признаков, которая приближает их по информативности к так называемым

биологическим или генетическим маркерам предрасположенности или резистентности человека к развитию РА. Создается впечатление, что ревматологи приближаются к раскрытию прямых молекулярно-генетических механизмов этой генетической предрасположенности, о которой говорится уже более века, но которую никак не удалось перевести из разряда обоснованной гипотезы в реально применимый в клинической практике лабораторный показатель.

В результатах, представленных в табл. 1 и 2, фигурируют значения ОШ, которые выражаются двучисными величинами, что является уникальным для клинической генетики. Эти высокие значения вытекают из того, что представленные в таблицах частоты комбинированных генетических признаков не только статистически значимо различаются ($p < 0,02$). В целом ряде случаев анализируемые признаки полностью отсутствуют в значительной группе здоровых женщин ($n=374$) и широко распространены среди женщин, больных РА. Показатель специфичности по этим лабораторным признакам достигает 100%. Это говорит о том, что даже рекомендуемое в современной медицинской генетике значительное увеличение численности групп исследования вряд ли существенно может повлиять на общий результат. Представленные данные показывают, что определение таких показателей может быть использовано для оценки риска возникновения РА.

Заключение

Результаты настоящего исследования позволяют считать, что комбинации генотипов гена ФРСЭ в точке полиморфизма промоторного участка -2578 А/С с генотипами генов ИЛ1β -31 С/Т, ИЛ4 -590 С/Т, ИЛ10 -592 А/С, ИЛ6 -174 Г/С и гена ФНОα могут служить генетическими факторами, позволяющими разделить популяцию женщин России европейского происхождения на группы с высоким риском развития РА и с определенным уровнем конституциональной устойчивости к его развитию. Обращает на себя внимание наличие среди высоко достоверно различающихся по частоте генетических комбинаций большого числа гомозиготных генотипов генов цитокинов, ассоциированных с различным уровнем продукции цитокинов, которые обладают способностью регулировать интенсивность течения воспалительного процесса при РА и состоянии ангиогенеза.

Данное заключение свидетельствует о необходимости комплексного изучения роли семейства цитокинов и ростовых факторов с проангиогенной и провоспалительной активностью в патогенезе РА. Полученные при этом данные могут быть использованы при разработке персонализированного подхода к лечению РА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rothschild B.M., Masi A.T. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: a vascular hypothesis. *Semin Arthr Rheum* 1982;12:11–31.
2. Paleolog E.M. The vasculature in rheumatoid arthritis: cause or consequence? *Int J Exp Pathol* 2009;90:249–61.
3. Houck K.A. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806–14.
4. Sone H., Sakauchi M., Takahashi A. et al. Elevated levels of vascular endothelial growth factor in the sera of patients with rheumatoid arthritis correlation with disease activity. *Life Sci* 2001;69:1861–9.
5. Ballara S., Taylor P.C., Reusch P. et al. Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. *Arthr Rheum* 2001;44:2055–64.
6. Bottomley M.J., Webb N.J., Watson C.J. et al. Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF): specific up-regulation by tumour necrosis factor-α (TNF-α) in synovial fluid. *Clin Exp Immunol* 1999;117:171–6.

7. Miotla J., Maciewicz R., Kendrew J. et al. Treatment with soluble VEGF receptor reduces disease severity in murine collagen-induced arthritis. *Lab Invest* 2000;80:1195–205.
8. Shahbazi M., Fryer A.A., Pravica V. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:260–4.
9. Han S.W., Kim G.W., Seo J.S. et al. VEGF gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2004;43:1173–7.
10. Awata T., Inoue K., Kurihara S. A common polymorphism in the 5' untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:1635–9.
11. Krippel P., Langsenlehner U., Renner W. A common 936C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer* 2003;106:468–71.
12. Renner W., Kotschan S., Hoffmann C. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res* 2000;37:443–8.
13. Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., Шевченко А.В. и др. Полиморфизм генов цитокинов как один из факторов демографической структуры европейского населения Сибири. *Иммунология* 2011;2:60–5.
14. Banyasz I., Szabo S., Bokodi G. et al. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe preeclampsia. *Mol Hum Reprod* 2006;12:233–6.
15. Вейр Б. Анализ генетических данных: Дискретные генетические признаки. Пер. с англ. М.: Мир, 1995;400 с.
16. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. СПб.: ВМедА, 2002;266 с.
17. Певницкий Л.А. Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями. *Вестн АМН СССР* 1998;7:48–51.
18. Бабиц П.Н., Чубенко А.В., Лапач С.Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение третье. Отношение шансов: понятия, вычисление и интерпретация. *Укр мед журн* 2005;46:113–9.
19. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика, 1998;459 с.
20. The Allele Frequency Net Database. <http://www.allelefrequency.net>
21. Симбирцев А.С., Громова А.Ю. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления. *Цитокины и воспаление* 2005;1:3–11.
22. Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., Шевченко А.В. и др. Комплексный анализ полиморфизма в промоторных участках генов цитокинов ИЛ1 β , ИЛ6, ФНО α , ИЛ4, ИЛ10 в прогнозе эффекта от лечения ревматоидного артрита. *Мед иммунол* 2010;12:361–74.
23. Waterer G.W., Wunderink R.G. Genetic variability in the systemic inflammatory response. *Critical Care* 2003;7:308–14.
24. Mock C.C., Lanchbury J.S., Chan D.W. et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum* 1998;41:1090–5.
25. Murakami M., Iwai S., Hiratsuka S. et al. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* 2006;108:1849–56.
26. Lee S.S., Joo Y.S., Kim W.U. Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:321–4.