

Ассоциация полиморфизма гена интерлейкина 1 β с постменопаузальным остеопорозом у женщин в российской популяции

Крылов М.Ю., Никитинская О.А., Самаркина Е.Ю., Торопцова Н.В.

ФГБНУ Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой, Москва, Россия
115522 Москва, Каширское шоссе, 34А

V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia
34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522

Контакты: Михаил Юрьевич Крылов;
mekry@yandex.ru

Contact:
Mikhail Krylov;
mekry@yandex.ru

Поступила 16.02.15

Интерлейкин 1 β (ИЛ1 β) является потенциальным стимулятором костной резорбции. Антагонист рецептора ИЛ1 β (ИЛ1РА) представляет собой естественный ингибитор биологических эффектов ИЛ1 β .

Цель — изучить распределение частот полиморфизмов генов *ИЛ1 β* и *ИЛ1РА* и их связь с минеральной плотностью кости (МПК) у женщин с первичным остеопорозом (ОП).

Материал и методы. Изучено распределение частот генотипов полиморфизма (-511С/Т) гена *ИЛ1 β* и частот генотипов полиморфизма гена *ИЛ1РА*, связанного с количеством варьируемых tandemных повторов (ВТП), среди 254 женщин с ОП и 214 здоровых женщин.

Результаты и обсуждение. Носители (-511СТ) генотипа гена *ИЛ1 β* среди больных с ОП встречались несколько чаще (53,0%), чем в контрольной группе (43,4%), однако различия недостоверны. Риск развития ОП у них был в 1,5 раза выше, чем у носителей других генотипов (отношение шансов — 1,49, доверительный интервал — 1,02–2,18; $p=0,041$). Пациентки — носители Т-аллеля (СТ- и ТТ-генотипы) гена *ИЛ1 β* имели достоверно более низкую МПК позвоночника (L_{1-IV}), чем пациентки, не имеющие этого аллеля (СС-генотип; $p=0,011$). Не обнаружено различий в распределении частот полиморфизма гена *ИЛ1РА*, связанного с количеством ВТП, между больными и контролем. В группе больных ОП носители редкого варианта А1А3 гена *ИЛ1РА* (3,1%) имели достоверно более высокие значения МПК шейки бедра ($0,698 \pm 0,064$ г/см²) по сравнению с носителями вариантов А1А1, А1А2 и А2А2 ($0,613 \pm 0,078$; $0,607 \pm 0,082$ и $0,615 \pm 0,064$ г/см²; $p=0,003$, $p=0,003$ и $p=0,002$ соответственно).

Выводы. (-511С/Т) полиморфизм гена *ИЛ1 β* ассоциируется со сниженной МПК позвоночника, а вариант А1А3 гена *ИЛ1РА* — с более высокой МПК шейки бедра.

Ключевые слова: цитокины; остеопороз; полиморфизм; минеральная плотность кости.

Для ссылки: Крылов МЮ, Никитинская ОА, Самаркина ЕЮ, Торопцова НВ. Ассоциация полиморфизма гена интерлейкина 1 β с постменопаузальным остеопорозом у женщин в российской популяции. Научно-практическая ревматология. 2015;53(5):502–5.

ASSOCIATION OF INTERLEUKIN-1 β GENE POLYMORPHISM WITH POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS IN WOMEN IN THE RUSSIAN POPULATION Krylov M.Yu., Nikitinskaya O.A., Samarkina E.Yu., Toroptsova N.V.

Interleukin-1 β (IL-1 β) is a potential stimulant of bone resorption. IL-1 β receptor antagonist (IL-1RA) is a natural inhibitor of the biological effects of IL-1 β .

Objective: to study the frequency distribution of polymorphisms in the *IL-1 β* and *IL-1RA* genes and their association with bone mineral density (BMD) in women with primary osteoporosis (OP).

Subjects and methods. The distribution of genotype frequency of *IL-1 β* (-511C/T) polymorphism and that of IL-1RA 511C/T polymorphism that is associated with the number of variable tandem repeats (VTR), were investigated in 254 women with OP and 214 healthy women.

Results and discussion. IL-1 β (-511C/T) genotype carriers were encountered somewhat more frequently among the patients with OP (53.0%) than in the control group (43.4%); however, the differences were insignificant. In these carriers, the risk of OP was 1.5-fold higher than that in those of other genotypes (odds ratio, 1.49; confidence interval, 1.02–2.18; $p=0.041$). The patients who were IL-1 β T allele (CT- and TT-genotype) carriers had a significantly lower spine (L_{1-IV}) BMD than those who had not this allele (CC-genotype; $p=0.011$). The patients and the controls showed no differences in the frequency distribution of IL-1RA gene polymorphism associated with the number of VTR. In the OP group, the carriers of the rare genotype A1A3 in the IL-1RA gene (3.1%) had significantly higher femoral neck BMD (0.698 ± 0.064 g/cm²) than those of the A1A1, A1A2 and A2A2 genotypes (0.613 ± 0.078 ; 0.607 ± 0.082 and 0.615 ± 0.064 g/cm²; $p=0.003$, $p=0.003$, and $p=0.002$, respectively).

Conclusion. IL-1 β (-511C/T) polymorphism is associated with lower spine BMD and IL-1RA A1A3 genotype polymorphism is related to higher femoral neck BMD.

Key words: cytokines; osteoporosis; polymorphism; bone mineral density.

For reference: Krylov MYu, Nikitinskaya OA, Samarkina EYu, Toroptsova NV. Association of interleukin-1 β gene polymorphism with postmenopausal osteoporosis in women in the Russian population. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2015;53(5):502–5.

doi: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2015-502-505>

Введение

Остеопороз (ОП), по мнению экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), представляет собой одно из наиболее распространенных заболеваний

пожилых людей наряду с инфарктом миокарда, онкологической патологией и внезапной смертью и занимает ведущее место в структуре заболеваемости и смертности населения [1]. ОП является системным хро-

ническим заболеванием из группы остеопатий, которое характеризуется низкой минеральной плотностью кости (МПК) и нарушением ее микроархитектуры. Потеря костной массы приводит к повышенной хрупкости костей и увеличивает риск развития переломов, которые обычно происходят в телах позвонков, бедре, голени и запястье. Показано, что у взрослых людей вариабельность костной массы на 60–80% определяется генетическими факторами [2]. В настоящее время изучен большой спектр генов, ассоциированных с МПК и риском возникновения остеопоротических переломов [3]. Иммунная система играет важную роль в патофизиологии ОП, который развивается у женщин в период постменопаузы. Дефицит эстрогенов индуцирует системное и локальное повышение продукции провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 1 (ИЛ1), ИЛ6 и фактор некроза опухоли α (ФНО α), которые стимулируют остеокластогенез. Ранее было показано, что полиморфизмы генов *ИЛ1 β* и антагониста рецептора интерлейкина 1 (*ИЛ1РА*) ассоциированы с изменением МПК у женщин в постменопаузе [4]. Костеобразующие клетки – остеобласты (ОБ) – происходят из макрофагов. Рост числа ОБ и макрофагов опосредуется системой ИЛ1 [5]. Риск снижения МПК и возникновения остеопоротических переломов возрастает, если процесс резорбции костной ткани доминирует над ее образованием. Система ИЛ1 представлена тремя белками: двумя провоспалительными – ИЛ1 α и ИЛ1 β – и белком ИЛ1РА. Эти белки кодируются генами *ИЛ1 α* , *ИЛ1 β* и *ИЛ1РА* соответственно. Белки ИЛ1 α и ИЛ1 β являются потенциальными стимуляторами костной резорбции. Белок ИЛ1РА является ингибитором ИЛ1, поскольку он связывается с тем же рецептором, что и собственно ИЛ1. Гены *ИЛ1 α* и *ИЛ1 β* стимулируют пролиферацию и дифференцировку предшественников клеток резорбции – остеокластов (ОК) – в зрелые ОК [6]. J.G. Kim и соавт. [7] выявили ассоциацию между снижением костной массы и полиморфизмами гена *ИЛ1 β* у корейских женщин в постменопаузе. Ранее было показано, что полиморфизмы генов системы ИЛ1: (–889 С/Т) *ИЛ1 α* , (–511С/Т) *ИЛ1 β* и (VNTR) *ИЛ1РА* – ассоциированы с рядом заболеваний [8, 9]. В литературе описано несколько исследований по изучению возможной связи между системой ИЛ1 и ОП, однако их результаты противоречивы [10–13]. В отечественной литературе аналогичных работ до настоящего времени не было представлено. Поэтому в нашем исследовании мы решили проверить гипотезу о возможной связи вариантов генов цитокинов с риском развития ОП у женщин в постменопаузе в российской популяции. Были изучены частоты полиморфизмов генов *ИЛ1 β* и *ИЛ1РА* среди пациентов с ОП и в контрольной

группе. Кроме того, мы исследовали ассоциацию изученных полиморфизмов с МПК у женщин с ОП.

Материал и методы

В исследование включены 468 женщин; 254 из них (средний возраст $67,3 \pm 8,1$ года) вошли в основную группу. Они соответствовали критериям ВОЗ для ОП, 214 женщин (средний возраст $65,5 \pm 7,6$ года) без ОП включены в контрольную группу. Все женщины были обследованы в Центре профилактики остеопороза ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой в течение 2009–2011 гг. и подписали информированное согласие. Всем участницам была проведена денситометрия поясничного отдела позвоночника (L_{1-IV}) и проксимального отдела шейки бедра (ШБ) с помощью денситометра Hologic QDR 4500. Диагноз постменопаузального ОП ставился при снижении МПК хотя бы в одной из областей измерения на $-2,5 \pm SD$ и более по Т-критерию при отсутствии других заболеваний и использования лекарственных препаратов, влияющих на костный обмен (онкологические заболевания с метастазированием в кости, эндокринные и воспалительные ревматические болезни, прием глюкокортикоидов). У всех участниц были взяты образцы крови. ДНК выделена из крови солевым методом [14]. Полиморфизм (–511С/Т) гена *ИЛ1 β* был изучен с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом полиморфизма длин рестриктных фрагментов (ПДРФ). Полиморфизм гена *ИЛ1РА*, ассоциированный с количеством вариабельных tandemных повторов (ВТП) размером 86 пар оснований (п.о.), был изучен с помощью ПЦР и последующего электрофореза в 2% агарозном геле. В качестве праймеров использовали олигонуклеотиды, синтезированные в компании «Синтол» (Москва). Для гидролиза ампликонов использовали эндонуклеазу Aта871 компании «СибЭнзим» (Новосибирск). Последовательность используемых олигонуклеотидов, условия амплификации и длина ампликонов приведены в табл. 1.

Частоты генотипов и аллелей сравнивались с помощью χ^2 теста. Были рассчитаны показатели отношения шансов (ОШ) с 95% доверительными интервалами (ДИ). Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$. Для анализа связи полиморфизма гена *ИЛ1 β* с МПК L_{1-IV} и ШБ был использован тест ANOVA. Все данные анализировали с использованием пакета программ Statistica 6.0 (Stat Soft Inc., США).

Результаты

Распределение частот генотипов *ИЛ1 β* и *ИЛ1РА* у больных ОП и в контроле соответствовало закону Харди–Вайнберга и представлено в табл. 2.

Таблица 1 Условия амплификации, используемые для определения полиморфизмов генов *ИЛ1 β* и *ИЛ1РА*

Ген (полиморфизм)	Праймеры (5'–3')	Температура отжига	Тип полиморфизма	Аллели
<i>ИЛ1β</i> (–511С/Т)	Прямой – TGGCATTGATCTGGTTCATC Обратный – GTTTAGGATCTTCCCACTT	55 °C	ПДРФ	С = резанный фрагмент (190 п.о. + 115 п.о.) Т = интактный фрагмент (305 п.о.)
<i>ИЛ1РА</i> (ВТП)	Прямой – CTCAGCAACACTCCTAT Обратный – TCCTGGTCTGCAGGTAA	60 °C	ВТП	A1 = 4 повтора (410 п.о.) A2 = 2 повтора (240 п.о.) A3 = 5 повторов (500 п.о.) A4 = 3 повтора (325 п.о.) A5 = 6 повторов (595 п.о.)

Примечание. ВТП – количество вариабельных tandemных повторов размером 86 п.о.

Носители генотипа (-511СТ) гена *ИЛ1β* несколько чаще встречались среди больных ОП, чем среди лиц контрольной группы (53 и 43,4% соответственно), однако эти различия были недостоверны. При наличии генотипа (-511СТ) ОП развивался в 1,5 раза чаще, чем у носителей остальных генотипов (-511СС и -511ТТ) (ОШ=1,49; 95% ДИ 1,02–2,18; $p=0,041$). Распределение генотипов и аллелей гена *ИЛ1РА* среди больных ОП и в контрольной группе было сходным ($p=0,79$ и $p=0,59$ соответственно). Не выявлено достоверных различий по возрасту и индексу массы тела при наличии и отсутствии аллеля Т полиморфизма (-511С/Т) гена *ИЛ1β* и генетических (ВТП) вариантов гена *ИЛ1РА*. У носителей хотя бы одной дозы аллеля Т МПК L_{1-IV} была достоверно ниже, чем при его отсутствии ($p=0,014$). В то же время МПК ШБ в этих группах больных существенно не различалась (табл. 3).

Таблица 2 Распределение частот полиморфизма (-511С/Т) гена *ИЛ1β* и полиморфизма VNTR гена *ИЛ1РА* среди больных ОП и в контроле, n (%)

Ген (полиморфизм) генотипы	Аллели	Больные	Контроль
<i>ИЛ1β</i>		$n=259$ (100)	$n=212$ (100)
(-511СС)		97 (37,4)	93 (43,9)
(-511СТ)		138 (53,3)	92 (43,4)
(-511ТТ)		24 (9,3)	27 (12,7)
		$2n=518$	$2n=424$
	С	338 (65,3)	278 (65,6)
	Т	180 (34,7)	146 (34,4)
<i>ИЛ1РА</i> VNTR		$n=254$ (100)	$n=214$ (100)
(A1A1)		127 (50,0)	99 (46,3)
(A1A2)		86 (33,8)	74 (34,6)
(A1A3)		8 (3,1)	9 (4,2)
(A2A2)		33 (13,0)	32 (14,9)
		$2n=508$	$2n=428$
	A1	348 (68,5)	281 (65,6)
	A2	86 (29,9)	138 (32,2)
	A3	8 (1,6)	9 (2,2)

Примечание. VNTR – генотипы, ассоциированные с разным количеством повторов из 86 п.о.

Таблица 3 МПК, г/см² ($M \pm SD$), у больных ОП при наличии и отсутствии аллеля Т полиморфизма (-511С/Т) гена *ИЛ1β*

Показатель	Носители аллеля Т ($n=162$)	Аллель отсутствует ($n=97$)	p
МПК L_{1-IV}	$0,705 \pm 0,069$	$0,730 \pm 0,087$	0,011
МПК ШБ	$0,616 \pm 0,078$	$0,619 \pm 0,073$	

Таблица 4 Средние показатели МПК позвоночника и ШБ, г/см² ($M \pm SD$), в зависимости от генетических вариантов гена *ИЛ1РА*

Ген (полиморфизм)	МПК L_{1-IV}	p	МПК ШБ	p
<i>ИЛ1РА</i>				
(A1A1)	$0,724 \pm 0,090$	0,51	$0,613 \pm 0,078$	0,030*
(A1A2)	$0,704 \pm 0,072$	0,12	$0,607 \pm 0,082$	0,029*
(A1A3)	$0,745 \pm 0,038$		$0,698 \pm 0,059$	
(A2A2)	$0,703 \pm 0,059$	0,062	$0,615 \pm 0,064$	0,019*

Примечание. * – в сравнении с МПК ШБ для (A1A3).

В табл. 4 представлены средние показатели МПК L_{1-IV} и ШБ в зависимости от носительства четырех выявленных генотипов гена *ИЛ1РА* в группе больных ОП.

У носителей редкого гетерозиготного варианта A1A3 гена *ИЛ1РА* (3,1%) МПК ШБ была достоверно выше ($0,698 \pm 0,059$ г/см²), чем у носителей генотипов A1A1, A1A2 и A2A2 ($0,613 \pm 0,078$; $0,607 \pm 0,082$ и $0,615 \pm 0,064$ г/см²; $p=0,003$, $p=0,003$ и $p=0,002$ соответственно). Не выявлено статистически достоверных различий в МПК L_{1-IV} при наличии и отсутствии этих генотипов, однако была отмечена тенденция связи генотипа A1A3 с более высокой МПК L_{1-IV} по сравнению с носителями генотипа A2A2.

Обсуждение

ОП – одно из наиболее распространенных заболеваний пожилых людей. В основе его патогенеза лежит взаимодействие генетических и средовых факторов. ОП является полигенным заболеванием, развитие которого связано с влиянием на процессы костного ремоделирования значительного числа генов. К ним относятся гены гормонов и их рецепторы, такие как рецептор витамина D, рецептор эстрогена; цитокины и их рецепторы – такие как ИЛ1α, ИЛ1β, ИЛ1РА и трансформирующий фактор роста β1. Среди генетических факторов, участвующих в патогенезе ОП, системе ИЛ1 отводится важная роль в модуляции роста клеток, осуществляющих костную резорбцию у женщин в постменопаузе [15]. Белки ИЛ1α и ИЛ1β связываются с рецепторами ИЛ1 на поверхности клеток крови и инициируют каскад сигналов, который приводит к стимуляции воспалительного ответа и костной резорбции. С рецептором ИЛ1 также связывается белок ИЛ1РА, который конкурирует с ИЛ1 и блокирует его действие.

В нашем исследовании частота генотипа (-511С/Т) гена *ИЛ1β* у женщин в постменопаузе с ОП была достоверно выше, чем в контроле. Полученные нами данные согласуются с результатами исследования тайваньских женщин с ОП [12]. Сходные данные приведены в работе А. Nemetz и соавт. [13], которые показали наличие ассоциации между аллельными вариантами гена *ИЛ1β* и сниженной костной массой у больных с воспалительными заболеваниями кишечника. Близкие к нашим данным частоты полиморфизма гена *ИЛ1РА* были выявлены В.Л. Langdahl и соавт. [11] у женщин с ОП. В этом исследовании авторы показали связь между количеством копий аллеля А2 и сниженной костной массой позвоночника. В нашей выборке при наличии А1 и А2 МПК ШБ была ниже, чем у носителей редкого аллеля А3. Противоположные результаты были получены в корейской группе больных и венгерской выборке женщин с ОП [7, 10]. Авторы не нашли различий по МПК и уровню костных биомаркеров при наличии различных полиморфных вариантов гена *ИЛ1РА*. Следует отметить, что в азиатской популяции наблюдается высокая частота аллеля А1 (до 90%). У болгарских женщин с постменопаузальным ОП она также высокая и достигает 95% [16]. В этой группе отмечалось некоторое снижение МПК предплечья у носителей гомозиготного генотипа A1A1 по сравнению с носителями A2A2, но различия не достигали статистической значимости. Кроме этого, болгарские коллеги наблюдали достоверную связь носительства A1A1 с повышенным

уровнем деоксипиридинолина в моче и остеокальцина в сыворотке по сравнению с носителями A2A2.

Таким образом, в настоящем исследовании мы впервые на когорте российских женщин с постменопаузальным ОП показали, что наличие хотя бы одной дозы аллеля Т (генотипы СТ и ТТ) гена *IL1β* достоверно связано со снижением МПК L_{1-IV} , что может являться одним из факторов риска развития остеопоротических переломов. Носительство аллелей А1 и А2 гена *IL1RA* ассоциировано со сниженной МПК ШБ. Скрининг (-511С/Т) полиморфизма гена *IL1β* и генетических вариантов ВТП гена *IL1RA* позволяет выявлять повышенный риск уменьшения костной массы и возникновения последующих переломов уже в на-

чале заболевания, что дает возможность своевременно назначать эффективную антирезорбтивную терапию.

Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Исследователи несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции и дизайна исследования и написания рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за исследование.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization Study Group. Assessment of fracture risk and its application for screening, for postmenopausal osteoporosis. Geneva: WHO; 1994.
2. Rosen CJ, Beamer WG, Donahue LR, et al. Defining the genetics of osteoporosis: Using the mouse to understand man. *Osteoporosis Int.* 2001;12:803–10. doi: 10.1007/s001980170030
3. Untertlinden AG, van Meurs JB, Rivadeneira F, et al. Identifying genetic risk factors for osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006;6:16–26.
4. Ralston SH, de Crombrughe B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev.* 2006;20:2492–506. doi: 10.1101/gad.1449506
5. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801–9. doi: 10.1038/362801a0
6. Romas E, Martin TJ. Cytokines in the pathogenesis of osteoporosis. *Osteoporosis Int.* 1997;7:S47–3. doi: 10.1007/BF03194342
7. Kim JG, Ku SY, Lim KS, et al. Cytokine production by whole blood cells: Relationship to interleukin gene polymorphism and bone mass. *J Korean Med Sci.* 2005;20:1017–22. doi: 10.3346/jkms.2005.20.6.1017
8. Al Moundhri MS, Al Nabhani M, Al Bahrani B, et al. Interleukin-1beta gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphisms and gastric cancer risk in an Omani Arab population. *Gastric Cancer.* 2006;9:284–90. doi: 10.1007/s10120-006-0392-5
9. Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet.* 1993;91:403–4. doi: 10.1007/BF00217368
10. Bajnok E, Takacs I, Vargha P, et al. Lack of association between interleukin-1 receptor antagonist protein gene polymorphism and bone mineral density in Hungarian postmenopausal women. *Bone.* 2000;27:559–62. doi: 10.1016/S8756-3282(00)00360-4
11. Langdahl BL, Lokke E, Carsyens M, et al. Osteoporotic fractures are associated with an 86-base pair repeat polymorphism in the interleukin-1-receptor antagonist gene but not with polymorphism in the interleukin-1 gene. *J Bone Miner Res.* 2000;15: 402–14. doi: 10.1359/jbmr.2000.15.3.402
12. Chen HY, Chen WC, Wu MC, et al. Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in postmenopausal women: Correlation to bone mineral density and susceptibility to osteoporosis. *Maturitas.* 2003;44:49–54. doi: 10.1016/S0378-5122(02)00313-4
13. Nemetz A, Toth M, Garcia-Gonzalez MA, et al. Allelic variation at the interleukin 1beta gene is associated with decreased bone mass in patients with inflammatory bowel diseases. *Gut.* 2001;49:644–9. doi: 10.1136/gut.49.5.644
14. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:12–5. doi: 10.1093/nar/16.3.1215
15. Hustmyer FG, Wallker E, Yu XP, et al. Cytokine production and surface antigen expression by peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1993;8:51–9. doi: 10.1002/jbmr.5650080108
16. Ivanova JT, Boyanov MA, Tochev AK Polymorphisms of the human IL-1 receptor antagonist gene and forearm bone mineral density in postmenopausal women. *Ind J Endocrinol Metab.* 2012;16(4):580–6.