

ОБЗОРЫ

ГЕНЕТИКА РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

М.А. Мошнина

ГУ Институт ревматологии РАМН, Москва

Успехи молекулярной генетики в области картирования генов, ответственных за моногенные заболевания, позволили перейти к изучению заболеваний, имеющих мультифакториальную природу. До недавнего времени генетики ограничивались чисто статистическим анализом, оценивая количественный вклад действия генетических и средовых факторов в этиологию того или иного заболевания. В настоящее время идет целенаправленный поиск генов предрасположенности ко многим распространенным мультифакториальным заболеваниям: ревматоидному артриту (РА), бронхиальной астме, сахарному диабету, псориазу, атеросклерозу и др.

Информация о первичных генетических дефектах, лежащих в основе заболеваний с наследственной предрасположенностью, будет способствовать лучшему пониманию их этиопатогенеза, а также разработке новых эффективных методов диагностики и терапии.

Значимость генетических факторов в детерминации РА

Агрегация в семьях

Доказательством наследственной предрасположенности к РА является семейная агрегация заболевания. Первые попытки получить статистические данные о частоте РА в семьях были предприняты в 50-х гг. R.M. Stecher с соавт. проанализировали семейный анамнез 1453 родственников больных РА из 224 семей и выявили заболевание у 3,4% из них по сравнению с 0,58% в контроле [64]. A.G. Wasmuth и соавт. [76] при помощи анализа медицинской документации и интервьюирования 1425 родственников больных РА отметили десятикратное превышение распространенности РА в семьях по сравнению с популяцией (2,6% против 0,26%).

В отделе эпидемиологии и генетики Института ревматологии РАМН было осуществлено клиничко-генетическое исследование 148 пробандов с определенным или классическим РА (критерии АРА, 1966 г) и 461 родственника первой степени родства. Частота определенного РА среди родственников первой степени родства составила 3,0% по сравнению с 0,24% в контрольной популяции, что свидетельствовало о накоплении заболевания в семьях [1].

По оценкам разных авторов около 11 % пробандов с РА имеют хотя бы одного родственника, страдающего этим заболеванием [11,79].

Таким образом, в настоящее время имеются убедительные данные, свидетельствующие о семейной агрегации РА. Накопление заболевания среди родственников пробандов и характер его распределения дают основание говорить о наличии наследственной предрасположенности к РА.

Соотношение вклада генетических и средовых факторов в этиопатогенез РА

В основе семейной агрегации заболевания может лежать как генетическое, так и средовое влияние. Сравнение конкордантности (совпадения) по заболеванию в парах монозиготных и дизиготных близнецов позволяет оценить количественный вклад генотипа и внешней среды в этиопатогенез заболевания. Так, конкордантность по РА среди монозиготных близнецов пример-

но в четыре раза выше, чем среди дизиготных, которые имеют рекуррентный риск, аналогичный для их сибсов, но не близнецов [2]. Поскольку оба типа близнецов находятся под влиянием одинаковых факторов внешней среды в пренатальном и постнатальном периодах развития, превышение конкордантности среди монозиготных близнецов отражает именно генетическое влияние.

A.J. Silman с соавт., исследовав 91 пару монозиготных и 112 пар дизиготных близнецов, установили, что коэффициенты конкордантности по РА соответствовали в этих группах 15,4 % и 3,6 %. По мнению этих исследователей 15 % конкордантность монозиготных близнецов определяет верхний предел потенциального генетического вклада в предрасположенность к РА [61].

Однако даже лучшие близнецовые исследования имеют недостатки. Концепция близнецового метода постулирует, что монозиготные близнецы, развившиеся из одной зиготы, являются генетически идентичными. Но в процессе развития эмбрионов такие явления, как соматические мутации, инактивация X-хромосомы, эпистаз и геномный импринтинг [36,38,57], могут привести к различиям генной активности в парах монозиготных близнецов. По мнению P.K. Gregersen эти различия могут стать источником дискордантности по аутоиммунным заболеваниям у генетически идентичных индивидов [18].

Кроме того, серьезная недооценка истинного уровня конкордантности может быть вызвана временным разрывом между заболеванием первого и второго близнеца. По наблюдению V. Targ и H.K. Grauda эта разница может составить от нескольких лет до десятилетий [68]. Исходя из вышеизложенного, очевидно, что доля генетической компоненты в развитии РА значительно выше, чем представляют проведенные близнецовые исследования, и может доходить до 50 % и более [40,41,67,81].

Вклад HLA локуса в этиопатогенез РА

Гены HLA DRB1 локуса являются наиболее хорошо изученной частью генетической компоненты РА. Однако существуют различные интерпретации их роли в патогенезе РА. Некоторые исследователи видят основную роль HLA DRβ 1 молекулы в селекции набора Т-клеточных рецепторов в тимусе при созревании тимоцитов. По их мнению причиной аутоиммунных процессов в патогенезе РА может быть доминантная селекция аутореактивных Т-клеток [3,12,84].

Общепринятым является мнение о прямом вовлечении при РА генов HLA DRB1 локуса в патогенетический процесс. Ряд масштабных исследований подтвердил положительную ассоциацию заболевания с определенными аллелями HLA DRB1 локуса [13,15,24,82]. Среди представителей белой расы, страдающих РА, повышена частота определенных субтипов HLA DRB1 локуса: *0101, *0401, *0404, *0405, *0408, *1010. Эти аллели кодируют аминокислотные последовательности QKRAA или QRRRAA в позиции 70-74 третьего гипервариабельного региона молекулы HLA класса II. Консервативный аминокислотный участок в HLA DR 1 молекуле, кодируемый генами HLA DRB1 локуса, получил название "общий эпитоп" ("shared epitope").

P.K. Gregersen с соавт. показали, что 75% больных РА европеоидной расы имеют мотив Q(K/R)RAA в антиген-связывающем третьем гипервариабельном регионе молекулы HLA DRβ 1 [17]. По оценкам других авторов среди больных с тяжелым эрозивным серопозитивным РА обнаружено 87 – 96% носителей "общего эпитопа" [33,45], причем "доза гена" с высокой досто-

верностью влияет на вовлечение в патологический процесс других систем и органов [72,77].

Изучение ассоциаций аллелей HLA DRB1 локуса с клиническим полиморфизмом РА позволило сформулировать концепцию, согласно которой гены HLA DRB1 локуса являются не маркером чувствительности к РА, а маркером тяжести заболевания [29,56,59,69].

Наличие ассоциаций РА с определенными аллелями генов HLA DRB1 локуса подтверждено многими исследованиями в различных популяциях [20,21,47,73]. Однако природа ассоциаций генов локуса HLA DRB1 с РА остается неясной: либо они сами участвуют в формировании предрасположенности к РА, либо находятся в неравновесии по сцеплению с главным геном предрасположенности к РА, локализованном на коротком плече 6-й хромосомы.

Весьма вероятно, что ассоциирующиеся с РА аллели генов HLA DRB1 способны влиять на пенетрантность основных генов заболевания, значительно повышая ее, что и объясняет высокую частоту "общего эпитопа" среди больных.

Количественный вклад HLA локуса в предрасположенность к РА оценивали несколько авторов. Полученные ими данные согласуются между собой и свидетельствуют, что доля HLA комплекса в общей генетической компоненте РА составляет 30 - 37% [11,58,80].

В настоящее время усилия ученых многих стран направлены на поиски других генов, не сцепленных с локусом HLA, которые детерминируют предрасположенность к РА.

Методы картирования генов наследственных заболеваний человека

Идентификация гена или генов, ответственных за развитие болезней с наследственной предрасположенностью, означает нахождение транскрибируемого участка или участков ДНК, кодирующих определенный функциональный продукт, аномальный у больного.

К настоящему времени теоретически обоснованы и широко применяются 3 группы методов генетического картирования мультифакториальных заболеваний:

1. Классический параметрический анализ сцепления представляет собой проверку наблюдаемой картины сегрегации заболевания и аллелей генетических маркеров в семье на соответствие определенной модели наследования [52]. Для этого применяется метод максимального правдоподобия [49], т.е. подсчитывается отношение вероятности наличия сцепления между главным геном заболевания и исследуемым маркером к вероятности отсутствия сцепления в конкретной семье. Отношение этих двух вероятностей есть отношение правдоподобий, которое выражает шансы за и против сцепления. Количественным показателем сцепления является логарифм отношения шансов - LOD-балл. LOD-балл позволяет объединять данные различных родословных арифметическим суммированием. Для единичного наблюдения сцепление с заданной частотой рекомбинации считается статистически доказанным при значении LOD-балла, равном или большем "+3". LOD-балл, равный или меньший "-2", позволяет исключить наличие сцепления. Интервал значений LOD-балла от "-2" до "+3" рассматривается как зона неопределенности, для выхода из которой требуются новые семейные данные или привлечение дополнительных ДНК-маркеров, локализованных в данном хромосомном регионе. LOD-балл можно вычислить для различных значений фракции рекомбинаций (ϕ) - от 0 до 0,5.

Анализ сцепления является в настоящее время основным методом генетического картирования простых моногенных признаков. Однако этот метод может применяться и в тех случаях, когда более чем один ген вовлечен в детерминацию наследственного заболевания.

2. Метод идентичных по происхождению аллелей (IBD - identical by descent) - непараметрический анализ сцепления - представляет собой оценку того, насколько чаще по сравнению со случайной сегрегацией пара больных родственников наследует идентичный участок генома. Анализ общих по происхождению аллелей возможен для любых пар близких родственников,

однако на практике чаще всего используют пары больных сибсов. IBD-анализ в сибсовых парах получил название ASP-метод (ASP - affected sib pairs) [5]. Показателем сцепления при IBD-анализе является непараметрический LOD-балл. В отличие от параметрического он не может быть отрицательным, т.е. прямо не указывает на отсутствие сцепления (минимальный LOD-балл = 0; при этом $p = 0,5$). В случае исследования заболевания, в детерминации которого заведомо вовлечено более одного гена, эффект каждого из них будет относительно слабым. Чтобы предотвратить потерю информации о возможном сцеплении, E.Lander и L.Kruglyak предложили придерживаться строгих критериев, применимых как для сканирования всего генома, так и для исследования ограниченного хромосомного региона. Например, в ASP-методе, описанном выше, значение LOD-балла $\geq 2,1$ ($p < 0,0009$) будет соответствовать предположительному сцеплению ("suggestive" linkage), а LOD-балл, достигший значения 3,6 ($p < 0,00035$), будет указывать на достоверное сцепление ("significant" linkage) [34].

3. Исследование ассоциаций в популяциях заключается в сравнении частот аллелей генетического маркера у больных индивидумов и здоровых из той же популяции. Аллель данного гена считается ассоциированным с болезнью, если его частота среди больных значимо выше, чем в контрольной выборке. В основе ассоциации генетического маркера с болезнью может лежать ряд причин, две из которых наиболее существенны для идентификации генов предрасположенности к заболеванию. Во-первых, наличие ассоциаций может свидетельствовать о том, что ассоциированный ген является геном (или одним из генов) болезни. Во-вторых, причиной ассоциаций может быть неравновесие по сцеплению между маркерным локусом и локусом заболевания. Это возможно в том случае, когда ассоциированный аллель находился на предковой хромосоме, а его локус настолько близко расположен к локусу болезни, что эта корреляция не была нарушена рекомбинацией за время существования популяции. Кроме того, ассоциация может быть артефактом, возникшим вследствие стратификации популяции.

Результаты сканирования генома с целью поиска генов предрасположенности к РА

Поиск генов предрасположенности к РА с помощью сканирования всего генома человека и анализа сцепления в последние годы проводится в нескольких научных лабораториях мира.

Первое сканирование генома в семьях больных РА было проведено международной группой ученых ECRAF (The European Consortium on Rheumatoid Arthritis Families) на коллекции семей с пораженными парами сибсов из Франции, Италии, Испании, Бельгии, Нидерландов, Греции, Португалии [8]. Исследование было осуществлено в два этапа. Первоначально на сибсовом материале из 97 ядерных семей провели сканирование генома в поисках генов, участвующих в детерминации РА. Было применено 309 микросателлитных маркеров, распределенных по геному с примерным шагом 12 сантиморганд (сМ). Двухточечный анализ сцепления (между локусом заболевания и маркерным локусом) был проведен с помощью ASP-метода. Статистически значимое сцепление было показано только для HLA локуса, а по 19 маркерам, относящимся к 14 различным хромосомным регионам, было обнаружено условное сцепление ($p < 0,05$). Примечательно, что 4 региона совпали с локусами, предположительно участвующими в детерминации инсулин-зависимого сахарного диабета. На втором этапе было проведено более углубленное исследование двух из четырех кандидатных регионов - на 3 и 18 хромосомах (3q13 и 18q22-23). Дополнительные ДНК-маркеры из этих регионов были тестированы в тех же семьях и в 194 новых сибсовых парах из 164 семей. Данные о наличии сцепления были получены для локуса HLA ($p = 0,001$) и для сегмента 3q13 хромосомы 3 ($p = 0,002$). Первоначальный положительный результат для сегмента 18q22-23 был либо ложным, либо указывал на минорный эффект данного локуса в детерминации предрасположенности к РА. В ходе работы была проведена оценка относительного вклада локусов HLA и 3q13 в формирование предрасположенности к РА. На данном семейном материале он составил 33% и 16% соответственно, что указывает на це-

лесообразность дальнейших исследований по поиску других генов предрасположенности к РА [8].

Почти одновременно с работой группы ECRAF в печати появилось сообщение о проведенном в Японии сканировании генома с целью поиска генов предрасположенности к РА [60]. Было протестировано 358 полиморфных микросателлитных маркеров локуса в 41 семье с двумя пораженными сибсами. Максимальный LOD-балл был обнаружен для трех хромосомных регионов, содержащих следующие ДНК-маркеры: D1S253, D8S556, DXS1232. Необходимо заметить, что два из этих регионов (локализованных на хромосомах 1 и X) были отмечены и в предыдущей работе как локусы с условным сцеплением. Вместе с тем в работе японских ученых не подтвердилось статистически значимое сцепление локуса HLA с РА, выявленное в результате геномного скрининга в европейских популяциях.

Геномное сканирование Северо-Американского Ревматологического Консорциума (NARAC), проведенное в 257 семьях с парами пораженных сибсов, выявило несколько кандидатных регионов на хромосомах 1, 4, 5, 6, 8, 12, 16 и 17 ($p < 0,05$) [26]. Два года спустя были опубликованы результаты нового независимого исследования NARAC, выполненного на 256 семьях. Данные о наличии сцепления были получены для хромосом 1, 2, 6, 8, 9, 10, 11, 12 и 18 ($p < 0,05$) [25]. Анализ объединенных данных показал наличие сцепления с достоверностью $p < 0,005$ для хромосомных сегментов 1p13, 1q43, 6q21, 10q21, 12q12, 17p13 и 18q21.

Результаты последнего полногеномного скрининга, проведенного в Великобритании на 252 сибсовых парах с использованием 365 высокоинформативных микросателлитов, подтвердили значимое сцепление РА с локусом HLA и выявили 10 областей с номинальным сцеплением ($p < 0,05$): 3p, 4q, 7p, 16p, 21q, Xq, а также по 2 региона на 10q и в 14q [42].

Совершенно очевидно, что цели, которые преследует полногеномный скрининг по выявлению генов предрасположенности к РА, пока не достигнуты. Однако, несмотря на малую чувствительность метода (генетическое расстояние между соседними ДНК-маркерами около 10 сМ), выявлен ряд позиционно-кандидатных регионов генома, перспективных для поиска генов предрасположенности к РА.

Позиционно-кандидатный подход к поиску генов предрасположенности к РА

Альтернативной стратегией для поиска генов предрасположенности к наследственным заболеваниям является кандидатный подход. В университете Манчестера была разработана программа по тестированию кандидатных генов, продукты которых могут иметь решающее значение в патогенезе РА [28]. В анализе сцепления были использованы 12 маркеров с гетерозиготностью от 0,57 до 0,90, лежащих внутри или на расстоянии менее 2 сМ от кандидатных генов, кодирующих интерлейкины, интерфероны, поверхностные молекулы и их лиганды: IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IFN- α , INF- γ , INF- β , CD40, CD40L. Данные маркеры были протестированы в 115 семьях, имеющих в своем составе пары сибсов, страдающих РА (35 пар с двумя живыми родителями, 18 пар – с одним). Анализ идентичных по происхождению хромосом (IBD-метод) не обнаружил сцепления РА ни с одним из изученных ДНК-маркеров.

Однако исследования были продолжены на увеличенной выборке (200 пораженных пар сибсов), которая была стратифицирована по полу и клиническим особенностям течения РА [27]. Для генотипирования использовались информативные микросателлитные маркеры, картированные внутри или на расстоянии менее чем 3 сМ от кандидатных генов INF- α , INF- γ , INF- β , IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-2, IL-6, IL-5R, IL-8R, CD40, CD40L, BCL2, NRAMP, α 1-антитрипсин, α 1-антихимотрипсин. Для оценки сцепления определяли, насколько чаще по сравнению со случайной сегрегацией пары больных сибсов наследуют идентичные по происхождению аллели (ASP-анализ). Обнаружено достоверное повышение доли общих аллелей маркеров для следующих кандидатных генов: IL-5R – в парах сибсов мужского пола (LOD балл = 0,91, $p = 0,03$), INF- γ – в сибсовых парах женского пола (LOD балл = 1,96, $p = 0,03$) и для IL-2 – в тех

сибсовых парах, где один или оба сибса длительное время были серонегативными (LOD балл = 1,05, $p = 0,02$). Полученные результаты дали авторам основание предположить, что РА является генетически гетерогенным заболеванием.

Группа исследователей из Японии изучила 142 одноклеточных повторов (ОНП), локализованных в 41 кандидатном гене среди 48 больных РА. Частоты аллелей 69 ОНП отличались от аналогичных показателей в выборках здоровых индивидов других популяций. Вследствие отсутствия собственного популяционного контроля, авторы считают неправомерным связывать полученные отличия с РА, т.к. они могут отражать особенности данной этнической группы [83].

Наблюдаемые во многих популяциях ассоциации РА с HLA-DRB1 аллелями и противоречивые данные о наличии сцепления заболевания с локусом HLA заставили исследователей обратить внимание на другие гены комплекса MHC, расположенного на коротком плече 6 хромосомы на протяжении 4000 пар оснований (п.о.)

Гены, кодирующие полиморфные продукты MHC класса I, расположены на дистальном конце комплекса, а регион MHC класса II – ближе к центромере. В средней части комплекса локализованы гены, детерминирующие продукты MHC класса III. Среди них гены, кодирующие компоненты комплемента C2 и C4, фактор некроза опухоли (TNF- α и TNF- β), белки теплового шока (HSP70) и другие гены, продукты которых непосредственно участвуют в иммунном ответе. В MHC локусе картировано более 220 генов и, по крайней мере, 10% из них функционально связаны с иммунной системой [46]. В связи с этим, ряд исследований был направлен на изучение роли других генов комплекса MHC, помимо HLA-DRB1, в формировании предрасположенности к РА.

Группа ученых из Нидерландов [71] проверила гипотезу, предполагающую, что чувствительность к РА может быть детерминирована совместным эффектом HLA-DQ и HLA-DRB1 локусов. Данная модель предрасположенности к РА была протестирована на 167 больных РА и 166 здоровых индивидов, которые были протипированы по HLA-DQ и HLA-DRB1 локусам. Полученные результаты указывают на отсутствие HLA-DQ обусловленной чувствительности к РА.

D.P. Singal и соавт. изучили полиморфизм микросателлитного маркера D6S273, локализованного между генами Hsp70 и Bat2 в регионе MHC класса III, среди 97 больных серопозитивным РА и 100 здоровых индивидов. Обнаружены значимые ассоциации РА с аллелем длиной 138 п.о. как в общей группе больных, так и среди пациентов, негативных по "общему эпиту" (что указывает на дополнительный риск развития РА, связанный с данным локусом [63]).

Исследование было расширено привлечением дополнительных микросателлитных маркеров генов Bat2, TNF- α и HSP70. Полученные результаты демонстрируют, что два региона в комплексе MHC (класс II и класс III) более полно детерминируют риск развития РА [62]. Однако другие исследования, направленные на поиск ассоциаций РА с полиморфизмом локуса TNF- α , таких ассоциаций не выявили [37,78].

Тестирование генов альфа (α), бета (β), дельта (δ) и гамма (γ) цепей Т-клеточных рецепторов как генов предрасположенности к РА

В различных областях медицины накоплен фактический материал (гистоморфологический, экспериментальный, клинический, иммунологический), указывающий на решающую роль Т-лимфоцитов в развитии РА [6,23,30,32,48,53,65,66,75]. Кроме того, ассоциацию HLA DRB1 аллелей с РА трудно объяснить без участия Т-клеток, т.к. две известные функции HLA молекул в патогенезе РА тесно связаны с Т-лимфоцитами: селекция Т-клеточного репертуара в тимусе и презентация "артритогенного" антигена CD4+ Т-клеткам [31,54,55,74].

Учитывая ведущую роль Т-клеток в патогенезе РА, гены, кодирующие Т-клеточные рецепторы (TCR – T cell receptor), выступают в качестве очевидных кандидатов на роль генов предрасположенности к заболеванию.

Т-клеточные антигенные рецепторы на большинстве зрелых

лимфоцитов состоят из α и β цепей и только 5% клеток экспрессируют Δ/γ гетеродимеры. Молекулы α -, β - и γ -цепей кодируются генами TCRA, TCRB, TCRG, локализованными в хромосомных сегментах 14q11.2, 7q35 и 7p15 соответственно. Что касается гена, кодирующего δ -цепь Т-клеточного рецептора (TCRD), то он имеет своеобразное расположение - внутри TCRA локуса. Гены, кодирующие Т-клеточные рецепторы, состоят из переменных V-сегментов (V-variable), соединяющих J-сегментов (J-joining), константных C-сегментов (C-constant), а для β и δ цепей - дополнительных D-сегментов (D-diversity).

Число V-сегментов в различных генных кластерах, которое теоретически должно определять разнообразие Т-клеточных рецепторов, велико. Кроме того, сочетание различных V-, D- и J-сегментов происходит на основе случайного выбора. Таким образом, в процессе созревания лимфоцитов формируется по существу безграничное разнообразие рецепторов, специфичных для огромного количества антигенов [10].

Влияние полиморфизма генов TCR на развитие РА изучали в течение последнего десятилетия различные лаборатории, используя принципиально отличающиеся методы: исследование ассоциаций в популяциях, метод идентичных по происхождению аллелей (IBD) и классический анализ сцепления, основанный на проверке конкретных моделей наследования болезни.

Две группы американских ученых, работающих независимо друг от друга, сообщили об обнаружении ассоциаций РА с ДНК-маркером 8-го переменного сегмента гена TCRB. Однако E.J. Ball утверждал о наличии ассоциаций в общей, не стратифицированной группе больных РА [4], а S.W. Funkhouser получил статистически значимые различия в распределении аллелей этого полиморфизма только в группе HLA DR4 положительных пациентов [14].

Сообщение об ассоциации ДНК-маркера 8-го переменного сегмента гена TCRB с РА было проверено С. Lunardi с соавт. в двух европеоидных популяциях: итальянской и британской [39]. Результаты исследования показали, что распределение аллелей этого полиморфизма не связано с РА в обеих популяциях, независимо от наличия или отсутствия у больных антигена HLA DR4. Позднее аналогичная работа в бельгийской популяции также не подтвердила наличия ассоциаций РА с полиморфизмом 8-го переменного сегмента гена TCRB [70].

Группа американских ученых в течение нескольких лет занималась изучением этиологической роли полиморфизма гена, кодирующего β -цепь Т-клеточного рецептора в формировании предрасположенности к РА. В предварительном исследовании (77 больных РА и 70 здоровых индивидов) выявлена ассоциация между полиморфизмом 6-го переменного сегмента гена TCRB и РА среди больных-носителей HLA DR4 [51]. В дальнейшем исследователи, увеличив группу больных до 112 человек, дополнительно проанализировали девять полиморфных маркеров генного комплекса TCRB. При анализе ассоциаций аллелей изученных маркеров в общей выборке больных РА статистически достоверных различий не обнаружено. Однако при выделении в отдельную группу пациентов с фенотипом HLA DR4+ получены статистически значимые ассоциации для трех маркеров. По мнению авторов это указывает на то, что сам 6-й переменный сегмент гена TCRB или сцепленный с ним сегмент может быть вовлечен в предрасположенность к РА через взаимодействие с HLA DR4 [50].

Однако на более представительной выборке (766 пациентов с эрозивным артритом, положительных по ревматоидному фактору, и 813 контрольных индивидов из Франции и Англии) не выявлено ассоциаций РА с полиморфизмом 6-го переменного сегмента гена TCRB [9]. В том же исследовании был изучен полиморфизм трех переменных генных сегментов α -цепи Т-клеточных рецепторов. Выявлено значительное повышение частоты одного генотипа 8-го переменного сегмента гена TCRA среди больных РА ($p = 0,0004$), что привело авторов к выводу о существовании гена чувствительности к РА в локусе TCRA.

Исследование М. Ibberson с соавт. было направлено на изучение ассоциаций между полиморфными ДНК-маркерами переменных генных сегментов α -цепи Т-клеточных рецепторов и РА среди 360 больных и 197 контрольных индивидов [22].

Статистически достоверные отличия не были обнаружены ни в общей группе больных, ни при стратификации их по HLA DR4 статусу.

Таким образом, популяционные исследования, сравнивающие больных РА со здоровым контролем, дают весьма противоречивые результаты. Противоречивость сообщений о различных ассоциациях можно объяснить методическими ошибками, эффектом стратификации, генетическими различиями обследованных популяций, наличием неравновесия по сцеплению, а также генетической гетерогенностью заболевания.

Семейные исследования имеют определенные преимущества перед популяционными, т.к. позволяют обнаружить сцепление, даже если тестируемый маркер не лежит внутри гена предрасположенности к заболеванию.

McDermott с соавт. попытались оценить роль генов, кодирующих β -цепь TCR, в формировании предрасположенности к РА [44]. В 28 семьях с повторными случаями заболевания были протестированы 3 полиморфных генетических маркера. Результаты были проанализированы с помощью программы SIBPAL, оценивающей количество общих по происхождению аллелей в парах сибсов (ASP-метод). Для всех исследованных маркеров количество совместно наследуемых сибсами аллелей было большим, чем ожидалось при постулировании случайности их комбинирования, однако значение r ни в одном случае не достигло решающего уровня 0,0009, который служил бы доказательством наличия предположительного сцепления ("suggestive" linkage). Авторы делают вывод о возможности существования гена предрасположенности к РА внутри генного комплекса TCRB, однако указывают на необходимость подтверждения полученных данных на большем семейном материале.

Такая работа была проведена 2 года спустя в Англии на 184 семьях, содержащих по крайней мере одну пару пораженных сибсов. В анализе сцепления были использованы по 3 высокополиморфных микросателлитных маркера из локусов генов TCRA (D14S50, TCRB, D14S64) и TCRB (D7S509, V β 6.7, D7S688). Вначале ASP-анализ был проведен для всех пораженных сибсовых пар, а затем повторен для HLA DR4 положительных пар [19]. Непараметрический LOD-балл для всех трех маркеров TCRB локуса был приблизительно равен нулю ($p \approx 0, 5$), что указывало на отсутствие сцепления. Анализ сцепления РА с локусом TCRA показал максимальные результаты для двух маркеров: LOD-балл, равный +0,65 ($p = 0,04$) для (CA) n - повтора TCRA и LOD-балл, равный +0,49 ($p = 0,07$) для маркера D14S50. При повторном анализе родословных с парами сибсов, имеющих фенотип HLA DR4+, значения LOD-баллов были +0,20 ($p = 0,17$) и 0,00 ($p = 0,50$) соответственно. Таким образом, непараметрический LOD-балл, полученный при анализе сцепления РА с маркерами TCRA локуса в нестратифицированных по HLA антигенам парах сибсов, достиг приблизительно 5% уровня значимости. Однако эти результаты значительно ниже, чем порог, предложенный E. Lander и L. Kruglyak для подтверждения предположительного сцепления [34]. По мнению F. C. Hall с соавт., данное исследование исключает главный эффект генов TCRA и TCRB в формировании предрасположенности к РА, но не опровергает возможности их минорного влияния [19].

Популяционные и семейные исследования, направленные на изучение роли генов TCRG в патогенезе РА, дали сходные результаты. В лаборатории молекулярной иммуногенетики университета г. Монпелье под руководством проф. М.Р. Lefranc [16, 35] были проанализированы девять ДНК-маркеров из переменных регионов генного комплекса TCRG у французов, страдающих РА, по сравнению со здоровыми индивидами. При сравнении двух групп не обнаружено статистически значимых различий в частотах аллелей изученных маркеров. Различия также оставались недостоверными при стратификации пациентов по HLA-DR статусу или в соответствии с тяжестью заболевания [7].

По сообщению М. McDermott с соавт. высокоинформативный микросателлитный маркер D7S485 из локуса TCRG был протестирован в 26 семьях с повторными случаями РА. Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью двух методов: метода пораженных пар сибсов (ASP-анализ) и параметрического анализа сцепления с использованием аутосомно-доминантной и аутосомно-рецессивной моделей наследования

[43]. Проведенное исследование не обнаружило доказательств совместной сегрегации РА и генов TCRG.

Таким образом, как популяционные, так и семейные исследования не подтвердили участия генов, кодирующих γ -цепь Т-клеточных рецепторов, в патогенезе РА.

К сожалению, в доступной литературе нами не были обнаружены сообщения об изучении роли полиморфизма генов, кодирующих синтез δ -цепи Т-клеточного рецептора, в детерминации РА.

К настоящему времени опубликовано достаточно много работ, направленных на выявление генов, участвующих в формировании предрасположенности к РА. Неоднозначность полученных результатов, видимо, связана с малыми размерами выборок и ограниченным числом используемых маркеров, с применением малочувствительных статистических методов или с неадекватностью выбранной модели наследования.

ЛИТЕРАТУРА

- Беневоленская Л.И., Мякоткин В.А., Ондрашик М., Гёмер Б. Ревматоидный артрит. В кн.: Клинико-генетические аспекты ревматических болезней. М., Медицина, 1989, 100-113.
- Aho K., Koskenvuo M., Tuominen J. Occurrence of rheumatoid arthritis in nationwide survey of twins. *J. Rheumatol.*, 1986, 13, 899-902.
- Auger I., Roudier J. HLA-DR and the development of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*, 1997, 26(2), 123-128.
- Ball E.J., Dombrasusky L., Hoover M. et al. Rheumatoid arthritis is associated with a polymorphic restriction fragment of the human T cell receptor beta gene (abstract). *Arthr. Rheum.*, 1987, 30, 26.
- Blackwelder W.C., Elston R.C. A comparison of sib-pair linkage tests for disease susceptibility loci. *Genet. Epidemiol.*, 1985, 2, 85-97.
- Breedveld F.C., Verweij C.L. T cells in rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.*, 1997, 36, 617-621.
- Chaoui L., Lefranc M.P., Pellet F. et al. T cell receptor γ variable gene locus polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1992, 35(7), 756-760.
- Cornelis F., Faure S., Martinez M. et al. New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. *Genetics*, 1998, 95(18), 10746-10750.
- Cornelis F., Hardwick L., Flipo R.M. et al. Association of rheumatoid arthritis with an amino acid allelic variation of the T cell receptor. *Arthr. Rheum.*, 1997, 40(8), 1387-1390.
- Davis M.M. T cell receptor gene diversity and selection. *Ann. Rev. Biochem.*, 1990, 59, 475-496.
- Deighton C.M., Wensel J., Roberts D.F., Walker D.J. The concordance rates for rheumatoid arthritis in same-sexed and HLA-identical sibships. *Br. J. Rheumatol.*, 1989, 28 (suppl 2), 80.
- Doherty D.G., Penzotti J.E., Koelle D.M. et al. Structural basis of specificity and degeneracy of T cell recognition: pluriallelic restriction of T cell responses to a peptide antigen involves both specific and promiscuous interactions between the T cell receptor, peptide, and HLA-DR. *J. Immunol.*, 1998, 161, 3527-3535.
- Fries J.F., Wolfe F., Apple R. et al. HLA-DRB1 genotype associations in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort: frequency, severity, and treatment bias. *Arthr. Rheum.*, 2002, 46(9), 2320-2329.
- Funkhouser S.W., Concannon P., Charmley P. et al. Differences in T cell receptor restriction fragment length polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1992, 35, 465-471.
- Gao X., Olsen N.J., Pincus T., Stastny P. HLA-DR alleles with naturally occurring amino acid substitution and risk for development of rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1990, 33, 939-946.
- Ghanem N., Soua Z., Zhang X.G. et al. Polymorphism of the T-cell receptor gamma variable and constant region genes in a Chinese population. *Hum. Genet.*, 1991, 86, 450-456.
- Gregersen P.K., Silver J., Winchester R.J. The shared epitope hypothesis. An approach to understand the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1987, 30, 1205-1213.
- Gregersen P.K. Discordance for autoimmunity in monozygotic twins. Are "identical" twins really identical? *Arthr. Rheum.*, 1993, 36, 1185-1192.
- Hall F.C., Brown M.A., Weeks D.E. et al. A linkage study across the T cell receptor α and T cell receptor β loci in families with rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1997, 40(10), 1798-1802.
- Hameed K., Bowman S., Kondeatis E. et al. The association of HLA-DRB genes and the shared epitope with rheumatoid arthritis in Pakistan. *Br. J. Rheumatol.*, 1997, 36 (11), 1184-1188.
- Hong G.H., Park M.H., Takeuchi F. et al. Association of specific amino acid sequence of HLA-DR with rheumatoid arthritis in Koreans and its diagnostic value. *J. Rheumatol.*, 1996, 23(10), 1699-1703.
- Ibberson M., Peclat V., Guerne P.A. et al. Analysis of T cell receptor V alpha polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 1998, 57, 49-51.
- Ikeda Y., Masuko K., Nakai Y. et al. High frequencies of identical T cell clonotypes in synovial tissues of rheumatoid arthritis patients suggest the occurrence of common antigen-driven immune responses. *Arthr. Rheum.*, 1996, 39, 446-453.
- Jawaheer D., Li W., Graham R.R. et al. Dissecting the genetic complexity of the association between human leukocyte antigens and rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.*, 2002, 71(3), 585-594.
- Jawaheer D., Seldin M.F., Amos C.I. et al. Screening the genome for rheumatoid arthritis susceptibility genes. *Arthr. Rheum.*, 2003, 48(4), 906-916.
- Jawaheer D., Seldin M.F., Amos C.I. et al. A genomewide screen in multiplex rheumatoid arthritis families suggests genetic overlap with other autoimmune diseases. *Am. J. Hum. Genet.*, 2001, 68, 927-936.
- John S., Myerscough A., Marlow A. et al. Linkage of cytokine genes to rheumatoid arthritis. Evidence of genetic heterogeneity. *Ann. Rheum. Dis.*, 1998, 57, 361-365.
- John S., Myerscough A., Marlow A. et al. Linkage analysis studies of candidate genes in affected sib pair RA families. *Br. J. Rheumatol.*, 1997, 36 (suppl 367), 190.
- Khani-Hanjani A., Lacaille D., Horne C. et al. Expression of QK/QR/RRRAA or DERRAA motifs at the third hypervariable region of HLA-DRB1 and disease severity in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 2002, 29(7), 1358-1365.
- Klimiuk R.A., Yang J., Goronzy J.J., Weyand C.M. Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. *Clin. Immunol.*, 1999, 90, 65-78.
- Kohsaka H., Nanki T., Ollier W.E. et al. Influence of the rheumatoid arthritis-associated shared epitope on T-cell receptor repertoire formation. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 1996, 108, 323-328.
- Kurokawa M., Kato T., Masuko-Hongo K. et al. Characterisation of T cell clonotypes that accumulated in multiple joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum.*

- Dis., 1999, 58(9), 546-553.
33. Lacki J.K., Korcowska I., Mackiewicz S.H. The role of MHC class II genes in the etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Przegl. Lek.*, 1998, 55(10), 524-527.
 34. Lander E., Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat. Genet.*, 1995, 11, 241-247.
 35. Lefranc M.P., Rabbitts T.H. Genetic organization of the human T-cell receptor γ and δ loci. *Res. Immunol.*, 1990, 141, 565-577.
 36. Litz C.E., Taylor K.A., Qui J.S. et al. Absence of detectable chromosomal and molecular abnormalities in monozygotic twins discordant for Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 1988, 30, 821-833.
 37. Low A.S., Gonzalez-Gay M.A., Akil M. et al. TNF+489 polymorphism does not contribute to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2002, 20(6), 829-832.
 38. Lubinsky M.S., Hall J.G. Genomic imprinting, monozygous twinning, and X inactivation. *Lancet*, 1991, 337, 1288.
 39. Lunardi C., Ibberson M., Zeminian S. et al. Lack of association of T cell receptor V beta 8 polymorphism with rheumatoid arthritis in United Kingdom and Italian white patients. *Ann. Rheum. Dis.*, 1994, 53(5), 341-343.
 40. MacGregor A.J., Rigby A.S., Ollier W., Silman A.J. An estimation of the relative genetic and environmental contribution to rheumatoid arthritis based on co-variance analysis of twin data. *Br. J. Rheumatol.*, 1995, 33, 158.
 41. MacGregor A.J., Snieder H., Rigby A.S. et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthr. Rheum.*, 2000, 43(1), 30-37.
 42. MacKay K., Eyre S., Myerscough A. et al. Whole-genome linkage analysis of rheumatoid arthritis susceptibility loci in 252 affected sibling pairs in the united kingdom. *Arthr. Rheum.*, 2002, 46 (3), 632-639.
 43. McDermott M., Hsu C., Molloy M.G. et al. Non-linkage of a T cell receptor γ chain microsatellite (D7S485) to rheumatoid arthritis in multiplex families. *J. Autoimmunity*, 1995, 8(1), 131-138.
 44. McDermott M., Kastner D.L., Holloman J.D. et al. The role of T cell receptor chain genes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1995, 38, 91-95.
 45. McDonagh J.E., Dunn A., Ollier W., Wolker D.J. Compound heterozygosity for the shared epitope and the risk and severity of rheumatoid arthritis in extended pedigrees. *Br. J. Rheumatol.*, 1997, 36, 322-327.
 46. Milner C.M., Campbell R.D., Trowsdale J. Molecular genetics the human Major Histocompatibility Complex. In: Lechler R, Warrens A, ed. *HLA in health and disease*. 2d ed. London: Academic press., 2000, 35-46.
 47. Mody G.M., Hammond M.G. Differences in HLA-DR association with rheumatoid arthritis among migrant Indian communities in South Africa. *Br. J. Rheumatol.*, 1994, 33, 425-427.
 48. Moreland L.W., Heck I.W., Koopman W.J. et al. Vb17 T-cell rexp for vaccine: results of a phase I dose-finding study in patients with rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1994, 37, 28.
 49. Morton N.E. Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.*, 1955, 7, 277-318.
 50. Mu H., Charnley P., King M.C., Criswell L.A. Synergy between T cell receptor γ gene polymorphism and HLA-DR4 in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1996, 39(6), 931-937.
 51. Mu H., Criswell L.A., King M.C. Allelic variation of T cell receptor V6.7 gene is associated with HLA-DR4+ RA. *Arthr. Rheum.*, 1994, 37 (suppl 9), 277.
 52. Ott J. *Analysis of human genetic linkage*. 3d ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 1999, 38-52.
 53. Panayi G.S. T-cell - dependent pathways in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 1997, 9, 236-240.
 54. Penzotti J.E., Doherty D., Lybrand T.P., Nepom G.T. A structural model for TCR recognition of the HLA class II shared epitope sequence implicated in susceptibility to rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.*, 1996, 9(2), 287-293.
 55. Penzotti J.E., Nepom G.T., Lybrand T.P. Use of cell receptor/HLA-DRB1*04 molecular modeling to predict site-specific interaction for the DR shared epitope associated with rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1997, 40(7), 1316-1326.
 56. Reveille J.D., Alarcon G.S., Fowler S.E. et al. HLA-DRB1 genes and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1996, 39, 1802-1807.
 57. Richards C.S., Watkins S.C., Hoffman E.P., Schneider N.R. et al. Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.*, 1990, 46, 672-681.
 58. Rigby A.S., Silman A.J., Voelm L. et al. Investigating the HLA component of rheumatoid arthritis: an additive (dominant) mode of inheritance is rejected, a recessive mode is preferred. *Genet. Epidemiol.*, 1991, 8, 153-175.
 59. Seidl C., Koch U., Buhleier T. et al. Association of (Q)R/KRAA positive HLA-DRB1 alleles with disease progression in early active and severe rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 1999, 26(4), 773-776.
 60. Shiozawa S., Hayashi S., Tsukamoto Y. et al. Identification of the gene loci that predispose to rheumatoid arthritis. *Int. Immunol.*, 1998, 10(12), 1891-1895.
 61. Silman A.J., MacGregor A.J., Thomson W. et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br. J. Rheumatol.*, 1993, 32(10), 903-907.
 62. Singal D.P., Li J., Lei K. Genetics of rheumatoid arthritis (RA): two separate regions in the major histocompatibility complex contribute to susceptibility to RA. *Immunol. Lett.*, 1999, 69(3), 301-306.
 63. Singal D.P., Li J., Ye M., Lei K. D6S273 microsatellite polymorphism and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*, 1998, 52(4), 353-358.
 64. Stechner R.M., Hersh A.H., Solomon W.H. et al. The genetics of rheumatoid arthritis; analysis of 224 families. *Am. J. Hum. Genet.*, 1953, 5, 118.
 65. Steiner G., Tohidast-Akrad M., Witzmann G. et al. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatol.*, 1999, 38, 202-213.
 66. Striebach C.C., Falta M.T., Wang Y. et al. Selective accumulation of related CD4+ T cell clones in the synovial fluid of patients with Rheumatoid arthritis. *J. Immunol.*, 1998, 161, 4428-4436.
 67. Svendsen A.J., Holm N.V., Kyvik K. et al. Relative importance of genetic effects in rheumatoid arthritis: historical cohort study of Danish nationwide twin population. *BMJ.*, 2002, 324, 264.
 68. Tarp V., Grauda H.K. Seropositive rheumatoid arthritis in monozygotic twin sisters carrying HLA-DR4 associated with B27. *J. Rheumatol.*, 1989, 16, 1530-1532.
 69. Valenzuela A., Gonzalez-Escribano M.F., Rodriguez R. et al. Association of HLA shared epitope with joint damage progression in rheumatoid arthritis. *Hum. Immunol.*, 1999, 60(3), 250-254.
 70. Vandevyver C., Gu X.X., Geusens P. et al. HLA class II and T-cell receptor beta chain polymorphisms in Belgian patients with rheumatoid arthritis: no evidence for disease association with the TCRBC2, TCRBV8 and TCRBV11 polymorphisms. *Ann. Rheum. Dis.*, 1994, 53(9), 580-586.
 71. Vries N., Elderen C., Tijssen H. et al. No support for HLA-DQ encoded susceptibility in rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1999, 42, 1621-1627.
 72. Vries N., Tijssen H., Jarvinen P., Aho K. et al. HLA-DRB1 in eight Finnish monozygotic twin pairs concordant for rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*, 1997, 49, 277-277.
 73. Wakitani S., Murata N., Toda Y. et al. The relationship between HLA-DRB1 alleles and disease subsets of rheumatoid arthritis in Japanese. *Br. J. Rheumatol.*, 1997, 36, 630-636.
 74. Walser-Kuntz D.R., Weyand C.M., Fulbright J.W. et al. HLA-DRB1 molecules and antigenic experience shape the repertoire of CD4 T cells. *Hum. Immunol.*, 1995, 44(4), 203-209.
 75. Walser-Kuntz D.R., Weyand C.M., Weaver A.J. et al. Mechanisms underlying the formation of the T cell receptor repertoire in rheumatoid arthritis. *Immunity*, 1995, 2, 597-605.
 76. Wasmuth A.G., Veale M.O., Palmer D.G., Righton T.C. Prevalence of rheumatoid arthritis in families. *Ann. Rheum. Dis.*, 1972, 31, 85.
 77. Weyand C.M., Hicok K.C., Conn D.L., Goronzy J.J. The influ-

- ence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.*, 1992, 117 (10), 801-806.
78. Wilson A.G., Vries N., Putte L.B., Duff G.W. A tumour necrosis factor alpha polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 1995, 54, 601-603.
79. Wolfe F., Kleinheksel S.M., Khan M.A. Prevalence of familial occurrence in patients with rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.*, 1988, 27 (suppl. 2), 150-152.
80. Wordsworth B.P., Bell J.I. The immunogenetics of rheumatoid arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1992, 14, 59-78.
81. Wordsworth P., Bell J. Polygenic susceptibility in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 1991, 50(6), 343-346.
82. Wordsworth P., Pile K.D., Buckely J.D. et al. HLA Heterozygosity contributes to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.*, 1992, 51, 585-591.
83. Yamada R., Tanaka T., Ohnishi Y. et al. Identification of 142 single nucleotide polymorphisms in 41 candidate genes for rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Hum. Genet.*, 2000, 106(3), 293-297.
84. Yang H., Rittner H., Weyand C.M., Goronzy J.J. Aberrations in the primary T-cell receptor repertoire as a predisposition for synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J. Invest. Med.*, 1999, 47(5), 236-245.

Поступила 12.01.04