

3
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Lycaena thersamon (Esper, 1784)
Червонец блестящий
Шовкун Д.Ф.



2019

УЧРЕДИТЕЛЬ
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.5-002.525.2-053.2:575.174.015.3

И.А. Козыро¹, А.В. Сукало¹, Е.С. Синявская², Р.И. Гончарова²

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ИММУННОГО И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА (STAT4, PD-1, PD-L1) НА РИСК РАЗВИТИЯ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ (СКВ) У ДЕТЕЙ

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

² Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Цель. Провести анализ результатов генотипирования выборки детей, страдающих СКВ и СКВ с люпус-нефритом (ЛН), по локусам STAT4 (rs3821236), PD-1 (rs11568821), PD-L1 (rs2297136) в сравнении с контрольной группой детей без каких-либо аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Материалы и методы. Пациенты Республиканского Центра детской нефрологии и заместительной почечной терапии и кардиологического отделений УЗ «2-я детская клиническая больница» г. Минска с установленными диагнозами СКВ (n=7), СКВ с люпус-нефритом (n=18); контроль – дети без аутоиммунных и острых воспалительных заболеваний (n=67–80). Объект исследования – геномная ДНК, выделенная из образцов периферической цельной крови стандартным фенол-хлороформным методом.

Результаты. Частота полиморфных вариантов генов STAT4 (rs3821236), PD-1 (rs11568821), PD-L1 (rs2297136) исследована в группе детей с СКВ без поражения почек и с люпус-нефритом (n=25) по сравнению с детьми контрольной группы (n=80).

Заключение. Анализ распределения частот генотипов/аллелей по полиморфному локусу rs3821236 STAT4 выявил статистически значимую ассоциацию суммы генотипов, имеющих в своем составе хотя бы один минорный аллель (GG vs. GA+AA) с риском развития СКВ (p = 0,04 OR 2,54 [1,04–6,41]) для группы детей с СКВ без поражения почек и с наличием почечной патологии, что имеет потенциальную практическую ценность для диагностики. При анализе полиморфных локусов PDCD1 (rs11568821) и PD-L1 (rs2297136) не выявлено статистически значимых различий между исследованными группами.

Ключевые слова: системная красная волчанка, люпус-нефрит, дети, генетический полиморфизм, PD-1, PD-L1, STAT4.

I.A. Kazyra¹, A.V. Sukalo¹, E.S. Sinyavskaya², R.I. Goncharova²

STUDY OF INFLUENCE OF IMMUNE AND INFLAMMATORY RESPONSE GENE POLYMORPHISM (STAT4, PD-1, PD-L1) ON THE RISK OF DEVELOPMENT OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS (SLE) IN CHILDREN

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

² Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Objective. To analyze the results of genotyping in children suffering from SLE and SLE with lupus nephritis (LN) at the loci STAT4 (rs3821236), PD-1 (rs11568821), PD-L1 (rs2297136) in comparison with the control group of children without autoimmune and inflammatory diseases.

Materials and methods. Patients from the National Center for Pediatric Nephrology and Renal Replacement Therapy and Cardiology Department of the “2nd Children's Clinical Hospital” Minsk with established diagnoses of SLE (n=7), SLE with lupus nephritis (n=18) and control (children without autoimmune and inflammatory diseases [n = 7–80]). Object of study - genomic DNA isolated from samples of peripheral whole blood using the standard phenol-

chloroform method.

Results. Frequency of STAT4 (rs3821236), PD-1 (rs11568821), PD-L1 (rs2297136) gene polymorphisms was studied in children with systemic lupus erythematosus without renal manifestations and with nephritis (n = 25) and in the controls (n = 80).

Conclusion. Analysis of genotype/allele frequency distribution of rs3821236 STAT4 revealed that genotypes containing at least one minor allele (GA+AA) are associated with SLE (p = 0,04 OR 2,54 [1,04–6,41]). Our findings are of the potential practical value for diagnostics. No differences of statistical significance between examined sets of patients and controls were found in our analysis of genotype and allele frequency distribution of PDCD1 (rs11568821), PD-L1 (rs2297136) polymorphisms.

Key words: Systemic lupus erythematosus, Lupus nephritis, Children, Genetic polymorphism, PD-1, PD-L1, STAT4.

Введение

Системная красная волчанка (СКВ) – аутоиммунное заболевание, при котором разнообразные иммунологические события приводят к сходной клинической картине, характеризующейся широким спектром проявлений и поражением органов-мишеней с непредсказуемыми периодами обострений и ремиссий [1]. Люпус-нефрит (ЛН) считается одним из наиболее серьезных осложнений СКВ и основным предиктором неблагоприятного прогноза. Поражение почек при СКВ, дебютировавшей в детском возрасте, случается до 80% случаев, то есть в 2 раза чаще в сравнении с теми, у кого манифестация произошла во взрослой жизни (около 40%). У детей заболевание ассоциируется с более серьезным мультиорганным поражением и агрессивной терапией по сравнению со взрослыми. Крайне тяжелое течение заболевания, необходимость пожизненного экономически затратного лечения обуславливают социальную значимость болезни и большую актуальность изучения молекулярно-генетической природы СКВ. Существующие клинико-лабораторные методы диагностики недостаточно специфичны и информативны для раннего выявления этой патологии, не позволяют зарегистрировать изменения, происходящие на донозологических стадиях болезни и прогнозировать развитие ЛН. В последние десятилетия интенсивно изучается генетическая природа многофакторных заболеваний почек, что позволило установить превалирующую роль генетических факторов в этиологии и патогенезе СКВ и ЛН [2, 3].

Цель данной работы – провести анализ результатов генотипирования выборки детей, страдающих СКВ и СКВ с ЛН, по локусам STAT4 (rs3821236), PD-1 (rs11568821), PD-L1 (rs2297136), в сравнении с контрольной группой детей без каких-либо аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Материалы и методы

Группы исследования включали пациентов нефрологического отделения Республиканского Центра детской нефрологии и заместительной почечной терапии и кардиологического отделений УЗ «2-я детская клиническая больница» г. Минска с установленными диагнозами СКВ (n=7), СКВ с люпус-нефритом (n=18), а также детей без аутоиммунных и острых воспалительных заболеваний (n=67–80).

Объект исследования – геномная ДНК, выделенная из образцов периферической цельной крови детей стандартным фенол-хлороформным методом.

Выбор генов для анализа обусловлен литературными данными о вовлеченности продуктов данных генов в функционирование и регуляцию иммунных реакций. Полиморфные варианты PD-1 (rs11568821), PD-L1 (rs2297136), STAT4 (rs3821236) определялись с помощью ПЦР-ПДРФ метода согласно протоколам, разработанным в лаборатории на основе опубликованных рекомендаций [4, 5]. Условия амплификации, последовательности олигонуклеотидов (ОДО «Праймтех») и эндонуклеазы рестрикции (New England Biolabs®) указаны в таблице 1.

Таблица 1. Условия генотипирования изученных SNP

| Локус | Праймеры | Условия ПЦР | Ферменты и продукты рестрикции (п.о.) |
|-------------------------------|-----------------------------|--|---|
| <i>PD-1</i> rs1156 8821 | F: CAGGACTCACATTCTATTATAG | 37 циклов: 95°C – 30 с, 54,2°C – 20 с, 72°C – 30 с. | PstI-HF, GG (дикий тип): 293; GA : 100+193+293; AA: 100+193 |
| | R: AGATAAGAAATGACCAAGC | | |
| PD-L1 rs2297 136 | F: GGAGACGTAATCCAGCATTTGGAA | 37 циклов: 95°C – 20 с, 53,2°C – 20 с, 72°C – 30 с. | PspOMI, CC (дикий тип): 101+165; CT: 266+101+165; TT: 266 |
| | R: TGTCACAGGCGTCGATGAG | | |
| <i>STAT4</i> rs3821 236 | F: CCCTGAGATTAAATGCTG | 37 циклов: 95°C – 20 с, 54°C – 20 с, 72°C – 30 с. | BanI, GG (дикий тип): 157+161; GA:318+157+161; AA: 318 |
| | R: AGCAGGATAGAATTAAGAGG | | |

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета стандартных программ MS Excel 2010 и Statistica 6.0. Различия в распределении частот аллелей/генотипов в исследуемых группах опре-

деляли с помощью критерия χ^2 или точного критерия Фишера. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Влияние каждого исследуемого локуса на вероятность развития СКВ определяли на основе показателя отношения шансов OR и 95% доверительного интервала CI.

Результаты и обсуждение

Демографическая характеристика групп исследования (пациентов с установленным диагнозом СКВ и СКВ с ЛН), а также детей без аутоиммунных и воспалительных заболеваний представлена в таблице 2.

Таблица 2. Демографическая характеристика групп обследования

| Исследуемые параметры | Группа пациентов (25) | Контроль rs3821236 STAT4 (75) | Контроль rs11568821 PD-1 (67) | Контроль rs2297136 PD-L1 (80) |
|--|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Соотношение по полу (девочки/мальчики), % | 92,0 / 8,0 | 66,2 / 33,8 | 58,8 / 41,2 | 65,0 / 35,0 |
| Средний возраст, лет ($m \pm SD$)* | 13,9 \pm 3,8 | 14,3 \pm 6,7 | 14,4 \pm 6,3 | 14,4 \pm 6,3 |
| Максимальный / минимальный возраст (лет) | 17 / 10 | 17 / 6 | 17 / 6 | 17 / 6 |
| <i>Примечание: * – $m \pm SD$ (среднее значение плюс стандартное отклонение).</i> | | | | |

Статистически значимых различий по среднему возрасту между исследуемыми группами выявлено не было. В группе пациентов (с диагнозами «СКВ+ЛН» и «СКВ») доминируют девочки, что согласуется с общеизвестными данными по заболеваемости [1]. Контрольные группы были специально подобраны с преобладанием девочек. Количество пациентов контрольной группы несколько различалось в случае каждого исследованного гена.

Основную часть контрольной группы составили пациенты с вегетативными дисфункциями (95%). Для верификации диагноза ЛН пациентам с СКВ выполняли биопсию почечной ткани, класс нефрита определяли в соответствии с критериями Международного общества нефрологов и Общества нефропатологов (ISN/RPS) 2004 г. [1, 6]. Исходя из характеристики группы обследованных пациентов с СКВ и СКВ с ЛН, самым частым вариантом поражения почек при СКВ являлся люпус-нефрит IV класса ($n=13$) – диффузный пролиферативный гломерулонефрит (52% от общей выборки пациентов, 72,2% от числа пациентов с СКВ+ЛН), что также согласуется с данными ли-

тературы [1]. В группу также вошли 3 ребенка с ЛН II класса, 1 – с ЛН III класса и 1 – с ЛН V класса.

В группе пациентов с СКВ и СКВ с ЛН было изучено распределение частот генотипов/аллелей по ряду полиморфных локусов в сравнении с госпитальным контролем; в таблице 3 представлены данные, касающиеся полиморфизмов генов PDCD1, PD-L1 и гена STAT4.

Таблица 3. Распределение частот аллелей и генотипов по изучаемым полиморфным локусам среди пациентов с СКВ и СКВ+ЛН и в группе контроля

| SNP | Пациенты | | Контроль | |
|------------------------|-----------|-------------------------|-----------|------|
| Генотипы/аллели | n | % | n | % |
| PD-1 rs11568821 | 25 | | 67 | |
| GG | 25 | 100 | 67 | 100 |
| GA | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AA | 0 | 0 | 0 | 0 |
| G | 50 | 100 | 134 | 100 |
| A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PD-L1 rs2297136 | 25 | | 80 | |
| CC | 6 | 24,0 | 23 | 28,8 |
| CT | 6 | 20,0 | 31 | 38,8 |
| TT | 13 | 52,0 | 26 | 32,5 |
| C | 18 | 36,0 | 77 | 48,1 |
| T | 32 | 64,0 | 83 | 51,9 |
| STAT4 rs3821236 | 25 | | 75 | |
| GG | 12 | 48,0 | 54 | 70,7 |
| GA | 12 | 48,0 | 19 | 24,0 |
| AA | 1 | 4,0 | 4 | 5,3 |
| G | 36 | 75,0 | 127 | 82,7 |
| A | 14 | 28,0 | 27 | 17,3 |
| GA+AA | 13 | 52,0¹ | 23 | 29,9 |

Примечание: 1 p=0,04 OR 2,54 [1,01 – 6,41] (GG vs. GA + AA).

Для интронного полиморфизма rs11568821 (также PD1.3G/A или 7146 G/A) гена PDCD1 по результатам ПЦР-ПДРФ анализа для всех пациентов (n=25) и детей группы контроля (n=67) был установлен один и тот же генотип – гомозигота GG по аллелю дикого типа. Тот факт, что полиморфный вариант PD1.3A не был обнаружен, можно объяснить небольшим размером исследованной нами выборки и меньшей относительно аллеля G частотой встречаемости (MAF) аллеля A в выборках других исследований [2, 7-9].

Таким образом, осуществить поиск ассоциаций между аллелями / генотипами данного полиморфизма и СКВ у детей в рамках проведенного исследования нам не удалось. Тем не менее, имеется ряд исследований, где ассо-

циация полиморфного варианта гена PDCD1 rs11568821 с СКВ подтверждается. Так, L. Prokunina с соавт. [4] показали, что аллель А этого локуса связан с развитием СКВ именно в европейской популяции. Он был обнаружен у 12% пациентов по сравнению с группой контроля – 5% ($p=0,00001$; 95% CI 1,6–4,4). По результатам метаанализа, проведенного J.-L. Liu с коллегами [10], среди европейцев не-испанского происхождения (совокупная выборка из 2909 пациентов и 3995 контрольных индивидов) наблюдалась статистически значимая ассоциация между аллелем А по локусу PD-1 (rs11568821) и риском развития СКВ ($p=0,002$; OR 1,290 [1,098–1,516]). Исследование, проведенное M. Johansson с соавт. [12] на популяции северного региона Швеции (размер выборки пациентов $n=260$), выявило ассоциацию аллеля А с люпус-нефритом ($p = 0,005$; OR 2,71 [1,32–5,55]), но не с риском развития основного заболевания – СКВ.

Полиморфизм rs11568821 локализован в энхансеро-подобном участке 4 интрона гена PD-1, обогащенном сайтами связывания транскрипционных факторов. Аллель А предположительно нарушает сайт связывания транскрипционного фактора RUNX1, и подобное нарушение может приводить к изменениям в транскрипции гена [8].

По результатам генотипирования полиморфного локуса rs2297136 (PD-L1) достоверных ассоциаций частот встречаемости аллелей/генотипов с риском развития СКВ выявить не удалось. Локус rs2297136 С/Т гена PD-L1 расположен в микроРНК комплементарном сайте 3'–UTR B7-H1, и, возможно, влияет на регуляцию экспрессии данного гена с помощью микроРНК [11].

В работе А.К. Abelson с соавт. [7] также не было установлено ассоциации аллельных вариантов генов PD-L1 и PD-L2 с СКВ. Тем не менее, тот факт, что паттерны экспрессии PD-L1 в не-лимфоидных тканях и его взаимодействие с PD-1 могут определять интенсивность иммунного ответа, указывает на актуальность изучения вклада полиморфных локусов гена PD-L1 в предрасположенность к СКВ [13].

Анализ распределения частот генотипов/аллелей по полиморфному локусу rs3821236 STAT4 выявил статистически значимую ассоциацию суммы генотипов, имеющих в своем составе хотя бы один минорный аллель (GG vs. GA+AA) с развитием СКВ ($p=0,04$; OR 2,54 [1,01–6,41]). Эти данные дают основания полагать, что минорный аллель А является рискованным аллелем для белорусской популяции.

Действительно, А.К. Abelson в 2008 г. выявила рисковую значимость минорного аллеля А rs3821236 STAT4 при изучении шведской популяции. В дальнейших исследованиях, проведенных на больших когортах разного этнического происхождения, была подтверждена достоверная ассоциация локуса rs3821236 гена STAT4 (рисковый аллель А, $p=7,07 \times 10^{-8}$) с возникновением СКВ для нескольких популяций, но вместе с тем отмечены этнические различия [7]. В нашем исследовании ограниченной когорты белорусских пациентов частота минорного аллеля А составила 28,0% по сравнению с 17,3% в контрольной группе, что практически совпадает с данными для испанской когорты – 31 и 20% соответственно [9, 11]. Можно полагать, что с увеличением размера белорусской когорты будет доказана статистически значимая рисковая роль минорного аллеля А.

Вместе с тем необходимо отметить, что не всегда аллелем риска является минорный аллель однонуклеотидного полиморфизма. Так, опубликованы сведения о том, что гетерозиготный генотип может вносить статистически значимый вклад в риск развития заболевания [5, 8]. В работе А.К. Abelson с соавт. [7] было установлено, что уровни экспрессии мРНК для генотипов GA и AA rs3821236 STAT4 были статистически значимо выше уровня экспрессии генотипа GG ($p=0,02$). Это дает основания предположить, что генотип, содержащий хотя бы один аллель А, участвует в формировании риска возникновения СКВ. Известно, что маркеры риска многофакторных заболеваний могут в той или иной степени отличаться для этнически разных популяций. Что касается СКВ и ЛН, то взаимная связь между rs3821236 гена STAT4 и СКВ была подтверждена несколькими исследовательскими группами для ряда европеоидных популяций [9-11], но не показана для германской популяции [9]. В то же время В. Namjou с соавт. [11] отметили связь локуса rs3821236 с риском развития СКВ как у европейцев ($p=3,41 \times 10^{-11}$), так и для корейской популяции ($p=2,72 \times 10^{-7}$).

Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют, что ген STAT4, критический регулятор иммунных ответов, является геном предрасположенности для СКВ. Установлено, что несколько полиморфизмов гена STAT4 являются генетическими вариантами риска возникновения и развития СКВ и ЛН, при этом полиморфные варианты rs3821236 и rs3024866 являются наиболее эффективными, за которыми следуют rs7574865 и rs1467199 [11]. Важно отметить, что rs3821236 и rs7574865 представляют собой два различ-

ных и независимых генетических варианта риска развития СКВ, роль которых, по-видимому, варьирует в разных популяциях [12, 13]. Масштабное исследование К.Е. Taylor с коллегами выявило связь между rs7574865 STAT4 и наличием ЛН и анти-дцДНК антител у выборки пациентов с СКВ европейского происхождения [14]. Дальнейшие исследования белорусской когорты позволят выяснить вклад различных полиморфизмов гена STAT4 в формирование риска СКВ и ЛН для жителей Республики Беларусь.

Заключение

Нами исследовано влияние трех полиморфных локусов (rs11568821, rs2297136, rs3821236) генов иммунного и воспалительного ответа на риск развития СКВ. Среди пациентов с СКВ с поражением почек наиболее распространенным был люпус-нефрит IV класса. В общей группе детей с СКВ без поражения почек и с наличием почечной патологии частоты генотипов/аллелей по полиморфным локусам PDCD1 (rs11568821) и PD-L1 (rs2297136) статистически значимо не отличались от соответствующих показателей контрольной группы. При анализе распределения частот генотипов/аллелей для rs3821236 (STAT4) была выявлена статистически значимая ассоциация суммы генотипов, имеющих в своем составе хотя бы один минорный аллель (GG vs. GA+AA) с риском развития СКВ ($p=0,04$; OR 2,54 [1,01–6,41]).

Результаты исследования планируется валидировать на больших выборках с привлечением в анализ полиморфных вариантов других генов иммунного и воспалительного ответа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsokos G.C. et al. Systemic lupus erythematosus: Basic, applied and clinical aspects / Ed. by G. C. Tsokos. Elsevier Academic Press, 2016. 572 p.
2. Mohan C., Putterman C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. Nat Rev Nephrol. 2015.
3. Keir M.E. et al. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. Annual Review of Immunology. 2008.
4. Prokunina L. et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. Nat Genet. 2002.
5. Nishikomori R. Activated STAT4 has an essential role in Th1 differentiation and proliferation that is independent of its role in the maintenance of IL-12R beta 2 chain expression and signalling. J Immunol. 2002. 169: 4388-4398.
6. Weening J.J. et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. Journal of the American Society of Nephrology. 2004. 15: 241-250.
7. Abelson A.K. STAT4 Associates with SLE Through Two Independent Effects that Correlate with Gene Expression and Act Additively with IRF5 to Increase Risk. Annals of the rheumatic diseases. 2009.

8. Rhodes B., Vyse T.J. The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology*. 2008. 47: 1603-1611.
9. Nasonov E. et al. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus (SLE) in selected cities from three Commonwealth of Independent States countries (the Russian Federation, Ukraine and Kazakhstan). *Lupus*. 2014. V. 23(2).
10. Liu J.-L. et al. Association between the PD1.3A/G polymorphism of the PDCD1 gene and systemic lupus erythematosus in European populations: a meta-analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2009. 23: 425-432.
11. Namjou B., Sestak A.L., Armstrong D.L. et al. High-density genotyping of STAT4 reveals multiple haplotypic associations with systemic lupus erythematosus in different racial groups. *Arthritis Rheum*. 2009. 60(4): 1085-1095. DOI: 10.1002/art.24387.
12. Johansson M., Arlestig L., Bozena M. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2005. 52(6): 1665-1669. DOI 10.1002/art.21058.
13. Dai S., Jia R., Zhang X., Fang Q., Huang L. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. *Cell Immunol*. 2014. 290 (1): 72-79. DOI: 10.1016/j.cellimm.2014.05.006.
14. Taylor K.E., Remmers E.F., Lee A.T. et al. Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *PLoS genetics*. 2008. 4(5): e1000084. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000084.

Поступила 16 сентября 2019 г.

(Контактная информация: Козыро Инна Александровна – к.м.н., доцент 1-й кафедры детских болезней УО БГМУ; адрес: 220116, г. Минск, пр. Дзержинского, 83; тел. +375173695761; e-mail: kozyroia@mail.ru)

Образец ссылки на статью:

Козыро И.А., Сукало А.В., Синявская Е.С., Гончарова Р.И. Исследование влияния полиморфизма генов иммунного и воспалительного ответа (STAT4, PD-1, PD-L1) на риск развития системной красной волчанки (СКВ) у детей. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2019. 3. 9с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2019-3/Articles/KIA-2019-3.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2019-13023