

Полиморфизм гена интерлейкина-12 (*IL12B*) у больных рассеянным склерозом и здоровых лиц

Алифирова В.М.¹, Орлова Ю.Ю.¹, Титова М.А.¹, Чердынцева Н.В.², Николаева Т.Н.¹

Polymorphism of a gene *IL12B* in patients with multiple sclerosis and healthy persons

Alifirova V.M., Orlova Yu.Yu., Titova M.A., Cherdyntseva N.V., Nikolayeva T.N.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, г. Томск

© Алифирова В.М., Орлова Ю.Ю., Титова М.А. и др.

Обследовано 62 пациента с различными типами течения рассеянного склероза, средний возраст которых составил $(31,8 \pm 1,2)$ года. Проведено генотипирование с помощью полимеразной цепной реакции по полиморфному варианту 1188A/C гена *IL12B* в 3'-нетранслируемой области и обнаружена не только более высокая частота аллеля С гена *IL12B* у больных РС по сравнению со здоровыми лицами, но также выявлена ассоциация с более активным течением болезни. При анализе иммунологических показателей больных в зависимости от генотипа *IL12B* у носителей аллеля С отмечена тенденция к уменьшению абсолютного содержания зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺-клеток) наряду с увеличением процентного содержания клеток CD25⁺ и CD95⁺.

We examined of 62 patients with various types of multiple sclerosis current, which middle age has made $(31,8 \pm 1,2)$ years. It has been lead genotyping by means of PCR by a polymorphic variant 1188A/C gene *IL12B* in 3'-not broadcast area and has been found out not only higher frequency of alleles C of a gene *IL12B* in comparison with healthy persons, but also the association with more active of MS current is revealed. At the analysis of immunological parameters of patients depending on a genotype *IL12B*, it has been found at carriers alleles C the tendency to reduction absolute maintenance of mature T-lymphocytes and increase CD 25⁺ and CD95⁺.

Введение

До настоящего времени мало известно о генетической основе аутоиммунных заболеваний. Предполагается, что полиморфизм генов цитокинов может объяснять вариабельность иммунного и воспалительного ответа у разных индивидов. Ключевую роль в поляризации иммунного ответа играет интерлейкин-12 (ИЛ-12), продуцируемый макрофагами гетеродимер, состоящий из субъединиц 35 и 40 кДа, первая (субъединица p35) кодируется геном *IL12A*, а вторая (p40) — геном *IL12B* [1]. Биологическая роль ИЛ-12 заключается в том, что он стимулирует пролиферацию, продукцию интерферона- γ (ИФН- γ) и развитие иммунного ответа, связанного с Т-хелперами 1 типа

(Th1), в связи с чем этот интерлейкин считается ключевым в поляризации иммунного ответа и в развитии целого ряда аутоиммунных заболеваний, включая рассеянный склероз (РС) [2].

Кроме того, есть сведения о том, что данный цитокин может мобилизовать натуральные киллеры лимфоидных органов при развитии аутоиммунного процесса, что также вызывает большой интерес исследователей [3].

Имеются сведения о том, что аллель С полиморфного варианта 1188A/C гена интерлейкина-12 (*IL12B*), расположенный в 3'-нетранслируемой области, понижает экспрессию *IL12B*, в то время как генотип A/A ассоциирован с повышением экспрессии ИЛ-12 *in vitro* [4], однако сведения о функциональном эффекте этого полиморфизма

ИЛ-12 остаются противоречивыми. В частности, при исследовании полиморфизма гена ИЛ-12 и исхода вирусного гепатита С, заболевания, связанного с Th1-типом иммунного ответа, отмечена хронизация воспалительного ответа у пациентов, являющихся носителями генотипа А/А, что, по мнению авторов, ассоциировано с более низкой продукцией ИЛ-12 [5].

Полиморфизм гена ИЛ-12 также изучался при рассеянном склерозе, однако проведено очень небольшое количество исследований, а результаты их противоречивы. Если в одном исследовании выявлялась ассоциация генотипа А/А с восприимчивостью к РС [6], то в другом она не подтверждалась [7].

Цель настоящего исследования — изучение полиморфизма гена интерлейкина-12 (IL12B) у больных рассеянным склерозом и у здоровых лиц, анализ иммунологических показателей больных в зависимости от генотипа IL12B, а также выявление ассоциации аллелей А и С гена IL12B в 3'-нетранслируемой области с активностью течения РС.

Материал и методы

Всего среди обследованных лиц было 44 женщины и 18 мужчин, соотношение полов 2,4 : 1,0. У 49 человек отмечался ремиттирующий тип течения заболевания, у 8 вторично прогрессирующий, в 2 случаях — первично прогрессирующий.

Следует подчеркнуть, что в этой выборке отчетливо преобладают пациенты с ремиттирующим течением заболевания, в связи с чем не проводили анализ в зависимости от типа течения РС. Средний возраст пациентов составлял ($31,8 \pm 1,2$) года (медиана 30 лет), средний возраст к началу заболевания был ($24,2 \pm 1,0$) года (медиана 23 года). Средняя продолжительность болезни к моменту исследования составляла ($7,5 \pm 0,8$) года (медиана 6 лет), а длительность первой ремиссии (при ремиттирующем и вторично прогрессирующем типах течения) ($2,4 \pm 0,3$) года (медиана 1 год). За время лечения количество обострений составляло в сред-

нем ($4,30 \pm 0,2$) случая (медиана 4); при этом среднегодовая частота обострений была ($0,87 \pm 0,08$) случая (медиана 0,67). Степень инвалидизации по шкале Куртцке (EDSS) составляла ($3,03 \pm 0,14$) балла (медиана 3 балла); суммарный неврологический дефицит (СНД) по функциональным системам — $8,4 \pm 0,5$ (медиана 8). Рассчитывался также коэффициент скорости прогрессирования (отношение балла EDSS к длительности болезни), который составил $0,71 \pm 0,09$ (медиана 0,57).

Генотипирование осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе.

Смесь для ПЦР содержала 0,5 мкл специфической пары праймеров концентрацией 1 о.е./мл, 1,2 мкл 10× буфера для амплификации, 0,5—1,0 е.а. Taq ДНК-полимеразы («Сибэнзим», г. Новосибирск) и 100 нг геномной ДНК. Смесь помещали в пробирки 0,5 мл типа «Эппендорф», наслаивали сверху минеральное масло для предотвращения испарения и амплифицировали в автоматических мини-циклерах «Терцик» (Россия). Программа амплификации включала предварительную денатурацию при температуре 94 °С в течение 5 мин с последующими 33 циклами отжига при специфической для каждой пары праймеров (1 мин) элонгации цепи при температуре 72 °С (40 с) и денатурации при температуре 94 °С (40 с). Программу завершала финальная элонгация при температуре 72 °С в течение 3 мин.

Амплификат подвергали гидролизу соответствующей рестриктазой при оптимальной для фермента температуре в течение 12 ч. Рестрикционная смесь включала 3—5 мкл амплификата, 1,0—1,2 мкл 10× буфера для рестрикции, поставляемого фирмой-производителем («Сибэнзим», г. Новосибирск), и 1—5 ед активности фермента (в зависимости от эффективности его работы).

Продукты рестрикции фракционировали в 3%-м агарозном геле, содержащем бромистый этидий, при напряжении 120 В в течение 25 мин и визуализировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты и обсуждение

Проведено генотипирование по полиморфному варианту ¹¹⁸⁸A/C гена *IL12B* в 3'-нетранслируемой области больных рассеянным склерозом и здоровых добровольцев, результаты представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, частота генотипа C/C при изучении полиморфизма гена интерлейкина-12, кодирующего субъединицу p40 (*IL12B*), выше у больных РС, чем у здоровых лиц. При анализе частоты аллеля эти различия становятся еще более очевидными. Так, частота ал-

леля С у больных РС почти вдвое превышает частоту у обследованных здоровых лиц, составляя 33,9 и 17,4% соответственно ($p = 0,0003$).

Принимая во внимание, что у носителей этого аллеля экспрессия ИЛ-12 снижена, можно полагать, что функциональная недостаточность системы естественной цитотоксичности, многократно отмеченная при РС, возможно, связана и с генетическими особенностями иммунного ответа.

Таблица 1

Частота аллелей и генотипов полиморфного варианта *IL12B* у больных рассеянным склерозом и здоровых лиц

Показатель	Здоровые	Больные РС	χ^2	OR	CI _{95%}
Генотип					
A/A	85 (65,9%)	25 (40,3%)	A/A vs A/C 7,41 ($p = 0,006$) A/C vs C/C 2,25 ($p = 0,134$) A/A vs C/C 7,97 ($p = 0,005$)	2,53	1,27—5,04
A/C	43 (33,3%)	32 (51,6%)		6,72	0,7—159,67
C/C	1 (0,8%)	5 (8,1%)		17,00	1,78—403,18
Всего	129	62			
Аллели					
A	213 (82,6%)	82 (66,1%)	11,94 ($p = 0,0003$)	2,42	1,44—4,08
C	45 (17,4%)	42 (33,9%)			
Всего	258	124			

Примечание. OR — отношение шансов (odds ratio); CI_{95%} — 95%-й доверительный интервал (confidence interval).

В частности, С.Б. Чекнев и соавт., изучая естественную цитотоксичность в иммунопатогенезе РС, пришли к выводу, что у этих больных отмечается снижение цитотоксической активности естественных киллерных клеток и дефицит выработки ИФН- γ наряду с выраженным несоответствием между цитотоксической и интерферонпродуцирующей функциями этих клеток в ответ на стимуляцию [8].

При анализе клинических проявлений в зависимости от полиморфизма гена *IL12B* установлено, что наличие аллеля С у пациентов с РС ассоциировано с меньшей длительностью первой ремиссии. Так, средняя продолжительность первой ремиссии у носителей аллеля С

была 1 год (Q_1-Q_3 1—3 года), в то время как у остальных пациентов — 2,5 года (Q_1-Q_3 1—3; $p = 0,028$). Эти различия были статистически значимы не только для аллелей, но и для различных генотипов (табл. 2).

Кроме того, при анализе клинических проявлений в зависимости от аллеля отмечена тенденция к увеличению показателя среднегодовой частоты обострений у носителей аллеля С по сравнению с носителями аллеля А. Так, среднегодовая частота обострений у носителей аллеля С составляла 0,8 (Q_1-Q_3 0,50—1,25), в то время как у носителей аллеля А — 0,61 (Q_1-Q_3 0,36—1,00), $\chi^2 = 3,48$; $df = 1$; $p = 0,062$.

Таблица 2

Демографические и клинические показатели больных РС в зависимости от генотипа гена *IL12B*, Ме (Q_1-Q_3)

Показатель	A/A	A/C	C/C	p
Женщины / мужчины	17 / 8	23 / 9	4 / 1	n.s.
Средний возраст, лет	33,00 (26,00—43,00)	29,00 (23,00—36,00)	30,00 (29,00—36,00)	n.s.
Средний возраст к началу заболевания,	25,00	21,00	23,00	n.s.

лет	(17,00—30,00)	(17,00—27,00)	(22,00—33,00)	
Продолжительность болезни, лет	6,00	5,00	6,00	n.s.
	(4,00—13,00)	(3,00—9,00)	(2,00—6,00)	
Балл по шкале EDSS	3,00	3,00	3,00	n.s.
	(1,25—3,50)	(2,50—3,50)	(2,00—3,50)	
СНД	8,00	9,00	7,00	n.s.
	(5,50—9,50)	(6,00—11,00)	(5,00—11,00)	
Длительность первой ремиссии, лет	2,50	1,00	1,00	0,055*
	(1,00—4,00)	(1,00—3,00)	(1,00—1,00)	0,065**
				0,028#
Среднегодовая частота обострений	0,61	0,80	0,67	0,079#
	(0,36—1,00)	(0,50—1,00)	(0,50—2,00)	
Скорость прогрессирования	0,35	0,63	0,67	n.s.
	(0,25—0,75)	(0,38—1,00)	(0,58—1,00)	

Примечание. * — различия между группами, носителями генотипа А/А и А/С; ** — различия между группами, носителями генотипа А/А и С/С; # — различия между носителями аллелей А и С; n.s. — различия статистически не значимы.

Таким образом, в данной выборке пациентов у носителей аллеля С отмечается более активное течение болезни.

При анализе иммунологических показателей больных в зависимости от генотипа IL12B у носителей аллеля С отмечена тенденция к уменьшению абсолютного содержания зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺-клеток) наряду с увеличением процентного содержания клеток CD25⁺ (рецепторы к ИЛ-2) и CD95⁺ (рецептор готовности к апоптозу), однако различия не достигли статистически значимого уровня, что, вероятнее всего, связано с объемом выборки (табл. 3).

Также у обследованных больных отмечено статистически достоверное увеличение уровня IgM

до 5,9 г/л (Q₁—Q₃ 1,85—10,00 г/л) и IgG до 19,6 (Q₁—Q₃ 15,30—22,95 г/л), у гомозигот по аллелю С

в сравнении с гетерозиготами 1,2 г/л (Q₁—Q₃ 0,8—1,7 г/л) и 10,22 г/л (Q₁—Q₃ 5,70—13,80 г/л) соответственно наряду с тенденцией к снижению интенсивности фагоцитоза у носителей генотипа С/С по сравнению с другими больными, однако следует отметить, что количество наблюдений очень мало (табл. 4).

Таблица 3

Показатели клеточного иммунитета у больных РС в зависимости от генотипа IL12B

Показатель	А/А	А/С	С/С	p
	20 человек	30 человек	5 человек	
Лейкоциты, ·10 ⁹ /л	5,00 (4,00—6,50)	4,85 (4,05—6,20)	4,30 (4,00—4,60)	n.s.
Лимфоциты, %	26,00 (21,00—31,00)	23,00 (17,50—29,00)	22,00 (15,00—33,00)	n.s.
Лимфоциты, ·10 ⁹ /л	1,32 (0,10—1,60)	1,16 (0,84—1,57)	1,01 (0,60—1,32)	n.s.
CD3 ⁺ , %	58,00 (50,00—61,00)	57,00 (47,50—63,50)	50,00 (42,50—56,00)	n.s.
CD3 ⁺ , ·10 ⁹ /л	0,76 (0,68—1,01)	0,59 (0,43—0,82)	0,44 (0,22—0,73)	0,082* 0,089**
CD4 ⁺ , %	39,00 (30,00—45,00)	34,50 (15,00—44,50)	35,50 (24,50—40,00)	n.s.
CD4 ⁺ , ·10 ⁹ /л	0,49 (0,36—0,72)	0,37 (0,20—0,59)	0,28 (0,12—0,53)	n.s.
CD8 ⁺ , %	31,00 (25,00—37,00)	30,50 (25,00—36,50)	32,50 (26,00—38,50)	n.s.
CD8 ⁺ , ·10 ⁹ /л	0,39 (0,32—0,67)	0,38 (0,25—0,50)	0,25 (0,13—0,52)	n.s.
CD16 ⁺ , %	17,00 (13,00—20,00)	16,50 (12,50—20,00)	21,50 (16,00—22,50)	n.s.

Материалы 5-й Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы неврологии»

CD16 ⁺ , ·10 ⁹ /л	0,29 (0,16—0,33)	0,22 (0,11—0,31)	0,18 (0,09—0,29)	n.s.
CD25 ⁺ , %	18,00 (11,00—30,00)	15,50 (10,00—22,50)	24,00 (20,50—27,00)	0,053***
CD25 ⁺ , ·10 ⁹ /л	0,24 (0,17—0,33)	0,19 (0,10—0,25)	0,21 (0,11—0,35)	n.s.
CD95 ⁺ , %	19,00 (15,00—26,00)	18,00 (14,00—21,00)	29,00 (25,00—33,00)	0,053***
CD95 ⁺ , ·10 ⁹ /л	0,24 (0,21—0,30)	0,22 (0,17—0,25)	0,40 (0,25—0,54)	n.s.
HLA-DR ⁺ , %	20,00 (16,00—24,00)	17,00 (13,00—26,00)	27,00 (19,00—35,50)	n.s.
HLA-DR ⁺ , ·10 ⁹ /л	0,30 (0,22—0,38)	0,22 (0,15—0,32)	0,19 (0,12—0,36)	n.s.
CD4/CD8	1,20 (1,00—1,33)	1,12 (0,85—1,36)	1,05 (0,83—1,17)	n.s.

Примечание. * — различия между группами, носителями генотипа А/А и А/С; ** — различия между группами, носителями генотипа А/А и с/С; *** — различия между группами, носителями генотипа А/С и С/С; n.s. — различия статистически не значимы.

Таблица 4

Показатели гуморального иммунитета, фагоцитоза и активность комплемента у больных РС в зависимости от генотипа IL12B

Показатель	А/А	А/С	С/С	p
	20 человек	30 человек	5 человек	
CD22 ⁺ , %	19,00 (15,00—24,00)	21,00 (17,00—26,00)	22,50 (19,50—25,00)	n.s.
CD22 ⁺ , ·10 ⁹ /л	0,25 (0,19—0,34)	0,22 (0,14—0,29)	0,18 (0,10—0,33)	n.s.
IgM, Г/л	1,50 (0,80—2,60)	1,20 (0,80—1,70)	5,90 (1,85—10,00)	0,074*** 0,017***
IgA, Г/л	1,50 (0,80—2,90)	1,90 (1,20—2,80)	2,85 (1,50—5,05)	n.s.
IgG, Г/л	11,00 (8,00—16,60)	10,22 (5,70—13,80)	19,60 (15,30—22,95)	0,062** 0,012***
Иммунные комплексы, усл. ед	80,00 (40,00—110,00)	75,00 (50,00—100,00)	97,50 (57,50—120,00)	n.s.
Фагоцитарный резерв, %	28,00 (20,00—44,00)	32,00 (16,00—44,00)	15,00 (8,00—34,00)	n.s.
Инт. реакции фагоцитоза, усл. ед	62,00 (38,00—87,00)	41,50 (20,00—72,00)	43,00 (15,50—82,00)	0,096*
Комплемент, гем. ед	66,00 (56,60—78,20)	65,60 (55,15—83,45)	97,50 (57,50—120,00)	n.s.

Примечание. * — различия между группами, носителями генотипа А/А и А/С; ** — различия между группами, носителями генотипа А/А и с/С; *** — различия между группами, носителями генотипа А/С и С/С; n.s. — различия статистически не значимы.

Выводы

Таким образом, у обследованных больных отмечена не только более высокая частота аллеля С гена *IL12B* в 3'-нетранслируемой области по сравнению со здоровыми лицами, но

также выявлена ассоциация с более активным течением болезни.

Целый ряд проведенных исследований показывает, что длительность первой ремиссии является одним из прогностических факторов дальнейшего течения болезни, причем чем она

дольше, тем благоприятнее прогноз дальнейшего течения РС. С учетом этого можно полагать, что отмеченная ассоциация аллеля С с меньшей длительностью первой ремиссии является прогностически неблагоприятной. Кроме того, у этих же пациентов установлена тенденция к более высокой среднегодовой частоте обострений заболевания, что может быть связано с функциональной неполноценностью системы естественной цитотоксичности, имеющей большое значение в патогенезе РС.

Принимая во внимание роль ИЛ-12 в поляризации иммунного ответа в сторону T_{H1} , можно предположить, что более активное течение болезни у носителей аллеля С связано с поляризацией иммунного ответа в сторону T_{H2} -типа, что косвенно подтверждается значительным увеличением содержания иммуноглобулинов классов M и G у этих пациентов.

Литературные данные о том, что T_{H2} также обладают энцефалитогенными свойствами в эксперименте, наряду с доказательствами роли гуморального звена иммунитета в патогенезе РС позволяют предположить, что выявленные ассоциации могут иметь значение в патогенетической гетерогенности этого заболевания, что может иметь значение при выборе терапии. В частности, при использовании средств, основной механизм которых связан с иммунодевиацией, т.е. с переключением иммунного ответа с T_{H1} -пути на T_{H2} возможно ожидать учащения нежелательных явлений в виде аллергических реакций, однако этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении. Кроме того, отмеченная тенденция к снижению активности интенсивности

реакции фагоцитоза у носителей аллеля С, вероятно-

но, не случайна, учитывая дефект продукции ИЛ-12 макрофагами у носителей этого полиморфизма гена *IL12B*. При этом функциональная неполноценность такого важного компонента антимикробной защиты, как фагоцитоз, может быть связана с подверженностью пациентов к респираторным инфекциям или хронизации воспалительного процесса, что, несомненно, играет роль в обострении РС.

Литература

1. Gubler U., Chua A.O., Schoenhaut D.S. et al. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor // Proc. Nat. Acad. Sci. 1991. V. 88. P. 4143—4147.
2. Bright J.J., Roldriguez M., Sriram S. Differential influence of interleukin-12 in the pathogenesis of autoimmune and virus-induced central nervous system demyelination // Journal of virology. 1999. V. 73. № 2. P. 1637—1639.
3. Ferlazzo G., Thomas D., Lin S.L. et al. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic // J. Immun. 2004. V. 172. P. 1455—1462.
4. Morahan G., Huang D., Ymer S.I. et al. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele // Nat. Genet. 2001. 27. P. 218—221.
5. Houldsworth A., Metzner M., Rossol S. et al. Polymorphisms in the *IL-12B* gene and outcome of HCV infection // J. Interferon Cytokine Res. 2005. V. 25 (5). P. 271—276.
6. Van Veen T., Crusius J.B., Schrijver H.M. et al. Interleukin-12p40 genotype plays a role in the susceptibility to multiple sclerosis // Ann. Neurol. 2001. V. 50 (2). P. 275.
7. Alloza I., Heggarty S., Goris A. et al. Interleukin-12 p40 polymorphism and susceptibility to multiple sclerosis // Ann. Neurol. 2002. V. 52. P. 524—525.
8. Чекнев С.Б. Нарушение эндогенной ретрансляции биологического сигнала в механизмах развития рассеянного склероза // Рассеянный склероз, избранные вопросы теории и практики. М., 2000. С. 115—147.

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

Предлагаем вам подписаться на наш журнал с любого номера

В 2008 году стоимость подписки на полугодие — 1000 рублей, на год — 2000 рублей.

Как оформить подписку на журнал «Бюллетень сибирской медицины»

На почте во всех отделениях связи

Подписной индекс **46319** в каталоге агентства Роспечати «Газеты и журналы 2008, 2-е полугодие».

В редакции

- Без почтовых наценок.
- С любого месяца.
- Со своего рабочего места.

По телефону (3822) 51-57-08; факс (3822) 51-53-15.

На сайте <http://bulletin.tomsk.ru>

Если вы являетесь автором публикаций или хотите приобрести наш журнал, он будет выслан вам наложенным платежом при заполнении заявки. Стоимость приобретения одного номера 400 рублей.

Заявку на приобретение журнала нужно выслать по адресу редакции:

634050, г. Томск, пр. Ленина, 107,

Научно-медицинская библиотека Сибирского государственного медицинского университета.

Редакция журнала «Бюллетень сибирской медицины».

Тел. (8-3822) 51-57-08. E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru