

Abstract**Savchenko O. V.**

Sumy State University,
2, Rymkogo-Korsakova st.,
Sumy, 40007, Ukraine

BCL1 POLYMORPHISM OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR GENE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Considering the availability of connection between Bcl1 polymorphism of glucocorticoids receptor (GR) and development of rheumatoid arthritis (RA) and absence of such data in Ukraine, the **purpose** of our investigation was the comparative studying genotype's frequency by Bcl1 polymorphism of glucocorticoids receptor in among common population and in patients with RA.

Materials and methods of investigation.

161 patients with RA in ages above 40 and 96 almost healthy humans had been investigated. During work process used conventional investigations for diagnosis. Bcl1 (rs41423247) polymorphism of 2nd exon has been determined by the method of polymerase chain reaction with following analyze of the length of restriction fragments by Fleury I. et al with modifications (2003).

Results of investigation. Detected, that most spread is C allele. Among patients with RA more often meet homozygotes by G allele comparing with control group, what is statistically significant by χ^2 Pirson's criteria ($p=0,03$). Homozygotes by G allele have the risk of RA development in 2,7 times higher that homozygotes by C allele ($p=0,01$). Therefore, this investigation proved that genotype G/G by Bcl1 polymorphism of GR gene contributes to RA development.

Conclusion. Determined, that among patients with RA probably more often meet G/G genotype comparing with control group, and the risk of RA development in homozygotes by minor allele G in 2,7 times higher that homozygotes by C allele. Thereby, the investigation of genotype by Bcl1 polymorphism of GR gene is prospectively concerning of the risk oh RA occurrence in common population.

Key words: rheumatoid arthritis, Bcl1 polymorphism, glucocorticoids receptor.

Corresponding author: *oksanarevmo76@mail.ru

Резюме**Савченко О.В.**

Сумський державний
університет,
вул. Римського-Корсакова, 2,
Суми, 40007, Україна

BCL1 ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОЇДНОГО РЕЦЕПТОРА У ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ

Метою нашого дослідження було порівняльне вивчення частоти генотипів за Bcl1 поліморфізмом гена глюкокортикостероїдного рецептора (ГР) в загальній популяції та у хворих на ревматоїдний артрит (РА).

Матеріали та методи дослідження.

Було обстежено 161 хворого на РА у віці старше 40 років та 96 практично здорових осіб. У роботі використано загальноприйнятні обстеження для діагностики РА, молекулярно-генетичні та статистичні методи дослідження.

Результати дослідження. Виявлено, що найбільш розповсюдженим є алель С. Серед хворих на РА частіше зустрічаються гомозиготи за G алелем порівняно з контрольною групою, що є статистично значимим за χ^2 критерієм Пірсона ($p=0,03$). Гомозиготи за G алелем мають ризик розвитку РА у 2,7 рази вищий, ніж гомозиготи за С алелем ($p=0,01$). Таким чином, дане дослідження доводить те, що генотип G/G за Bcl1 поліморфізмом гена ГР сприяє розвитку РА.

Заключення. Дослідження генотипу Bcl1 поліморфізму гена ГР є перспективним щодо виявлення ризику виникнення РА у загальній популяції.

Ключові слова: ревматоїдний артрит, Bcl1 поліморфізм, глюкокортикостероїдний рецептор.

Резюме

Савченко О. В.

Сумський державний університет,

*ул. Римського-Корсакова, 2,
Сумы, 40007, Україна*

BC11 ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДНОГО РЕЦЕПТОРА У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Учитывая наличие связи Bcl1 полиморфизма гена глюкокортикоидного рецептора (ГР) с развитием ревматоидного артрита (РА) и отсутствие таких данных в Украине, целью нашего исследования было сравнительное изучение частоты генотипов по Bcl1 полиморфизму гена ГР в общей популяции и у больных РА.

Материалы и методы исследования.

Было обследовано 161 больного РА в возрасте старше 40 лет и 96 практически здоровых лиц. В работе использованы общепринятые обследования для диагностики РА. Bcl1 (rs41423247) полиморфизм 2-го экзона определяли методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов по Fleury I. et al. с модификациями (2003). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы SPSS17.

Результаты исследования.

Виявлено, що найбільш розповсюдженим є алель С. Серед хворих на РА частіше зустрічаються гомозиготи по G алелю по сравнению с контрольной группой, что является статистически значимым по χ^2 критерию Пирсона ($p = 0,03$). Гомозиготы по G алелю имеют риск развития РА в 2,7 раза выше, чем гомозиготы по С алелю ($p = 0,01$). Таким образом, данное исследование доказывает то, что генотип G/G по Bcl1 полиморфизму гена ГР способствует развитию РА.

Заключение.

Установлено, что среди больных РА достоверно чаще встречается генотип G/G по сравнению с контрольной группой, а риск развития РА у гомозигот по минорному алелю G в 2,7 раза выше, чем у гомозигот по С алелю. Таким образом, исследование генотипа по Bcl1 полиморфизму гена ГР является перспективным для определения риска возникновения РА в общей популяции.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, Bcl1 полиморфизм, глюкокортикостероидный рецептор.

Автор, відповідальний за листування: *oksanarevmo76@mail.ru



Вступ

В останні роки стало актуальним ідентифікувати гени-модифікатори, які можуть впливати на розвиток та прогресування тих чи інших захворювань. Це стає важливим і у хворих на ревматоїдний артрит (РА) не тільки для розуміння патофізіології його прогресування, а також для виявлення хворих, які матимуть можливість отримати користь від нових терапевтичних стратегій у відповідності до їх генетичного профілю. Серед генів, які можуть впливати на каскад запальних реакцій та відповідь на протизапальні препарати, викликають цікавість гени, які контролюють ефекти ендо- та екзогенних глюкокортикостероїдів (ГКС). Ген глюкокортикоїдного рецептора (ГР) людини представлений єдиною копією, яка знаходиться в локусі 5q31.3.[1,2,3]. Описано кілька поліморфізмів цього гена, пов'язаних із зміною чутливості до ГКС. Найбільш розповсюдженим та вивченим є Vc11 поліморфізм гена ГР [4,5].

Vc11 поліморфізм описаний вперше Murgay J.C. et al. (1987). Він пов'язаний із заміною цитозину на гуанін в 647-му положенні у 2-му інтроні гена ГР. Алель С є найбільш поширеним і може вважатись алелем дикого типу [6]. Vc11 поліморфізм асоційований не лише з чутливістю до ГКС, а також – із змінами індексу маси тіла, дисліпідемією, інсулінорезистентністю, артеріальною гіпертензією, ендотеліальною дисфункцією, зниженою мінеральною щільністю кісткової тканини та активністю запалення [4,5,7,8,9,10].

Останнім часом з'явилися окремі публікації про зв'язок Vc11 поліморфізму з РА [11,12,13]. У дослідженні Aydeniz A. et al. (2011) у хворих на РА не було ніякої суттєвої різниці між генотипами за Vc11 поліморфізмом гена ГР та віком, статтю, тривалістю захворювання та іншими клінічними параметрами, такими як рівень активності за DAS28 та візуальною аналоговою шкалою. Визначено також, що C/G генотип може відігравати важливу етіопатогенетичну роль у розвитку РА та реакції на лікування ГКС [11]. З іншого боку, у дослідженні Костика М.М. та ін. (2008) у групі дівчаток була виявлена асоціація носійства G алелю з несприятливим перебігом артриту, більш високим ступенем запальної активності та більш раннім дебютом захворювання. Встановлено, що G алель та G/G генотип є патогномонічними ознаками несприятливого перебігу ювенільного ідіопатичного артриту у дівчаток [12].

Зважаючи на відсутність даних про частоту генотипів за Vc11 поліморфізмом гена ГР у хворих на РА та його можливий зв'язок із даним захворюванням в Україні, метою нашого дослідження було порівняльне вивчення частоти генотипів за Vc11 поліморфізмом гена ГР в загальній популяції та у хворих на РА.

Матеріали та методи дослідження. Нами було обстежено 161 хворого на ревматоїдний артрит віком старше 40 років. Діагноз РА встановлено згідно діагностичних критеріїв Американської колегії ревматологів (1987). Контрольну групу склали 96 практично здорових осіб, які не мали в анамнезі РА у себе та близьких родичів.

Матеріалом дослідження була венозна кров, яку набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти в якості антикоагулянта ("Sarstedt", Германия), заморожували та зберігали при температурі -20°C. ДНК виділяли з лейкоцитів цільної крові із використанням наборів D1Atom DNA Prep 100 («Isogene», Росія). Використаний метод базується на використанні лізуючого реагенту із гуанідинізоціонатом, який призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, а також для денатурації клітинних нуклеаз. Vc11 (rs41423247) поліморфізм 2-го екзону визначали методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів за Fleury I. et al. із модифікаціями (2003). Для цього ампліфікували ділянку промотора вказаного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense)– 5'AAATTGAAGCTTAACAATTTTGGC 3' і зворотного (antisense) – 5'GCAGTGAACAGTGTACCAGACC 3' згідно стандартам протокола PCR. Якщо в 647-й позиції гена ГР містився цитозин, ампліфікат, який складався з 206 пар основ, розщеплювався рестриктазою VcII на два фрагменти – 116 і 90 пар основ. У разі заміни цитозину на гуанін сайт рестрикції для VcII втрачався і утворювався один фрагмент розміром 206 пар основ (рис. 1). Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5% агарозному гелі, що містив що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Горизонтальний електрофорез (0,13A; 200V) проводили протягом 25 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора ("Біоком", Росія).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програми SPSS17.



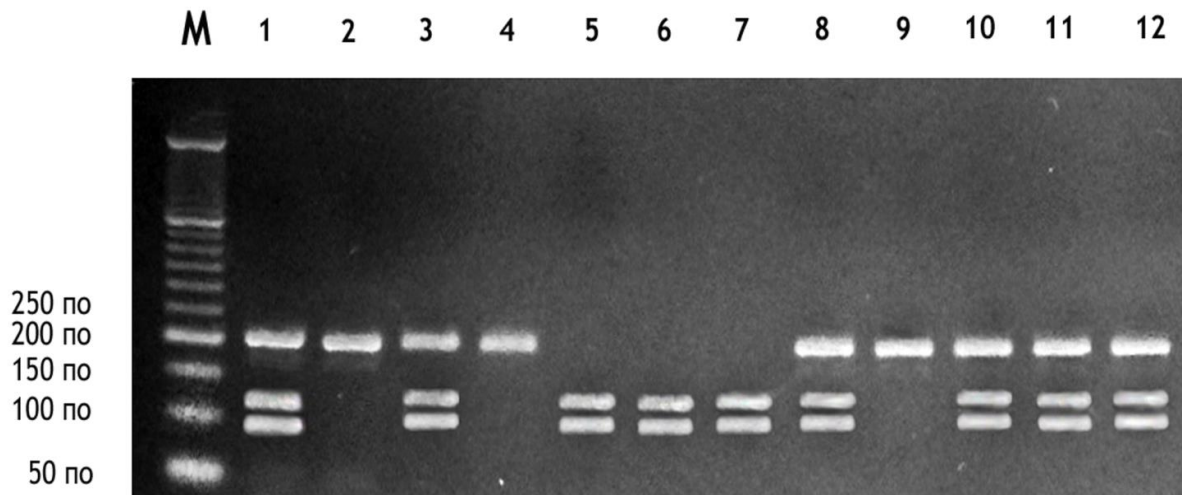


Рис.1 Результати рестрикційного аналізу *BclI* (C+647G) поліморфізму гена глюкокортикоїдного рецептора. М – маркер молекулярної маси (по - пари нуклеїнових основ); доріжки 5,6,7 відповідають C/C-генотипу; доріжки 1,3,8,10,11,12 – C/G генотипу; 2,4,9 – G/G генотипу.

Результати обстеження. Розподіл генотипів за досліджуваним поліморфізмом перевіряли на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга за допомогою критерію χ^2 . У контрольній групі частота генотипів C/C, C/G та G/G за *BclI* поліморфізмом гена ГР становила 0,417, 0,458 та

0,125 відповідно. У групі хворих на РА частота досліджуваних генотипів складала 0,28, 0,49 та 0,23 відповідно. Характеристика частоти генотипів за досліджуваним поліморфізмом у загальній популяції та у хворих на РА представлена у табл.1

Таблиця 1

Частота генотипів за *BclI* поліморфізмом гена глюкокортикоидного рецептора в загальній популяції та у хворих на ревматоїдний артрит

Генотип, алель	Контрольна група, n=96		Хворі на ревматоїдний артрит, n=161	
	n	%	n	%
C/C	40	41,7	45	28,0
C/G	44	45,8	79	49,1
G/G	12	12,5	37	23,0
C	169	52,5	124	64,6
G	153	47,4	68	35,4
$\chi^2=7,018$ P=0,03				

Примітки: n – кількість пацієнтів; χ^2 і P відображають відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга

Виявлено, що найбільш поширеним є алель С, що не суперечить даним літератури. Серед хворих на РА частіше зустрічаються гомозиготи за G алелем порівняно з контрольною групою, що є статистично значимим за χ^2 критерієм Пірсона (p=0,03).

Застосування методу логістичної регресії дає можливість прогнозувати розвиток захворювання, згідно якого гомозиготи за G алелем мають ризик розвитку ревматоїдного артриту у 2,7 рази вищий, ніж гомозиготи за С алелем (табл. 2).

Таблиця 2

Аналіз ризику виникнення ревматоїдного артриту залежно від генотипу за Bcl1 поліморфізмом гена глюкокортикостероїдного рецептора

Генотип	CR	SE	WS	P	OR	95% CI для OR нижній	95% CI для OR верхній
C/G	0,467	0,287	2,645	0,104	1,596	0,909	2,803
G/G	1,008	0,397	6,451	0,011	2,741	1,259	5,967

Примітки: Порівняння проводилось відносно гомозигот за основним алелем C/C; CR – коефіцієнт регресії; SE – стандартна похибка; WS – статистика Вальда; P – статистична значимість; OR – відношення ризику; CI – довірчий інтервал.

Таким чином, дане дослідження доводить те, що генотип G/G за Bcl1 поліморфізмом гена GP асоційований із розвитком РА.

Обговорення результатів дослідження. Отримані нами результати співзвучні з даними Aydeniz A. et al. (2011). Так, у турецькій популяції в осіб без наявності РА встановлено, що частота генотипів C/C, C/G, G/G за Bcl1 поліморфізмом гена GP складає 60,0%, 34,3%, 5,7% відповідно. У хворих на ревматоїдний артрит частота досліджуваних генотипів — 53,8%, 30,8%, 15,4% відповідно. Визначено також, що C/G генотип може відігравати важливу етіопатогенетичну роль у розвитку РА [11]. У дослідженні Костика М.М. та ін. (2008) у групі дівчаток була виявлена асоціація носійства G алелю з несприятливим перебігом артриту, більш високим ступенем запальної активності та більш раннім дебютом захворювання. Встановлено, що G алель та GG генотип є прогностичними ознаками несприятливого перебігу ювенільного ідіопатичного артриту у дівчаток [12]. У нашому дослідженні виявлено, що найбільш розповсюдженим є алель C. Серед хворих на РА частіше зустрічаються гомозиготи за G алелем порівняно з контрольною групою. Гомозиготи за G алелем мають ризик розвитку РА у 2,7 рази вищий, ніж гомозиготи за C алелем.

Механізми, за допомогою яких Bcl1 поліморфізм може вплинути на виникнення РА, його активність та на прогресування захворювання, залишаються не з'ясованими. Одним із пояснень може бути результат дослідження, що доводить вплив даного поліморфізму на чутливість до ГКС [4,5]. Тому важливість вивчення

Bcl1 поліморфізму ґрунтується на його зв'язку з виникненням РА та із зміною чутливості до ГКС. Panarelli M. et al. (1998) встановили, що у гомозигот за G алелем *in vivo* збільшується чутливість до ГКС [14]. Аналогічне підтвердження отримано у дослідженні van Rossum E. et al. (2003) [4]. На відміну від цього, дослідження *in vitro* на лейкоцитах осіб з GG генотипом показали зниження чутливості до дексаметазону [5]. Дані результати передбачають, що Bcl1 поліморфізм може мати тканинноспецифічний ефект чутливості до ГКС. Відомо, що в клінічній практиці ефекти лікування ГКС істотно відрізняються між пацієнтами: деякі дуже добре реагують на терапію ГКС, але мають значні побічні ефекти, інші – потребують їх призначення у високих дозах, щоб досягти мінімального клінічного ефекту і не страждають при цьому від побічних ефектів. Таким чином, дані результати показали, що оцінка Bcl1 поліморфізму гена GP може надати можливість ідентифікувати пацієнтів, які мають різну відповідь на ГКС. Прогнозування *in vitro* відповіді до початку лікування дозволить корегувати гормональну терапію шляхом відмови від використання ГКС у хворих, які не будуть реагувати на них та знижувати дозу у пацієнтів з високою чутливістю до даних препаратів, зменшуючи таким чином ризик побічних ефектів. Тому є важливим дослідження більшої кількості, як практично здорових осіб, так і хворих на РА. Отримані результати свідчать про зв'язок Bcl1 поліморфізму з виникненням РА, а також мають важливе значення у прогнозуванні індивідуальної терапевтичної тактики у даних пацієнтів.



Висновки

1. Серед хворих на РА частіше зустрічається G/G генотип порівняно з контрольною групою.

2. Ризик розвитку РА у гомозигот за міноним алелем G у 2,7 рази вищий, ніж у гомозигот за С алелем.

References (список літератури)

1. Bray P. Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and in vitro mutations and polymorphisms / P. Bray, R. Cotton // Hum. Mutat. – 2003 – Vol. 21. – P. 557–568.
2. DeRijk R. Glucocorticoid receptor variants: clinic alimplications / R. DeRijk, M. Schaaf, E. de Kloet // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. – 2002. – Vol. 81. – P. 103–122.
3. Characterization of the BclI Polymorphism in the Glucocorticoid Receptor Gene / I. Fleury, P. Beaulieu, M. Primeau [et al.] // Clinical. Chemistry. – 2003. – Vol. 49. – № 9. – P. 1528–1531.
4. Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index / E.F. van Rossum, J.W. Koper, A.W. van den Beld [et al.] // Clin. Endocrinol. (Oxf). – 2003. – Vol. 59. – № 5. – P. 585–592.
5. Association between BclI polymorphism in the NR3C1 gene and in vitro individual variations in lymphocyte responses to methylprednisolone / E. Cuzzoni, S. De Iudicibus, F. Bartoli [et al.] // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2012. – Vol. 73(4). – P. 651–655.
6. RFLP for the glucocorticoid receptor (GRL) located at 5q11–5q13 / J.C. Murray, R.F. Smith, H.A. Ardinger [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1987. – Vol. 15. – P. 6765.
7. Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus / B. Buemann, M.C. Vohl, M. Chagnon [et al.] // Obes. Res. – 1997 – Vol. 5. – № 3. – P. 186–192.
8. Subjects homozygous for the BCL1 polymorphism of glucocorticoid receptor gene may have an increased risk for impaired endothelial function / K. Stamatelopoulos, K. Saltiki, E. Mantzou [et al.] // Endocrine Abstracts. – 2010. – Vol. 22. – P. 127.
9. Endocrine research two common haplotypes of the glucocorticoid receptor gene are associated with increased susceptibility to cardiovascular disease in men with familial hypercholesterolemia / K.C.M.C. Koeijvoets, J.B. van der Net, E.F.C. van Rossum [et al.] // Home. – 2008. – Vol. 93. – № 12. – P. 4902–4908.
10. Weaver J.U. An association between a BclI restriction fragment length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women / J.U. Weaver, G.A. Hitman, P.G. Kopelman // J. Mol. Endocrinol. – 1992. – Vol. 9. – № 3. – P. 295–300.
11. Investigation of glucocorticoid receptor gene BclI polymorphism in rheumatoid arthritis / A. Aydeniz, T. Sever, S. Pehlivan [et al.] // Turkish J. Rheumatology. – 2011. – Vol. 26. – № 3. – P. 199–203.
12. Клиническое значение BclI-полиморфизма гена глюкокортикоидного рецептора у детей с ювенильным идиопатическим артритом / М.М. Костик, Д.Н. Баранов, А.А. Козырева [и др.] // Вопросы практ. педиатрии. – 2008. – № 6 (3). – С. 8–11.
13. Donn R. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis / R. Donn, D. Payne, D. Ray // Clin. Endocrinol. (Oxf). 2007, Vol. 67(3) – P. 342–345.
14. Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects / M. Panarelli, C. Holloway, R. Fraser [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1998. – Vol. 83. – P. 1846–1852.

(received 11.09.2014, published online 30.06.2015)

(отримано 11.09.2014, опубліковано 30.06.2015)

