

УДК 616.72-002.77-07-036.8:575.083.33:577.21

Л.Н. Приступа, О.В. Савченко

ЗВ'ЯЗОК СЕРОЛОГІЧНОГО ВАРІАНТА РЕВМАТОЇДНОГО АРТРИТУ ІЗ ГЕНОТИПАМИ ЗА *BCL1* ПОЛІМОРФІЗМОМ ГЕНА ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОЇДНОГО РЕЦЕПТОРА

Медичний інститут Сумського державного університету

Резюме. У 161 хворого на ревматоїдний артрит (РА) досліджено зв'язок серологічного варіанта РА із генотипами за *Bcl1* поліморфізмом гена глюкокортико-стероїдного рецептора (ГР). Встановлено, що за наявності G/G генотипу ГР частіше трапляється серопозитивний варіант РА за вмістом антитіл до циклічного цитрулінового пептиду. Вбачається, що дослідження зв'язку генотипів за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР із різними

серологічними варіантами РА є перспективними щодо прогнозування несприятливого перебігу цієї хвороби.

Ключові слова: ревматоїдний артрит, ревматоїдний фактор, антитіла до циклічного цитрулінового пептиду, *Bcl1* поліморфізм, глюкокортико-стероїдний рецептор.

Вступ. Останнім часом з'явилися окремі публікації стосовно зв'язку *Bcl1* поліморфізму гена глюкокортико-стероїдного рецептора (ГР) із ревматоїдним артритом (РА) [3, 10, 11, 12, 15]. Ген ГР людини представлений єдиною копією, яка знаходиться в локусі 5q31.3 [6, 9, 7]. Описано кілька поліморфізмів цього гена, та найбільш розповсюдженим і вивченим є *Bcl1* поліморфізм [14, 5]. У дослідженні Aydeniz A. et al. (2015) встановлено, що у хворих на РА не було ніякої суттєвої різниці в розподілі генотипів за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР залежно від віку, статі, тривалості захворювання та інших клінічних параметрів, таких, як рівень активності за DAS28 та візуальною аналоговою шкалою (ВАШ). Визначено, що C/G генотип відіграє важливу роль у розвитку РА та відповіді на лікування глюкокортико-стероїдами (ГКС) [15]. З іншого боку, у дослідженнях Костика М.М. та ін. (2008, 2011) у групі дівчаток була виявлена асоціація G алеля із несприятливим перебігом артриту, вищим ступенем запальної активності та більш раннім дебютом захворювання. Встановлено, що G алель та G/G генотип пов'язані з несприятливим перебігом ювенільного ідіопатичного артриту саме в дівчаток [3, 11]. У двох інших дослідженнях не встановлено жодних зв'язків генотипів за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР із ризиком розвитку РА, ревматоїдним фактором (РФ), позасуглобовими проявами РА та різниці в розподілі генотипів [10, 12].

Відомо, що в сучасній діагностиці ранньої стадії РА важливим додатком є виявлення антитіл до циклічного цитрулінового пептиду (АЦЦП).

Чутливість АЦЦП у середньому становить від 41 до 88 %. Таку низьку чутливість можна пояснити гетерогенністю цитрулінових білків. За даними різних авторів, АЦЦП виявляли у 34-69,3 % пацієнтів із РА, серонегативних за РФ [8, 13]. Дослідження вітчизняних учених показало відсутність кореляційного зв'язку вмісту АЦЦП із віком та статтю пацієнтів, клінічними проявами РА, лабораторними показниками і активністю

процесу та його наявність із випотом у суглобах хворих на РА, за даними УЗД, та вмістом С-реактивного білка в сироватці крові [1]. АЦЦП не тільки виявляють на ранніх стадіях РА, а й відмічають у хворих на РА зі швидким прогресуванням. Наявність АЦЦП на момент установлення діагнозу свідчить про агресивніший перебіг захворювання та інтенсивніше рентгенологічне прогресування, незважаючи на лікування [2].

Мета дослідження. Вивчити зв'язок серологічного варіанта РА із генотипами за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР.

Матеріал і методи. Обстежено 161 пацієнта із РА. Контрольну групу склали 96 практично здорових осіб, які не мали в анамнезі РА у себе та близьких родичів. Діагноз ревматоїдного артриту встановлено згідно з діагностичними критеріями ACR/EULAR (2010). Визначення антитіл до АЦЦП проводили за методикою проточної цитофлуориметрії за допомогою тест – системи BioRad (США) на аналізаторі BioPlex 2200. Вміст АЦЦП $\leq 3,0$ Од/мл інтерпретували як серонегативний варіант, а $>3,0$ Од/мл – як серопозитивний варіант. Дослідження рівня РФ здійснювалося латекс-імунодифузійним методом за допомогою тест – системи: Roshe Diagnostics (Швейцарія) на аналізаторі: Cobas 6000 (з 501 модуль). Серологічний варіант РА за вмістом РФ $\leq 3,0$ МО/мл оцінювався як серонегативний, а $>3,0$ МО/мл – як серопозитивний. Венозну кров для визначення *Bcl1* поліморфізму гена ГР у хворих на РА і здорових осіб набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти як антикоагулянта ("Sarstedt", Німеччина), заморожували та зберігали при температурі -20°C . ДНК виділяли з лейкоцитів цільної крові із використанням наборів D1Atom DNA Prep 100 («Isogene», Росія). Дослідження *Bcl1* поліморфізму 2-го екзону проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з подальшим аналізом довжини рестрикційних фрагментів за Fleury I. et al. (матеріалом дослідження була венозна кров). Статистична обробка

результатів дослідження проводилася за допомогою програми SPSS 17.

Результати дослідження та їх обговорення.

Встановлено, що у групі хворих на РА частота C/C, C/G та G/G генотипів за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР становила 28,0, 49,0 % та 23,0 % відповідно, а у групі контролю – 41,7 %, 45,8 % та 12,5 % відповідно. Отже, серед хворих на РА вірогідно частіше траплялися гомозиготи за G алелем порівняно із контрольною групою ($p=0,03$).

Аналіз вмісту АЦЦП показав, що 64,6 % хворих на РА були серопозитивними, а 35,4 % – серонегативними.

Визначення серологічного варіанта РА за вмістом РФ продемонструвало нижчу частоту серопозитивності (57,1 %) порівняно із АЦЦП-позитивністю, серонегативний варіант РА за вмістом РФ траплялися у 42,9 %.

Дослідження вмісту АЦЦП у хворих на РА залежно від генотипу за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР показало, що за наявності C/C генотипу він становив 5,80 (0,50-23,35) ОД/мл, C/G генотипу – 20,0 (3,70-109,70) ОД/мл та G/G генотипу – 34,90 (10,05-275,45) ОД/мл. Отже, в осіб із G/G генотипом концентрація АЦЦП була у 6 разів вища, ніж в осіб із C/C генотипом та в 1,7 раза вища порівняно із C/G генотипом.

Показники АЦЦП у хворих на РА залежно від генотипу за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР наведено у таблиці 1.

Отримані результати свідчать про статистично вірогідну відмінність у розподілі генотипів за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР залежно від серологічного варіанта РА за вмістом АЦЦП. Так, за наявності G/G генотипу в 6,4 раза частіше траплявся серопозитивний РА порівняно із серонегативним. За наявності C/C та C/G генотипів серопозитивний і серонегативний варіанти виявлялися з однаковою частотою. Встановлено, що в серопозитивних хворих за вмістом АЦЦП у 24,0 % був C/C генотип, у 45,2 % траплявся C/G генотип та в 30,8 % – G/G генотип, а в серонегативних – у 35,1, 56,1 % та 8,8 % відповідно ($p=0,02$).

Розподіл генотипів за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР серед серопозитивних та серонегативних хворих на РА за вмістом РФ наведено в таблиці 2.

Як показують отримані результати, серед серонегативних хворих за концентрацією РФ 28,9 % були гомозиготними за C алелем (C/C), 46,4 % – гетерозиготними (C/G) та 24,7 % – гомозиготними за G алелем (G/G). Серед серопозитивних пацієнтів частота генотипів C/C, C/G та G/G становила – 27,2, 51,1 % та 21,7 % відповідно. Таким чином, не встановлено вірогідної відмін-

Таблиця 1

Вміст антитіл до циклічного цитрулінового пептиду залежно від генотипу за *Bcl1* поліморфізмом гена глюкокортикостероїдного рецептора

Генотип	Хворі на ревматоїдний артрит, n=161			
	Вміст АЦЦП			
	≤3,0 ОД/мл, n=57		>3,0 ОД/мл, n=104	
	n	%	n	%
C/C	20	44,4	25	55,6
C/G	32	40,5	47	59,5
G/G	5	13,5	32	86,5
$\chi^2 = 7,443$				
P=0,02				

Таблиця 2

Вміст ревматоїдного фактору залежно від генотипу за *Bcl1* поліморфізмом гена глюкокортикостероїдного рецептора

Генотип	Хворі на ревматоїдний артрит, n=161			
	Вміст РФ			
	≤3,0 МО/мл, n=69		>3,0 МО/мл, n=92	
	n	%	n	%
C/C	20	44,4	25	55,6
C/G	32	40,5	47	57,9
G/G	17	45,9	20	54,1
$\chi^2 = 0,002$				
P=0,99				

Примітка. n – кількість пацієнтів; χ^2 – критерій узгодженості Пірсона; p – показник вірогідності відмінностей

ності в розподілі генотипів за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР залежно від серологічного варіанта РА за вмістом РФ ($p=0,99$).

Існує ряд досліджень, які демонструють зв'язок цього поліморфізму із РА. Так, доведено, що G аель та G/G генотип асоційовані із несприятливим перебігом ювенільного ідіопатичого артриту в дівчаток, вищим ступенем запальної активності та більш раннім дебютом захворювання [3, 11]. У дослідженні Lee E.V. et al. (2005) не було зв'язку генотипів за *Bcl1* поліморфізмом із РФ та позасуглобовими проявами РА [12]. Інше дослідження також не показало жодних зв'язків генотипів за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР із ризиком розвитку РА та різниці в розподілі генотипів серед досліджуваних хворих [10].

З іншого боку, існує ряд публікацій щодо впливу концентрації АЦЦП на діагностику, ризик розвитку та клінічний перебіг РА. Так, у дослідженні Bizzaro N. et al. (2013) позитивність за АЦЦП, як у низьких, так і високих титрах передбачала виникнення артриту суглобів кисті протягом двох років, причому в пацієнтів із високими титрами АЦЦП ризик був вищим. Крім того, термін встановлення діагнозу РА був коротший у пацієнтів із високими титрами АЦЦП, ніж із низькою концентрацією антитіл [4]. В інших дослідженнях наявність АЦЦП підтверджувала діагноз РА у разі серонегативності за РФ. Більша кількість ерозій спостерігалась у випадках серопозитивності РА за АЦЦП. Комбіноване визначення РФ і АЦЦП у сироватці крові мало більше діагностичне та прогностичне значення у пацієнтів із РА, ніж застосування їх поодиночі [16, 17]. У дослідженні Борткевича О.П. та ін. (2008) не було кореляційного зв'язку рівня АЦЦП із конституційними особливостями пацієнтів (віком, статтю), окремими клінічними проявами РА (тривалістю ранкової скрутості, оцінкою інтенсивності болю за ВАШ, наявністю позасуглобових проявів тощо), лабораторними показниками (рівнем гемоглобіну, лейкоцитів, швидкості осідання еритроцитів), а також із активністю процесу. Проте встановлено кореляційний зв'язок концентрації АЦЦП у сироватці крові з наявністю випоту в суглобах у пацієнтів із РА, за даними УЗД, та рівнем С-реактивного білка у сироватці крові. Це може свідчити про можливість використання АЦЦП не лише як діагностичного маркера РА, а також як показника інтенсивності запалення [2].

У нашому дослідженні встановлено, що у хворих на РА з різними генотипами за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР рівень РФ істотно не відрізнявся. Проте існувала статистично вірогідна відмінність рівня АЦЦП залежно від генотипу за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР ($p=0,02$). Так, за наявності G/G генотипу в 6,4 раза частіше траплявся серопозитивний варіант РА. За наявності C/C та C/G генотипів серопозитивний і серонегативний РА виявлялися з однаковою частотою.

Отримані нами результати щодо зв'язку *Bcl1* поліморфізму гена глюкокортикостероїдного рецептора із концентрацією антитіл до циклічного цитрулінового пептиду у хворих на ревматоїдний артрит, зокрема асоціація G/G генотипу із його серопозитивним варіантом дозволять оптимізувати тактику лікування та профілактику несприятливого перебігу даного захворювання.

Висновки

1. G/G генотип глюкокортикостероїдного рецептора асоційований із серопозитивним варіантом ревматоїдного артриту за вмістом антитіл до циклічного цитрулінового пептиду.

2. Відсутній зв'язок генотипів за *Bcl1* поліморфізмом гена глюкокортикостероїдного рецептора із серологічними варіантами ревматоїдного артриту за концентрацією ревматоїдного фактору.

Перспективи подальших досліджень. Зважаючи на асоціацію G/G генотипу за *Bcl1* поліморфізмом гена ГР із АЦЦП – позитивним РА доцільним є дослідження зв'язку даного поліморфізму з активністю захворювання з метою удосконалення тактики лікування.

Література

1. Борткевич О.П. Клініко-діагностичне значення антитіл до циклічного цитрулінового пептиду у пацієнтів з різною тривалістю ревматоїдного артриту / О.П. Борткевич, Ю.В. Білявська // Укр. ревматол. ж. – 2008. – № 3 (33). – С. 58-64.
2. Головач І.Ю. Антицитруліновані антитіла в ревматології – вчора, сьогодні, завтра / І.Ю. Головач // Здоров'я України. – 2012. – № 2 (22). – С. 77-79.
3. Клиническое значение *Bcl1* полиморфизма гена глюкокортикоидного рецептора у детей с ювенильным идиопатическим артритом / М. М. Костик, Д. Н. Баранов, А. А. Козырева [и др.] // Вопр. практ. педиатрии. – 2008. – № 6 (3). – С. 8-11.
4. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody titer predicts time to rheumatoid arthritis onset in patients with undifferentiated arthritis: results from a 2-year prospective study / N. Bizzaro, E. Bartoloni, G. Morozzi [et al.] // Arthritis Research Therapy. – 2013. – № 15. – R. 16.
5. Association between *Bcl1* 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. 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.
7. Characterization of the *Bcl1* Polymorphism in the Glucocorticoid Receptor Gene / I. Fleury, P. Beaulieu, M. Primeau [et al.] // Clinical. Chemistry. – 2003. – Vol. 49, № 9. – P. 1528-1531.
8. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinations recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies / G. A. Schellekens, B. A. de Jong, F. H. Van den Hoogen [et al.] // J. Clin. Invest. – 1998. – Vol. 101 (1). – P. 273-281.
9. DeRijk R. Glucocorticoid receptor variants: clinic implications / R. DeRijk, M. Schaaf, E. de Kloet // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. – 2002. – Vol. 81. – P. 103-122.
10. 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.

11. Glucocorticoid receptor gene polymorphism and juvenile idiopathic arthritis [Електронний ресурс] / М.М. Kostik, А.А. Klyushina, М.В. Moskalenko [et al.] // *Pediatric Rheumatology*. – 2011. – Vol. 9 (2). – Режим доступу до журн. : <http://www.ped-rheum.com/content/9/1/2>.
12. Glucocorticoid receptor polymorphisms in Korean patients with rheumatoid arthritis / E. B. Lee, J. Y. Kim, Y. J. Lee [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2005. – Vol. 64. – P. 503-504.
13. High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis / K. Suzuki, T. Sawada, A. Murakami [et al.] // *Scand. J. Rheumatol.* – 2003. – Vol. 32 (4). – P. 197-204.
14. Identification of the *Bcl1* 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.
15. Investigation of glucocorticoid receptor gene *Bcl1* polymorphism in rheumatoid arthritis / A. Aydeniz, T. Sever, S. Pehlivan [et al.] // *Turkish J. Rheumatology*. – 2011. – Vol. 26, № 3. – P. 199-203.
16. Study of significance of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in rheumatoid arthritis / T. Kanakadurgamba, I. J. Padmaja, N. Mohan [et al.] // *J. of Dr. NTR University of health sciences*. – 2014. – Vol. 3 (4) – P. 238-242.
17. The likelihood of persistent arthritis increases with the level of anti-citrullinated peptide antibody and immunoglobulin M rheumatoid factor: a longitudinal study of 376 patients with very early undifferentiated arthritis / M. D. Mjaavatten, D. Van der Heijde, T. Uhlig [et al.] // *Arthritis Res. and Ther.* – 2010. – № 12. – P. 76.

СВЯЗЬ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ВАРИАНТА РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА С ГЕНОТИПОМ BCL1 ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДНОГО РЕЦЕПТОРА

Л.Н. Приступа, О.В. Савченко

Резюме. У 161 больного ревматоидным артритом (РА) исследована связь серологического варианта РА с генотипами по *Bcl1* полиморфизму гена глюкокортикоидного рецептора (ГР). Встановлено, что при наличии G/G генотипа ГР чаще встречается серопозитивный вариант РА по содержанию антител к циклическому цитрулиновому пептиду. Предполагается, что изучение свяжи генотипов по *Bcl1* полиморфизму гена ГР с разными серологическими вариантами РА является перспективным в отношении прогнозирования неблагоприятного течения этой болезни.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, ревматоидный фактор, антитела к циклическому цитрулиновому пептиду, *Bcl1* полиморфизм, глюкокортикоидный рецептор.

CONNECTION BETWEEN RHEUMATOID ARTHRITIS SEROLOGIC VARIANT AND BCL1 POLYMORPHISM GENOTYPES OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR GENE

L.N. Prystupa, O.V. Savchenko

Abstract. Objective of our research consisted in investigation of connection between rheumatoid arthritis (RA) and *Bcl1* polymorphism genotypes of glucocorticoid receptor gene (GR).

Materials and methods. Study involved 161 RA patients aged over 40 as well as 96 healthy individuals. We used routine examination of RA diagnostics, anthropometric, and molecular genetic methods. Statistical analysis of the results was performed using SPSS-17 program.

Results. Having carried out the research, we defined the absence of probable difference in *Bcl1* polymorphism genotype distribution of GR gene depending on RA serologic variant rheumatoid factor (RF). However, we proved the statistically probable difference in *Bcl1* polymorphism genotype distribution of GR gene depending on the RA serologic variant with anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (A-CCP). Thus, seropositive RA occurred by 6,4 times more often in the presence of G/G genotype. Seropositive and seronegative variants occurred with the same frequency in the presence of both C/C and C/G genotypes. Consequently, this research proves that G/G *Bcl1* polymorphism genotype of GR gene is associated with seropositive RA with A-CCP.

Conclusion. It has been found out that in the presence of G/G genotype, seropositive RA with A-CCP occurs more often than the seronegative one. There were established no connections between *Bcl1* polymorphism genotypes of GR gene and serologic variants of RA by RF. Therefore, the investigation of connection between *Bcl1* polymorphism genotypes of GR gene and RA serologic variants with A-CCP is of high potential for prognosis of unfavorable disease progression.

Key words: rheumatoid arthritis, rheumatoid factor, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, *Bcl1* polymorphism, glucocorticoid receptor.

Medical Institute of State University (Sumy)

Рецензент – проф. О.І. Волошин

Buk. Med. Herald. – 2015. – Vol. 19, № 4 (76). – P. 145-148

Надійшла до редакції 02.07.2015 року