

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 (IL-1β)
У БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Валентина Михайловна Алифирова¹, Юлия Юрьевна Орлова¹,
Марина Андреевна Титова¹, Надежда Викторовна Чердынцева²

¹Сибирский государственный медицинский университет, кафедра неврологии и нейрохирургии,
634050, Томск, Московский тракт 2, nerv@ssmu.tomsk.ru,

²НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, 634050, Томск, пер. Кооперативный, 5, nii@oncology.tomsk.ru

Реферат. Обследовано 60 пациентов с ремиттирующим типом течения рассеянного склероза. Проведено генотипирование с помощью полимеразной цепной реакции по полиморфному варианту +3953 A1/A2 гена IL-1β. Обнаружено, что полиморфизм IL-1β +3953 A1/A2 не является ведущим фактором в восприимчивости к рассеянному склерозу и не определяет фенотип заболевания. В то же время наличие того или иного аллеля может вносить свой вклад в дисбаланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами.

Ключевые слова: генотип, аллель, иммунный ответ, рассеянный склероз.

ТАРКАУ СКЛЕРОЗ БЕЛ•Н АВЫРУЧЬЛАРДА
ИНТЕРЛЕЙКИН-1 (IL-1β) ГЕНЫ ПОЛИМОРФИЗМЫ

Валентина Михайловна Алифирова¹,
Юлия Юрьевна Орлова¹, Марина Андреевна Титова¹,
Надежда Викторовна Чердынцева²

Себер д•ул•т медицина университеты, неврология н•м
нейрохирургия кафедрасы, 634050, Россия, Томск ш•н•ре,
М•ск•у тракты, 2, nerv@ssmu.tomsk.ru, Томск ф•нни
уз•гене• Онкология ф•нни-тикшерену институты, 634050,
Томск, Кооператив тыкрыгы, 5, nii@oncology.tomsk.ru

Ремиссия тибындагы таркау склероз бел•н авырган 60
пациентны тикшерг•нн•р. IL-1β геныны• +3953 A1/A2
полиморф варианты буенча полимераз чылбырлы реакция
ярд•менд• генотиплаштыру уздырылган. IL-1β +3953 A1/A2
полиморфизмыны• таркау склерозга бирешүч•нлект• •йд•н
баручы фактор булып тормавы н•м авыруны• фентибын
билгел•м•ве ачыкланган. Шул ук вакытта теге яки бу аллель-
не• булуы ялкынсынуга каршы н•м провоспалительный
цитокиннар арасында дисбаланс булдыруга үз өлешен керт•.

Төп төшенчел•р: генотип, аллель, иммун•авабы, таркау
склероз.

POLYMORPHISM OF INTERLEUKIN GENE-1 (IL-1β)
IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Valentina M. Alifirova¹, Yulia Yu. Orlova¹, Marina A. Titova¹,
Nadejda V. Cherdynseva²

¹ Siberian State Medical University, Neurology and
Neurosurgery Department, House 2, Moskovskiy prospect,
634050, Tomsk, Russia, e-mail: nerv@ssmu.tomsk.ru,

²Cancer Research Institute of Tomsk Scientific Centre of the
Russian Academy of Medical Sciences, 634050 Tomsk,
Cooperative street, 5, nii@oncology.tomsk.ru

There were examined 60 patients with remitting type of
multiple sclerosis. Genotyping had been performed with the help

of PCR by a polymorphic variant +3953 A1/A2 gene IL-1β. It
was found that polymorphism IL-1β +3953 A1/A2 is not the
leading factor in a susceptibility to multiple sclerosis and does
not define the disease phenotype. At the same time presence of
some or other allele can contribute into misbalance between
proinflammatory and anti-inflammatory cytokines.

Key words: genotype, allele, immune answer, multiple
sclerosis.

Интерлейкин-1 (ИЛ-1, IL-1) образует целое
семейство цитокинов, включая провоспа-
лительные IL-1α и IL-1β, а также ИЛ-1 ингибитор
(ИЛ-1 рецепторный антагонист, IL1RN). Гены
IL-1α, IL-1β и IL1RN, локализованные в кластере
2 хромосомы (локус 2q14), имеют несколько
полиморфизмов, которые влияют на продукцию
этого цитокина мононуклеарами периферической
крови при стимуляции [15]. При этом
полиморфизмы IL-1β включают нуклеотидные
замены в позиции -511 (C→T) и в 5-ом экзоне в
позиции +3953 (C→T), причем аллель 1
полиморфизма IL-1β +3953 A1+ ассоциирован с
умеренным увеличением продукции IL-1β при
активации липополисахаридами [9].

Интерлейкин 1 представляет собой белок
15-18kD и является одним из основных
эндогенных пирогенов, продуцируется многими
клетками в ответ на повреждение, инфекцию или
антиген, имея ведущее значение в комплексной и
многообразной реакции, известной как реакция
острой фазы воспаления. Этот цитокин влияет на
разнообразные клетки, вызывая возрастание
цитотоксической активности НК-клеток (нату-
ральных киллеров), повышение метаболической
активности полиморфноядерных клеток, которые
мигрируют в очаг продукции IL-1. Кроме того,
происходят индукция синтеза молекул адгезии и
прокоагулянтов в эндотелиальных клетках и
повышение проницаемости эндотелия. Наряду с

этим одним из эффектов интерлейкина-1 является повышение продукции простагландинов и цитокинов макрофагами с увеличением их хемотаксической и цитотоксической активности. Имеет место усиление пролиферации Т-хелперных клеток, экспрессии IL-1 и продукции других цитокинов, а также пролиферация В-лимфоцитов в антитело-образующие клетки [1].

Интерес к этому цитокину при изучении РС определяется многообразием его влияния на воспалительный процесс, а также тем, что ИЛ-1 был выявлен в очагах РС [2]. Кроме того, у больных РС была обнаружена способность моноцитов периферической крови при стимуляции вырабатывать IL-1 α и IL-1 β в больших количествах, чем у здоровых людей [4].

В связи с этим активно изучается вопрос о том, связаны ли генетически детерминированные полиморфные варианты продукции этого цитокина с восприимчивостью к РС или с клиническими особенностями этого заболевания. Сообщения об этом отличаются крайней противоречивостью. В частности выявлена ассоциация между различными полиморфизмами IL-1 и исходом РС [5, 6], а также его тяжестью, что дало основание некоторым исследователям сделать заключение, что IL-1 α и IL-1 β — это, скорее, гены тяжести РС, а не восприимчивости к нему [10, 11]. Другие авторы, напротив, не подтверждали связь между восприимчивостью и/или тяжестью РС и полиморфизмами гена IL-1 [3, 7, 14].

Нами проведено генотипирование по полиморфному варианту +3953 A1/A2 гена IL-1 β 60 больных РС и 139 здоровых лиц. В этой выборке преобладали пациенты с ремиттирующим течением заболевания (48 чел.), в связи с этим мы не анализировали в зависимости от типа течения РС. 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 \times буфера для амплификации, 0,5-1,0 е.а. Таq ДНК-полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск) и 100 нг геномной ДНК. Смесь помещали в 0,5 мл пробирки типа «Эппендорф», наслаивали сверху минеральное масло для предотвращения испарения и амплифицировали в автоматических минициклерах «Терцик» (Россия). Программа амплификации включала предварительную денатурацию при 94 $^{\circ}$ C в течение 5 минут с последующими 33 циклами

отжига при специфической для каждой пары праймеров (1 мин), элонгации цепи при 72 $^{\circ}$ C (40 с) и денатурации при 94 $^{\circ}$ C (40 с). Программу завершала финальная элонгация при 72 $^{\circ}$ C в течение 3 минут.

Амплификат подвергали гидролизу соответствующей рестриктазой при оптимальной для фермента температуре в течение 12 часов. Рестрикционная смесь включала 3-5 мкл амплификата, 1,0-1,2 мкл 10 \times буфера для рестрикции, поставляемого фирмой-производителем («Сибэнзим», Новосибирск), и 1-5 единиц активности фермента (в зависимости от эффективности его работы). Продукты рестрикции фракционировали в 3% агарозном геле, содержащем бромистый этидий, при напряжении 120 В в течение 30 минут и визуализировали в ультрафиолетовом свете. Электрофореграмма исследованного полиморфизма представлена на рис. 1.

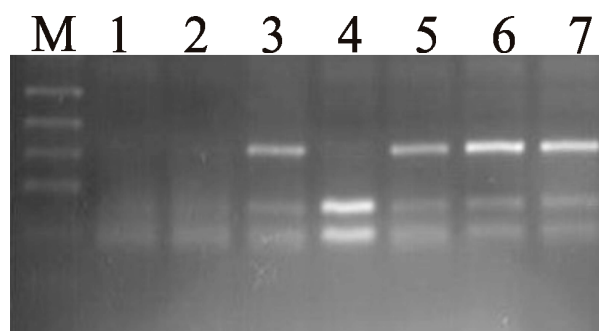


Рис. 1. Электрофореграмма, демонстрирующая генотипирование по полиморфному маркеру A1(+3953)A2 гена IL1B: дорожка 4 — генотип A2/A2; 3, 5, 6, 7 — генотип A1/A2; M — маркер pUC DNA/ MspI.

При анализе частоты генотипа и аллелей IL-1 β у больных РС и здоровых людей значимых различий не выявлено (табл.1). При этом частота аллеля A2 соответствовала литературным данным о распространенности этого аллеля среди европеоидов, которая составляет 24—26% [6, 12]. В то же время у японцев и китайцев (Тайвань), а также у корейцев этот аллель встречается намного реже — от 1 до 4% [13]. Обращает на себя внимание то обстоятельство, что распространенность РС среди европеоидов также выше, чем в других популяциях.

При анализе клинических проявлений РС у обследованных пациентов ассоциации с определенным полиморфизмом не выявлено. Частота обострений, скорость прогрессирования заболевания, неврологический дефицит по шкале EDSS и отдельным функциональным системам были сходны среди больных РС с различным генотипом IL-1 β .

Таблица 1

Частота аллелей и генотипов полиморфного варианта IL-1 β у больных РС и здоровых лиц (IL-1 β +3953 A1/A2)

	Здоровые	Больные РС	χ^2	OR	CI _{95%}
Генотипы					
A1/A1	90 (64,75%)	43 (71,66%)	A1/A1 vs A1/A2 0,39 (p=0,534)	1,31	0,63-2,74
A1/A2	44 (31,66%)	16 (26,67%)	A1/A2 vs A2/A2 0,13 (p=0,720)	2,39	0,26-55,75
A2/A2	5 (3,59%)	1 (1,67%)	A1/A1 vs A2/A2 0,00 (p=0,965)	1,82	0,18-44,36
Всего	139	60			
Аллели					
A1	224	102	0,83 (p=0,362)	1,57	0,74-2,55
A2	54 (19,42%)	18 (15,00%)			
Всего	278	120			

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

Таблица 2

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта IL-1 β у больных мужчин и женщин

Полиморфизм	Генотипы/ аллели	Мужчины		Женщины		p
		n	частота	n	частота	
IL1 β A1(+3953)A2	A1/A1	16	0,52	42	0,72	n.s.
	A1/A2	15	0,48	15	0,26	
	A2/A2	0	0	1	0,02	
	A1	47	0,76	99	0,85	
	A2	15	0,24	17	0,15	

Примечание: n.s. — статистически незначимый уровень отличий.

Таблица 3

Показатели клеточного иммунитета у больных РС в зависимости от генотипа IL-1 β , Me (Q1-Q3)

Иммунологические показатели	Генотип IL-1 β		p
	A1/A1	A1/A2	
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	4,80 (4,00-6,50)	5,10 (4,60-6,00)	n.s.
Лимфоциты, %	22,50 (18,00-29,00)	26,00 (22,00-32,00)	n.s.
Лимфоциты, 10^9 /л	1,11 (0,84-1,60)	1,34 (1,04-1,70)	n.s.
CD3 ⁺ , %	58,00 (48,00-63,00)	53,50 (48,00-61,00)	0,059
CD3 ⁺ , $\times 10^9$ /л	0,70 (0,46-0,87)	0,71 (0,56-0,82)	n.s.
CD4 ⁺ , %	34,50 (18,50-43,50)	42,50 (34,00-47,00)	n.s.
CD4 ⁺ , $\times 10^9$ /л	0,37 (0,24-0,61)	0,52 (0,37-0,72)	0,057
CD8 ⁺ , %	30,00 (24,00-36,00)	34,00 (29,00-38,00)	n.s.
CD8 ⁺ , $\times 10^9$ /л	0,36 (0,25-0,50)	0,49 (0,39-0,64)	0,011
CD16 ⁺ , %	16,50 (12,50-20,00)	18,00 (16,00-20,00)	n.s.
CD16 ⁺ , $\times 10^9$ /л	0,21 (0,12-0,32)	0,27 (0,18-0,34)	n.s.
CD25 ⁺ , %	17,00 (10,00-25,00)	18,00 (14,00-21,00)	n.s.
CD25 ⁺ , $\times 10^9$ /л	0,19 (0,12-0,28)	0,23 (0,19-0,30)	0,057
CD95 ⁺ , %	19,50 (13,50-26,50)	17,50 (16,00-20,00)	n.s.
CD95 ⁺ , $\times 10^9$ /л	0,24 (0,18-0,26)	0,26 (0,21-0,46)	n.s.
HLA-DR ⁺ , %	18,00 (14,00-28,00)	22,00 (15,00-26,00)	n.s.
HLA-DR ⁺ , $\times 10^9$ /л	0,24 (0,17-0,32)	0,31 (0,15-0,35)	n.s.
CD4/CD8	1,12 (0,88-1,35)	1,22 (1,03-1,25)	n.s.

p — достигнутый уровень значимости; n.s. — нет статистически значимых различий. То же в табл. 4.

При сравнении больных мужчин и женщин по частотам аллельных вариантов изученных генов статистических различий не обнаружилось (табл. 2).

Проводился анализ показателей клеточного иммунитета в зависимости от генотипа IL-1 β (табл. 3).

Как видно из представленных данных, у обследованных больных РС, носителей генотипа A1/A1, абсолютное содержание CD8⁺ лимфоцитов ниже — $0,36 \times 10^9$ /л (Q1-Q3 $0,25-0,50 \times 10^9$ /л), в то время как у носителей генотипа A1/A2 этот

Таблица 4

Показатели гуморального иммунитета, фагоцитоза и комплемента у больных РС в зависимости от генотипа IL-1 β , Me (Q1-Q3)

Иммунологические показатели	Генотип IL-1 β		P
	A1/A1	A1/A2	
CD22 ⁺ , %	20,50 (15,00-26,00)	21,00 (18,00-21,00)	0,067
CD22 ⁺ , $\times 10^9$ /л	0,22 (0,14-0,29)	0,26 (0,22-0,35)	n.s.
IgM, г/л	1,20 (0,80-2,00)	1,35 (0,80-2,40)	n.s.
IgA, г/л	1,80 (1,20-2,60)	1,80 (1,40-3,80)	n.s.
IgG, г/л	11,00 (6,80-15,60)	10,90 (8,20-17,80)	n.s.
Иммунные комплексы, усл.ед.	77,50 (47,50-110,00)	80,00 (60,00-100,00)	n.s.
Фагоцитарный резерв, %	33,00 (16,00-44,00)	24,00 (10,00-32,00)	n.s.
Интенсивность реакции фагоцитоза, усл.ед.	60,00 (36,00-80,00)	35,00 (12,00-46,00)	0,015
Комплемент, гемолитические единицы	66,90 (54,62-82,35)	68,40 (59,00-78,20)	n.s.

показатель был равен $0,49 \times 10^9$ /л (Q1-Q3 0,39-0,64 $\times 10^9$ /л), $\chi^2=7,44$; df=2; p=0,024.

У носителей генотипа A1/A2 отмечена также более низкая интенсивность реакции фагоцитоза — 35,00 усл.ед. (Q1-Q3 12,00-46,00 усл.ед.) в сравнении с 60,00 усл.ед. (Q1-Q3 36,00-80,00 усл.ед.) у носителей генотипа A1/A1 ($\chi^2=6,83$; df=2; p=0,033), что может быть связано с функциональным значением анализируемого полиморфизма (табл. 4). При этом статистически значимых различий в продукции таких цитокинов, как ИЛ-1, ИЛ-2, ФНО- α , ИЛ-4 и ИФН- γ не выявлено. Это может быть связано прежде всего с тем, что продукция цитокинов зависит от многих причин, в том числе от патогенности и продолжительности влияния стимулов, а также от баланса между провоспалительными и противовоспалительными факторами.

Из 60 больных РС, которым проводилось генотипирование, 31 человек получал копаксон. При анализе частоты побочных явлений, среднегодовой частоты обострений до лечения и на фоне терапии статистически значимых отличий у больных с разным генотипом IL-1 β не выявлено. Тяжесть неврологических проявлений на фоне лечения в течение периода наблюдения (от 1 до 3 лет) у пациентов обследованных групп также не различалась, хотя это может быть связано с небольшим объемом выборки.

Очевидно, что полиморфизм IL-1 β +3953 A1/A2 не является ведущим фактором в восприимчивости к РС и не определяет фенотип заболевания. В то же время наличие того или иного

аллеля может вносить свой вклад в дисбаланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами, которые не только участвуют в патогенезе РС, но и являются точкой приложения современных иммуномодуляторов, изменяющих естественное течение этого прогрессирующего заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Poÿm, A.* Иммунология: пер. с англ / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. — М.: Мир, 2000. — 592 с.
2. *Brosnan, C.F.* Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species / C.F. Brosnan, B. Cannella, L. Battistini et al. // *Neurology*. — 1995. — Vol.45. — S.16—21.
3. *Ferri, C.* Lack of association between IL-1A and IL-1B promoter polymorphisms and multiple sclerosis / C. Ferri, F.L. Sciacca, L.M.E. Grimaldi et al. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. — 2000. — Vol.69. — P. 564—565.
4. *Iamamura, K.* Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in multiple sclerosis patients / K. Iamamura, A. Suzumura, F. Hayashi et al. // *Acta Neurol. Scand.* — 1993. — Vol. 87. — P. 281—285.
5. *Kantarci, O.H.* Association of two variants in IL-1beta and IL-1 receptor antagonist genes with multiple sclerosis / O.H. Kantarci, E.J. Atkinson, D.D. Hebrink, C.T. McMurray, B.G. Weinschenker // *J. Neuroimmunol.* — 2000. — Vol.106, №1-2. — P. 220—227.
6. *Mann, C.L.A.* Interleukin 1 genotypes in multiple sclerosis and relationship to disease severity / C.L.A. Mann, M.B. Davies, V.L. Stevenson et al. // *J. of Neuroimmunology*. — 2002. — Vol.129, №1. — P.197—204.
7. *Niino, M.* Genetic polymorphisms of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist in association with multiple sclerosis in Japanese patients / M. Niino, S. Kikuchi, T. Fukazawa et al. // *J. Neuroimmunol.* — 2001. — Vol.118, №2. — P. 295—299.
8. *Nishimura, M.* Contribution of the interleukin-1b polymorphism in multiple system atrophy / M. Nishimura,

H. Kawakami, O. Komure et al. // *Mov Disord.* — 2002. — Vol.17. — P. 808—811.

9. *Pociot, F.* A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro / F. Pociot, J. Molvig, L. Wogensen, H. Wosaae, J. Nerup // *Eur. J. Clin. Inves.* — 1992. — Vol. 22. — P. 396—402.

10. *Schrijver, H.M.* Association of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist genes with disease severity in MS / H.M. Schrijver, J.B. Crusius, B.M. Uitdehaad, M.A. Garcia Gonzales, P.J. Kostense, C.H. Polman, A.S. Pena // *Neurology.* — 1999. — Vol. 52, №3. — P. 595—599.

11. *Schrijver, H.M.* Interleukin (IL)-1 gene polymorphisms: relevance of disease severity associated alleles with IL-1beta and IL-1ra production in multiple sclerosis / H.M. Schrijver, J. Van As, J.B. Crusius, C.D. Dijkstra, B.M. Uitdehaag // *Mediators Inflamm.* — 2003. — Vol.12, №2. — P. 89—94.

12. *Tseng, L.H.* Single nucleotide polymorphisms in intron 2 of the human interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene: further definition of the IL-1 β and IL-1Ra polymorphisms in North American Caucasians and Taiwanese Chinese / L.H. Tseng, P.J. Chen, M.T. Lin et al. // *Tissue Antigens.* — 2001. — Vol.57. — P. 318—324.

13. *Um, J.Y.* Frequencies of interleukin 1 gene polymorphisms in Koreans / J.Y. Um, H.M. Kim // *Clinical Chemistry.* — 2003. — Vol.49, №12. — P.2101—2102.

14. *Wansen, K.* Immune system genes in multiple sclerosis: genetic association and linkage analyses on TCR beta, IGH, IFN-gamma and IL-1ra/IL-1 beta loci / K. Wansen, T. Pastinen, S. Kuokkanen et al. // *J. Neuroimmunol.* — 1997. — Vol. 79, №1. — P. 29—36.

15. *Waterer, G.W.* Science review: Genetic variability in the systemic inflammatory response / G.W. Waterer, R.G. Wunderink // *Critical Care.* — 2003. — Vol.7, №4. — P. 308—314.

Поступила 19.02.10.

