Оригинальные исследования

Анализ ассоциаций полиморфизма генов-кандидатов аутоиммунных заболеваний у лиц с семейными случаями диффузного токсического зоба и аутоиммунного тиреоидита

Рымар О.Д., Пьянкова А.К., Максимов В.Н., Шахматов С.Г., Щепина Ю.В., Рябиков А.Н., Мустафина С.В.

ФГБНУ "Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины", Новосибирск, Россия

Обоснование. Высокая частота семейной агрегации аутоиммунных заболеваний (АИЗ) щитовидной железы (ЩЖ) и значимый вклад генетических факторов риска в развитие данных заболеваний послужили поводом к проведению данного исследования.

Цель: изучить связь полиморфизмов некоторых генов иммунного ответа с семейными случаями АИЗ ЩЖ.

Методы. Обследовано 100 человек из 49 семей, в которых члены семей первой линии родства имели АИЗ ЩЖ (аутоиммунный тиреоидит (АИТ) или диффузный токсический зоб (ДТЗ)). 76 человек составили группу контроля. Данная группа сформирована из лиц, обследованных в скрининг-центре "НИИТПМ" в рамках эпидемиологического международного исследования HAPIEE (Детерминанты сердечно-сосудистых заболеваний в Центральной и Восточной Европе: когортное исследование). На основании результатов клинического осмотра, гормонального исследования, определения антител к тиреоидной пероксидазе и УЗИ ЩЖ в данной группе были исключены любые заболевания ЩЖ. Кроме того, все лица в группе контроля отрицали наличие члена семьи с любым диагностированным заболеванием ЩЖ. Всем пациентам были выполнены клинические, гормональные, ультразвуковые исследования. Генотипирование полиморфизма *A49G* гена *CTLA4* и *C1858T* гена *PTPN22* было выполнено для 70 пациентов (35 семей) с семейными случаями АИЗ ЩЖ и всем лицам из группы контроля.

Результаты. В 11 семьях (22,5%) АИЗ ЩЖ прослеживались на протяжении одного поколения (среди сибсов), в 38 семьях (75,5%) – в двух поколениях (родитель–потомок). Среди семейных случаев АИЗ ЩЖ преобладали пациенты с АИТ – 66%, ДТЗ встречался у 34%. АИТ у родителя и потомка встречался в 55% семей. В группе сибсов АИТ имел место у обоих родственников в 54% семей. Не получено различий в распределении частот генотипов полиморфизма *A49G* гена *CTLA4* у пациентов с семейными случаями АИЗ ЩЖ по сравнению с группой контроля. Носительство аллеля *T* полиморфизма *C1858T* гена *PTPN22* ассоциировано с риском развития АИЗ ЩЖ в группе потомков женского пола (ОШ = 3,175; 95% ДИ 1,423–7,262). Полученные результаты позволяют рекомендовать изучение данного полиморфизма для выявления пациенток группы риска.

Заключение. Учитывая, что ДНК-тестирование на современном этапе является одним из главных звеньев персонифицированной медицины, результаты молекулярно-генетического исследования семейных случаев АИЗ ЩЖ создают предпосылки для оптимизации диагностики данной категории пациентов.

Ключевые слова: *семейные случаи, аутоиммунные заболевания щитовидной железы, CTLA4, PTPN22.*

Association of candidate gene polymorphisms for autoimmune thyroid diseases in patients with familial diffuse toxic goiter and autoimmune thyroiditis

Rymar O.D., Pyankova A.K., Maksimov V.N., Shakhmatov S.G., Schepina Y.V., Ryabikov A.N., Mustafina S.V.

Institute of Therapy and Preventive Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Aim: to study the relation polymorphism of some genes of the immune response with familial autoimmune thyroid disease.

Materials and methods. 100 patients from 49 families were examined. At least 2 first-degree affected relatives with autoimmune thyroiditis or diffuse toxic goiter were included from each family. 76 persons were included to control group without thyroid pathology and negative history of any thyroid disease in families. Clinical, hormonal, ultrasound data was collected for each subject. Genotyping of *CTLA4 A49G* and *PTPN22 C1858T* polymorphisms was performed for 70 patients (35 families) with familial autoimmune thyroid disease and for all subjects from the control group.

Results. Autoimmune thyroid disease was observed among one generation (siblings) in 11 families (22.5%) and among two generations (parent-child) in 38 families (75.5%). Patients with chronic autoimmune thyroiditis with hypothyroidism in the outcome were dominated – 66%, 34% experienced diffuse toxic goiter. Autoimmune thyroiditis was observed in parent and offspring from 21 families (55%). In the group of siblings autoimmune thyroiditis was

© "Клиническая и экспериментальная тиреоидология", 2016

diagnosed for both relatives in 6 families (54%). Frequency of genotypes of *CTLA4 A49G* polymorphism is not differ between patients with familial autoimmune thyroid disease and control group. Carriage of T allele of *PTPN22 C1858T* polymorphism is associated with the risk of autoimmune thyroid disease developing in a group of female offspring: OR = 3.175; 95% CI 1,423–7,262. These results allow us to recommend to test this polymorphism to identify patients with the risk of autoimmune thyroid diseases in families.

Conclusion. Taking into account that DNA testing is one of the most important part of personalized approach in medicine, the current results of molecular genetic study for familial cases of autoimmune thyroid disease creates prerequisites for optimizing the diagnostic pathway of these patients.

Key words: *family cases, autoimmune thyroid disease, CTLA4, PTPN22.*

Обоснование

В основе развития аутоиммунных заболеваний (АИЗ) щитовидной железы (ЩЖ) лежит взаимодействие генетических факторов и триггеров окружающей среды, что приводит к ускользанию от механизма собственной иммунологической толерантности [1]. Косвенным подтверждением существования генетического компонента является высокая распространенность семейных случаев АИЗ ЩЖ, которая может быть выявлена в каждом третьем случае [2]. Различные исследовательские группы в течение многих лет неоднократно показывали, что лица с отягощенным семейным анамнезом по заболеваниям ЩЖ имеют больший риск возникновения данной патологии. T.H. Brix и соавт. оценили величину генетического компонента в развитии АИЗ ЩЖ, равную 75% [3]. Работы, связанные с полногеномным скринингом, позволили установить гены-кандидаты, предрасполагающие к развитию АИЗ ЩЖ, которые можно разделить на три типа: тиреоидспецифические гены, гены системы HLA, не-HLA иммунорегуляторные гены [4]. К последней группе относятся гены *CTLA4*, *PTPN22* [5]. При сравнительном анализе половозрастных и основных клинико-лабораторных характеристик пациентов с АИЗ ЩЖ г. Новосибирска определено, что у каждого третьего пациента имеется отягощенный наследственный анамнез по заболеваниям ЩЖ: среди лиц с диффузным токсическим зобом (ДТЗ) – 30%, у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) – 44%. Выявлена связь носительства аллеля *G* и генотипа *GG* полиморфизма *A49G* гена *CTLA4* с повышенным риском развития ДТЗ у мужчин [6]. Носительство аллеля *T* полиморфизма *C1858T* гена *PTPN22* у женщин ассоциировано с повышенным риском развития АИТ [7].

Таким образом, полученные ранее данные о семейной агрегации заболеваний ЩЖ, выявленные ассоциации полиморфизма *A49G* гена *CTLA4* с повышенным риском развития ДТЗ, полиморфизма *C1858T* гена *PTPN22* с АИТ, отсутствие в отечественной литературе работ, посвященных изучению генетических факторов семейных случаев АИЗ ЩЖ, обусловили проведение данного исследования.

Цель

Изучить связь полиморфизма некоторых генов иммунного ответа с семейными случаями АИЗ ЩЖ.

Методы

Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ “НИИ терапии и профилактической медицины”, протокол № 42 от 18.12.2012. Обследовано 49 семей, в которых члены семей первой линии родства имели АИЗ ЩЖ (АИТ или ДТЗ). **Критерии включения в группу семейных случаев АИЗ ЩЖ:** 1) подписание информированного согласия; 2) АИТ (с манифестным гипотиреозом) или ДТЗ; 3) наличие члена семьи первой степени родства с диагностированным АИТ или ДТЗ. *Критерии исключения из группы семейных случаев АИЗ ЩЖ:* 1) диагностированный узловой, диффузный эутиреоидный зоб, послеоперационный гипотиреоз, развившийся вследствие оперативного лечения узлового зоба, рака ЩЖ; 2) диагностированный подострый, послеродовый тиреоидит, субклинический гипотиреоз и субклинический тиреотоксикоз; 3) прием лекарственных препаратов, которые могут нарушать функцию ЩЖ, – содержащих йод в фармакологических дозах (амиодарон, рентгеноконтрастные соединения), интерферонов, препаратов лития.

Диагноз АИТ (с манифестным гипотиреозом) устанавливали на основании характерных жалоб, данных анамнеза, повышения уровня тиреотропного гормона (ТТГ) и снижения уровня тироксина (св.T_4) в случае сочетания классической ультразвуковой картины АИТ (снижение эхогенности или изменение структуры за счет гипоэхогенных очагов различной формы и размеров на фоне нормальной эхогенности) с повышенным уровнем антител к тиреоидной пероксидазе (АТ-ТПО).

Диагноз ДТЗ устанавливался на основании характерных жалоб, данных анамнеза, клинических симптомов тиреотоксикоза, диффузного увеличения ЩЖ, повышенного уровня св.T_4 наряду со снижением уровня ТТГ ниже 0,1 мЕд/л, повышением уровня антител к рецептору ТТГ. По данным ультразвукового исследования (УЗИ) учитывались увеличение объема ЩЖ, низкая эхогенность, неоднородность

эхоструктуры ткани ЩЖ. Кроме того, фиксировались сочетания ДТЗ с эндокринной офтальмопатией. При необходимости выполнялась радиоизотопная сцинтиграфия с ^{99m}Tc-пертехнетатом.

76 человек составили группу контроля. Данная группа сформирована из лиц, обследованных в скрининг-центре "НИИТПМ" в рамках эпидемиологического международного исследования HAPIEE. Проект поддержан грантами фонда WellcomTrust (064947/Z/01/Z и WT 081081 AIA) и Национального института возраста США (1 R01 AG23522-01) (2002–2006 гг.) (главные исследователи в Новосибирске – академик РАН Никитин Ю.П. и профессор Малютина С.К.). В проекте HAPIEE обследовалась репрезентативная выборка населения г. Новосибирска 45–69 лет, обследовано более 9000 человек. Из этого числа случайным образом выбрано 280 человек, которым проведено определение ТТГ, св.T_4, АТ-ТПО, выполнено УЗИ ЩЖ. Для генетического анализа в группу сравнения выбрали образцы ДНК 76 человек, сопоставимых по полу, у которых по результатам обследования, анамнезу были исключены любые заболевания ЩЖ. Кроме того, все лица в группе контроля отрицали наличие члена семьи с любым диагностированным заболеванием ЩЖ.

Определение объема ЩЖ и ее эхоструктуры проводилось с помощью ультразвукового исследования на аппарате ALOKA-SSD-1100 датчиком 9 МГц.

Определение гормонов тиреоидной группы, АТ-ТПО проведено в лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний "НИИТПМ" (руководитель – д.м.н., профессор РАН Рагино Ю.И.). Определение показателей ТТГ, св.T_4, АТ-ТПО проведено иммуноферментным методом с использованием коммерческих тест-систем. Границы условно-нормальных лабораторных показателей были взяты из инструкций использованных наборов: для базального уровня ТТГ – 0,167–4,05 мЕд/л, для св.T_4 – 10,0–26,0 пмоль/л, для АТ-ТПО – <30 Ед/мл.

Молекулярно-генетические исследования выполнены на базе лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний "НИИТПМ" (руководитель – д.м.н., доцент Максимов В.Н.). В нем приняли участие 70 пациентов (35 семей) с семейными случаями АИЗ ЩЖ и все лица из группы контроля. Выделение ДНК из крови проводилось методом фенол-хлороформной экстракции по модифицированной методике [8]. Генотипирование полиморфизма *A49G* в первом экзоне гена *CTLA4* проводили с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) с последующим расщеплением ПЦР продукта эндонуклеазой рестрикции PspEI ("СибЭнзим", г. Новосибирск). Для амплификации нужного фрагмента ДНК длиной 153 п.н. были использованы праймеры: 5` - AAGGC-TCAGC-TGAAC-CTGGT - 3` – прямой праймер; 5`- CTGCT-GAAAC-AAATG-AAACC-C - 3` – обратный праймер [9]. Детекцию полиморфизма *C1858T* в гене *PTPN22* проводили с помощью ПЦР с последующим ПДРФ-анализом. Для этого использовали эндонуклеазу рестрикции RsaI ("СибЭнзим", г. Новосибирск). Для амплификации нужного фрагмента ДНК длиной 252 п.н. использовались праймеры: 5` - CCATC-CCACA-CTTTA-TTTTA-TACT -3` – прямой праймер; 5`- GATAA-TGTTG-CTTCA-ACGGA-ATTT -3` – обратный праймер. Результаты рестрикции всех трех продуктов оценивали с помощью электрофореза в 4% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием.

Статистическая обработка: результаты исследований для количественных признаков представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25-й квартиль (Q1); 75-й квартиль (Q3)), качественные признаки представлены в виде абсолютных значений и процентных долей. Статистический анализ включал проверку характера распределения показателей. При наличии распределения, отличного от нормального, использовался непараметрический метод (тест Манна–Уитни для двух независимых выборок); различие пропорций и оценку соответствия частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга проводили с использованием критерия χ^2. Относительный риск развития заболевания оценивали с помощью показателя отношения шансов (ОШ). ОШ = 1 рассматривали как отсутствие ассоциации, ОШ > 1 – как фактор повышенного риска развития заболевания, ОШ < 1 – как фактор пониженного риска развития заболевания. Для всех статистических расчетов уровень *p*-value <0,05 считался статистически значимым.

Результаты

Обследовано 100 человек (9 мужчин и 91 женщина) с АИЗ ЩЖ из 49 семей. В 11 семьях (22,5%) АИЗ ЩЖ прослеживались на протяжении одного поколения (среди сибсов), медиана возраста в данной подгруппе составила 29 [24; 41] лет, в 38 семьях (77,5%) – среди двух поколений (родитель–потомок). Пациенты последней группы были разделены на две подгруппы: старшего и младшего поколения, куда вошли родители (медиана возраста 58 [51; 65] лет) и потомки (медиана возраста 30 [26; 39] лет). В структуре патологии доля лиц с ДТЗ среди всех пациентов составила 34% (34 человек), с АИТ – 66% (66 человек). Семейные случаи с ДТЗ у обоих членов семьи составили 24% (12 семей), с АИТ у обоих членов семьи – 56% (27 семей), в 20% (9 семей) имели

© "Клиническая и экспериментальная тиреоидология", 2016

Таблица 1. Частоты аллелей и генотипов полиморфизма *A49G* гена *CTLA-4* у лиц с АИТ или ДТЗ – членов семей с АИЗ ЩЖ

CTLA-4 (A49G)		Группа с ДТЗ, n_I (%)	Группа с АИТ, n_{II} (%)	Контроль, n_{III} (%)	$p_{I–III}$	$p_{II–III}$
Обследованные	Генотип/аллель					
Оба пола	*GG*	4 (17)	9 (20)	20 (26)	0,337	0,398
	AG	16 (66)	21 (45)	37 (49)	0,127	0,746
	AA	4 (17)	16 (35)	19 (25)	0,399	0,249
	G	24 (50)	39 (42)	77 (51)	0,937	0,210
	A	24 (50)	53 (58)	75 (49)	0,937	0,210
Женщины	*GG*	4 (18)	8 (19)	19 (28)	0,364	0,327
	AG	15 (68)	20 (49)	32 (47)	0,088	0,861
	AA	3 (14)	13 (32)	17 (25)	0,268	0,449
	G	23 (52)	36 (44)	70 (52)	0,926	0,279
	A	21 (48)	46 (56)	66 (48)	0,926	0,279

n_I = 24 (М/Ж = 2/22); n_{II} = 46 (М/Ж = 5/41); n_{III} = 76 (М/Ж = 8/68).

место оба заболевания. Также в исследование была включена одна семья, в которой заболевание прослеживалось у обоих родителей и потомка: супруги имели АИТ и ДТЗ, в то время как у потомка был диагностирован АИТ. Среди сибсов 55% (6 семей) имели АИТ у обоих родственников, 9% (1 семья) – ДТЗ, в 36% (4 семьи) были диагностированы оба заболевания. В подгруппе “родители–потомки” структура АИЗ ЩЖ выглядела следующим образом: у 55% семей имел место АИТ у обоих родственников (21 семья), у 26% (10 семей) – ДТЗ у родителя и потомка, в 19% (7 семей) были установлены оба заболевания. Клинико-лабораторные характеристики пациентов групп сравнения подробно представлены в опубликованной ранее работе авторов [10].

Таким образом, среди семейных случаев АИЗ ЩЖ преобладали пары с АИТ как в подгруппе родителей–потомков, так и среди сибсов. Данные результаты согласуются с высокой распространенностью АИТ в популяции, которая существенно превышает частоту ДТЗ. Так, в исследовании M.P. Vanderpump и соавт. было показано, что распространенность АИТ увеличивается с возрастом и составляет от 4 до 21% у женщин и от 3 до 16% у мужчин [11]. АИТ является причиной 70–80% всех случаев первичного гипотиреоза [12]. Гиперфункция ЩЖ определяется у 2% женщин, среди мужчин данное состояние встречается приблизительно в 10 раз реже [13].

Группу пациентов с семейными случаями АИЗ ЩЖ, для которых было проведено генетическое исследование, составили 70 пациентов (7 мужчин и 63 женщины) с АИТ или ДТЗ из 35 семей. Эти пациенты подписали информированное согласие на проведение генетического анализа. В группу сравнения (76 человек: 8 мужчин и 68 женщин) были включены лица, сопоставимые по полу, но более старшего возраста, чем в группе пациентов с семейными случаями АИЗ ЩЖ. Включение в группу сравнения лиц старшего возраста не является препятствием в генетическом исследовании, поскольку у них более вероятны фенотипические проявления заболеваний ЩЖ.

Ген *CTLA4* кодирует трансмембранный регуляторный белок, который экспрессируется на активированных Т-клетках и негативно регулирует их функцию. CTLA4 конкурирует с CD28 за связывание с его лигандом B7 на АПК, повышает порог активации Т-клеток и тем самым является необходимым посредником для стабильного взаимодействия Т-клеток и АПК. В ряде исследований на европеоидной и азиатской популяции была показана связь однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) *A49G* гена *CTLA4* с выработкой антител к компонентам ткани ЩЖ, восприимчивостью к ДТЗ и АИТ [14, 15]. В настоящем исследовании не получено различий в распределении частот генотипов полиморфизма *A49G* гена *CTLA4* у лиц с ДТЗ или АИТ – членов семей с АИЗ ЩЖ по сравнению с группой контроля (табл. 1).

Отдельно среди мужчин анализ не проводился, так как всего их было 7 человек с АИЗ ЩЖ.

По данным проведенных ранее исследований в г. Новосибирске, у мужчин носительство аллеля *G* и генотипа *GG* полиморфизма *A49G* гена *CTLA4* ассоциировано с повышенным риском развития ДТЗ, у женщин такой связи не было обнаружено [7].

У больных АИТ, как по данным других исследований на популяции города Новосибирска, так и по результатам настоящего исследования, не обнаружено гендерных различий в частоте генотипов и аллелей полиморфизма *A49G* гена *CTLA4* по сравнению с контрольной группой.

При изучении частот генотипов и аллелей в зависимости от степени родства значимых отличий выявлено не было (табл. 2).

W.-H. Ting и соавт. изучили частоту полиморфизма *A49G* гена *CTLA4* среди более чем 250 взрос-

Таблица 2. Распределение аллелей и генотипов полиморфизма *A49G* гена *CTLA-4* в группах сибсов, потомков, родителей с АИЗ ЩЖ

CTLA-4 (A49G)		Сибсы, n_I (%)	Потомки, n_{II} (%)	Родители, n_{III} (%)	Контроль, n_{IV} (%)	$p_{I–IV}$	$p_{II–IV}$	$p_{III–IV}$
Обследованные	Генотип/аллель							
Оба пола	*GG*	2 (10)	6 (24)	5 (20)	20 (26)	0,126	0,818	0,527
	AG	14 (70)	10 (40)	13 (52)	37 (49)	0,092	0,452	0,774
	AA	4 (20)	9 (36)	7 (28)	19 (25)	0,642	0,289	0,767
	G	18 (45)	22 (37)	23 (46)	77 (51)	0,524	0,066	0,568
	A	22 (55)	38 (63)	27 (54)	75 (49)	0,524	0,066	0,568
Женщины	*GG*	2 (10)	5 (24)	5 (22)	19 (28)	0,121	0,710	0,561
	AG	14 (73)	9 (43)	12 (52)	32 (47)	0,062	0,736	0,672
	AA	3 (16)	7 (33)	6 (26)	17 (25)	0,401	0,453	0,917
	G	18 (47)	19 (45)	22 (46)	70 (52)	0,655	0,480	0,669
	A	20 (53)	23 (55)	24 (54)	66 (48)	0,655	0,480	0,669

n_I = 20 (М/Ж = 1/19); n_{II} = 25 (М/Ж = 4/21); n_{III} = 25 (М/Ж = 2/23); n_{IV} = 76 (М/Ж = 8/68).

лых пациентов с ДТЗ и среди аналогичного количества детей с данным заболеванием. Авторы так же, как и в настоящем исследовании, не выявили существенных различий между пациентами старшей и младшей возрастных групп [16].

Ген *PTPN22* кодирует лимфоцитарную тирозинфосфатазу, которая является отрицательным регулятором Т-клеточной активации. Предполагается, что снижение супрессии Т-клеток приводит к активации в отношении аутоантигенов, что позволяет Т-клеткам уклониться от классического механизма толерантности [17]. Ранее среди жителей г. Новосибирска с ДТЗ, как среди мужчин, так и женщин, не было выявлено разницы в частоте генотипов и аллелей полиморфизма *C1858T* гена *PTPN22* по сравнению с группой контроля. Было установлено преобладание в группе пациентов с АИТ гомозиготного генотипа *TT* и аллеля *T* полиморфизма *C1858T* гена *PTPN22* по сравнению с группой здоровых. Носительство аллеля *T* у женщин было ассоциировано с повышенным риском развития АИТ [6]. Аналогичные данные о связи данного ОНП с АИТ были получены среди жителей Центральной Европы [18].

В настоящем исследовании гомозиготный генотип *TT* полиморфизма *C1858T* гена *PTPN22* был обнаружен только у женщин с АИЗ ЩЖ (табл. 3).

Все носители генотипа *TT* имели ДТЗ – 12% от всех случаев данного заболевания (табл. 4). Кроме того, в группе пациентов с ДТЗ отмечалось достоверно меньшее накопление гомозигот *CC* (58 против 79% в группе контроля, p = 0,047).

Носительство аллеля *T* определялось чаще в группе с семейными случаями ДТЗ по сравнению с группой контроля (27 против 11% соответственно). Данные отличия были достоверными (χ^2= 8,066, p = 0,005). Носительство аллеля *T* ассоциировано с повышенным риском ДТЗ (ОШ = 3,18; 95% ДИ 1,39–7,17).

Небольшое количество пациентов мужского пола с семейными случаями ДТЗ, вошедших в исследование, не позволило провести статистическое сравнение частот генотипов с группой контроля.

Гомозиготный генотип *TT* обнаружен только в группе женщин с ДТЗ (14% всех случаев данного заболевания). Частота гомозиготного генотипа *CC* была незначимо выше в группе контроля (78 против 59% в группе женщин с ДТЗ, p = 0,088). В группе пациенток с ДТЗ достоверно более часто встречалось носительство аллеля *T* по сравнению с контролем (29 и 11% соответственно, χ^2 = 8,107, p = 0,004). Носительство аллеля *T* ассоциировано с повышенным риском семейных случаев ДТЗ среди женщин (ОШ = 3,34; 95% ДИ 1,41–7,89).

У лиц с АИТ гетерозиготный генотип *CT* полиморфизма *C1858T* гена *PTPN22* определялся чаще, чем в группе контроля (39 и 21% соответственно, p = 0,033) (табл. 4). Частота носительства гомозиготного генотипа *CC* в группе контроля была выше, чем в группе пациентов с семейными случаями АИТ (79 против 61% соответственно, p = 0,033). Носительство гетерозиготного генотипа *CT* было ассоциировано с риском развития семейных случаев АИТ по сравнению с носительством гомозиготного генотипа *CC* (p = 0,031; ОШ = 2,41; 95% ДИ 1,07–5,41). Носительство аллеля *T* определялось чаще в группе с семейными случаями АИТ по сравнению с группой контроля (20 против 11%, p = 0,050), однако достоверной ассоциации с риском развития АИТ получено не было (ОШ = 2,07; 95% ДИ 0,99–4,29).

В подгруппе женщин с АИТ определялись те же тенденции, что и в объединенной группе лиц с АИТ обоих полов. В данный подгруппе гомозиготный

© “Клиническая и экспериментальная тиреоидология”, 2016

Таблица 3. Частоты аллелей и генотипов полиморфизма *C1858T* гена *PTPN22* у лиц с АИЗ ЩЖ

PTPN22 (C1858T)		Все лица с АИЗ ЩЖ, n_0 (%)	Контроль, n_{III} (%)	p_{0-III}
Обследованные	Генотип/аллель			
Оба пола	*TT*	3 (4)	0	–
	CT	25 (36)	16 (21)	0,050
	CC	42 (60)	60 (79)	0,010
	T	31 (22)	16 (11)	0,007
	C	109 (78)	136 (89)	0,007
Женщины	*TT*	3 (5)	0	–
	CT	22 (33)	15 (22)	0,151
	CC	38 (62)	53 (78)	0,046
	T	28 (21)	15 (11)	0,022
	C	98 (79)	121 (89)	0,022

n_0 = 70 (М/Ж = 7/63); n_{III} = 76 (М/Ж = 8/68).

Таблица 4. Частоты аллелей и генотипов полиморфизма *C1858T* гена *PTPN22* у лиц с АИТ или ДТЗ – членов семей с АИЗ ЩЖ

PTPN22 (C1858T)		Группа с ДТЗ, n_I (%)	Группа с АИТ, n_{II} (%)	Контроль, n_{III} (%)	p_{I-III}	p_{II-III}
Обследованные	Генотип/аллель					
Оба пола	TT	3 (12)	0	0	–	–
	CT	7 (29)	18 (39)	16 (21)	0,412	0,033
	CC	14 (58)	28 (61)	60 (79)	0,047	0,032
	T	13 (27)	18 (20)	16 (11)	0,005	0,050
	C	35 (73)	74 (80)	136 (89)	0,005	0,048
Женщины	TT	3 (14)	0	0	–	–
	CT	7 (27)	15 (37)	15 (22)	0,653	0,102
	CC	12 (59)	26 (63)	53 (78)	0,088	0,102
	T	13 (29)	15 (19)	15 (11)	0,004	0,056
	C	31 (71)	67 (81)	121 (89)	0,004	0,056

n_I = 24 (М/Ж = 2/22); n_{II} = 46 (М/Ж = 5/41); n_{III} = 76 (М/Ж = 8/68).

генотип *CC* определялся реже, чем в группе контроля (63 и 78% соответственно, p = 0,056), однако полученные отличия были незначимыми. Небольшое количество пациентов мужского пола с семейными случаями АИТ, вошедших в исследование, не позволило провести статистическое сравнение частот генотипов с группой контроля.

В подгруппе родителей имело место накопление гомозиготного генотипа *TT* среди пациентов с АИЗ ЩЖ по сравнению с группой контроля (4% против 0% соответственно). Более подробная информация приведена в табл. 5. Не было получено отличий по частоте носительства генотипа *CT* в подгруппах сибсов и родителей с семейными случаями АИЗ ЩЖ по сравнению с группой контроля (25 и 24% против 21% соответственно). В подгруппе потомков с АИЗ ЩЖ было установлено достоверное преобладание носительства гетерозиготного генотипа *CT* по сравнению с группой контроля (64 и 21% соответственно, p = 0,001). Кроме того, частота носительства гомозиготного генотипа *CC* была ниже в группе потомков с АИЗ ЩЖ по сравнению с группой контроля (28 и 79% соответственно). Полученные данные были статистически достоверны (p = 0,001). Носительство генотипа *CT* ассоциировано с риском развития семейных случаев АИЗ ЩЖ в группе потомков (ОШ = 6,96; 95% ДИ 2,39–20,34). Установлено увеличение частоты носительства аллеля *T* в данной подгруппе пациентов по сравнению с группой контроля (χ^2 = 35,813, p = 0,001). Носительство аллеля *T* ассоциировано с риском развития АИЗ ЩЖ в группе потомков (ОШ = 8,19; 95% ДИ 3,88–17,28). Среди потомков женского пола установлено, что носительство аллеля *T* ассоциировано с риском развития АИЗ ЩЖ (ОШ = 3,18; 95% ДИ 1,42–7,26).

Частота носительства аллеля *T* не отличалась между сибсами, родителями и контрольной группой женского пола (13, 15% против 11% соответственно).

Малый объем выборки мужчин не позволил оценить исследуемые параметры в группе сибсов, потомков и родителей по сравнению с контролем. Более подробная информация приведена в табл. 5.

Таблица 5. Частоты аллелей и генотипов полиморфизма *C1858T* гена *PTPN22* в группах сибсов, потомков, родителей с АИЗ ЩЖ

PTPN22 (C1858T)		Сибсы, n_I (%)	Потомки, n_{II} (%)	Родители, n_{III} (%)	Контроль, n_{IV} (%)	$p_{I–IV}$	$p_{II–IV}$	$p_{III–IV}$
Обследованные	Генотип/аллель							
Оба пола	*TT*	0	2 (8)	1 (4)	0	–	–	–
	CT	5 (25)	16 (64)	6 (24)	16 (21)	0,829	0,001	0,757
	CC	15 (75)	7 (28)	18 (72)	60 (79)	0,867	0,001	0,474
	T	5 (13)	20 (40)	8 (16)	16 (11)	0,712	0,001	0,299
	C	35 (87)	30 (60)	42 (84)	136 (89)	0,712	0,001	0,299
Женщины	*TT*	0	2 (10)	1 (4)	0	–	–	–
	CT	5 (27)	12 (57)	5 (22)	15 (22)	0,769	0,001	0,975
	CC	14 (73)	7 (33)	17 (74)	53 (78)	0,841	0,001	0,693
	T	5 (13)	16 (38)	7 (15)	15 (11)	0,176	0,002	0,451
	C	33 (87)	26 (62)	39 (85)	121 (89)	0,176	0,002	0,451

n_I = 20 (М/Ж = 1/19); n_{II} = 25 (М/Ж = 4/21); n_{III} = 25 (М/Ж = 2/23); n_{IV} = 76 (М/Ж = 8/68).

В данном исследовании был применен ассоциативный анализ в отношении изучения вклада ОНП двух иммунорегуляторных генов – *CTLA4* и *PTPN22*. Ассоциативный анализ – это высокочувствительный метод, позволяющий определить гены, имеющие вклад менее 5% от общего генетического вклада в развитие заболевания. На основании полученных результатов можно утверждать, что пациенты с семейными случаями АИЗ ЩЖ являются высокоинформативной моделью для изучения вклада генетических факторов. Так, на китайской популяции при исследовании частоты различных вариантов гена HLA-DRB1 среди 58 пациентов с АИТ и их родителей, а также среди 75 пациентов с данным заболеванием и их братьев/сестер была установлена ассоциация HLA-B*46:01 с предрасположенностью к АИТ в данной группе пациентов [19]. В ряде работ в качестве объекта выбирается только одна родословная. Так, в исследование, проведенное в Тунисе, было включено более 400 человек, принадлежащих одной родословной. Данная семья наблюдалась в течение 20 лет, всего в нее вошло 78 пациентов с АИЗ ЩЖ. На данной группе была показана ассоциация полиморфизмов генов *PTPN22*, тиреоглобулина, рецептора витамина D с развитием заболевания. Также были получены свидетельства в пользу взаимодействия генов. Наиболее значимая связь была обнаружена между упомянутыми выше генами и областью, кодирующей белки основного комплекса гистосовместимости [20].

Ранее среди жителей города Новосибирска нами были получены данные, что носительство генотипов *CT* и *TT* полиморфизма *C(–1)T* гена *CD40* ассоциировано с уменьшением риска развития семейных форм ДТЗ вне зависимости от степени родства (ОШ = 0,20; 95% ДИ 0,08–0,45). При АИТ ассоциаций полиморфизма *C(–1)T* гена *CD40* выявлено не было. Носительство аллеля *C* ассоциировано с повышенным риском развития семейных случаев ДТЗ (ОШ = 2,63; 95% ДИ 1,21–5,64), но не АИТ. Выявленные различия в частоте носительства аллеля *C* между группами сибсов и контролем (ОШ = 2,52; 95% ДИ 1,07–5,95), а также между группой матерей и контролем (ОШ = 2,44; 95% ДИ 1,156–4,98) позволили сделать вывод о возможности применения исследования полиморфизма *C(–1)T* гена *CD40* в качестве прогностического фактора. Так, при наличии брата или сестры с АИЗ ЩЖ или при наличии потомка с АИЗ ЩЖ носительство у сибса или у матери аллеля *C* ассоциировано с возникновением семейных случаев данного заболевания [21].

Заключение

Среди семейных случаев АИЗ ЩЖ преобладали пациенты с хроническим АИТ с исходом в гипотиреоз – 66%. АИТ у родителя и потомка встречался в 55% семей. В группе сибсов АИТ имел место у обоих родственников в 54% семей.

Не получено различий в распределении частот генотипов полиморфизма *A49G* гена *CTLA4* у пациентов с семейными случаями АИЗ ЩЖ по сравнению с группой контроля.

Носительство аллеля *T* полиморфизма *C1858T* гена *PTPN22* ассоциировано с риском развития АИЗ ЩЖ в группе потомков женского пола (ОШ = 3,175; 95% ДИ 1,423–7,262). Полученные результаты позволяют рекомендовать изучение данного полиморфизма для выявления пациенток группы риска.

Учитывая, что ДНК-тестирование на современном этапе является одним из главных звеньев персо-

© “Клиническая и экспериментальная тиреоидология”, 2016

нифицированной медицины, результаты молекулярно-генетического исследования семейных случаев АИЗ ЩЖ создают предпосылки для оптимизации диагностики в семьях у данной категории пациентов.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Работа проведена при поддержке ФГБНУ "НИИ терапии и профилактической медицины" в рамках утвержденной темы научной работы. Представленный в статье материал является частью диссертационного исследования Пьянковой А.К. В представленной работе использовались данные из банка ДНК популяции Новосибирска, который был создан "НИИТПМ" в ходе выполнения международного проекта HAPIEE (главные исследователи в Новосибирске – академик РАН Никитин Ю.П. и профессор Малютина С.К.). Проект HAPIEE (Детерминанта сердечно-сосудистых заболеваний в Центральной и Восточной Европе: когортное исследование) поддержан грантами фонда WellcomTrust (064947/Z/01/Z и WT 081081 AIA) и Национального института возраста США (1 R01 AG23522-01) (2002–2006 гг.).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация о вкладе каждого автора

Рымар О.Д. – концепция и дизайн исследования, сбор материала (подбор когорты пациентов), окончательная оценка полученных данных, написание и редактирование текста рукописи; Пьянкова А.К. – анализ научной литературы по теме исследования, подбор когорты пациентов, сбор, подготовка препаратов ДНК, генотипирование, систематизация и обработка материала, оценка и анализ полученных данных, написание текста рукописи; Максимов В.Н. – концепция и дизайн исследования, помощь в проведении генотипирования, систематизация и статистическая обработка материала, редактирование текста рукописи; Мустафина С.В. – сбор материала (подбор группы контроля), Шахматов С.Г. – сбор материала (УЗИ ЩЖ), Щепина Ю.В. – сбор материала (УЗИ ЩЖ), Рябиков А.Н. – оценка полученных данных УЗИ ЩЖ.

Список литературы

1. Dong YH, Fu DG. Autoimmune thyroid disease: mechanism, genetics and current knowledge. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(23):3611-3618.
2. Tomer Y, Davies TF. Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. *Endocr Rev.* 2003;24(5):694-717. doi: 10.1210/er.2002-0030.
3. Brix TH, Hegedus L. Twin studies as a model for exploring the aetiology of autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012;76(4):457-464. doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04318.x.
4. Tomer Y. Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future. *Thyroid.* 2010;20(7):715-725. doi: 10.1089/thy.2010.1644.
5. Ban Y. Genetic factors of autoimmune thyroid diseases in Japanese. *Autoimmune Dis.* 2012;2012:236981. doi: 10.1155/2012/236981.
6. Никитин Ю.П., Рымар О.Д., Максимов В.Н., и др. Связь полиморфизма C1858T гена PTPN22 с аутоиммунным тиреоидитом с исходом в гипотиреоз в популяции Новосибирска // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2009. – Т. 5. – №1. – С. 47-52. [Nikitin YP, Rymar OD, Maksimov VN, et al. Association of PTPN22 haplotypes with Hashimotos thyroiditis in population of Novosibirsk. *Clinical and experimental thyroidology.* 2009;5(1):47-52. (in Russ.)] doi: 10.14341/ket20095147-52.
7. Никитин Ю.П., Рымар О.Д., Максимов В.Н., и др. Полиморфизм A49G гена цитотоксического Т-лимфоцит-связанного иммуноглобулина 4 (CTLA4), связь с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы в популяции Новосибирска // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2008. – Т. 4. – №4. – С. 41–45. [Nikitin YP, Rymar OD, Maksimov VN, et al. Association of the T-cell regulatory Ggene CTLA-4 with suscep-tibility to autoimmune thyroid disease in population of Novosibirsk. *Clinical and experimental thyroidology.* 2008;4(4):41-45. (in Russ.)] doi: 10.14341/ket20084441-45.
8. Смит К., Калко С., Кантор Ч. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК. В кн.: Анализ генома. Под ред. К. Дейвиса, пер. с англ. – М.: Мир; 1990. – С. 58–94. [Smit K, Kalko S, Kantor Ch. *Puls-elektroforez i metody raboty s bolshimi molekulami DNK. In: Analiz genoma.* Ed by Deyvis K. Moscow: Mir; 1990. P:58-94. (in Russ.)]
9. Wong YK, Chang KW, Cheng CY, Liu CJ. Association of CTLA-4 gene polymorphism with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(1):51-54. doi: 10.1111/j.1600-0714.2005.00377.x.
10. Рымар О.Д., Пьянкова А.К., Максимов В.Н., Мустафина С.В. Семейные случаи аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2013. – Т. 9. – № 4. – С. 39–45. [Rymar OD, Pyankova AK, Maksimov VN, Mustafina SV. Family history of autoimmune thyroid disease. *Clinical and experimental thyroidology.* 2013;9(4): 39-45. (in Russ.)] doi: 10.14341/ket20139439-45.
11. Vanderpump MP. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull.* 2011;99:39-51. doi: 10.1093/bmb/ldr030.
12. Фадеев В.В. Заболевания щитовидной железы в регионе легкого йодного дефицита: эпидемиология, диагностика, лечение. – М.: Издательский дом Видар-М; 2005. – 240 с. [Fadeyev VV. *Zabolevaniya shchitovidnoy zhelezy v regione legkogo yodnogo defitsita: epidemiologiya, diagnostika, lechenie.* Moscow: Vidar-M; 2005. 240 p. (in Russ.)].
13. Brent GA. Clinical practice. Graves' disease. *N Engl J Med.* 2008;358(24):2594-2605. doi: 10.1056/NEJMcp0801880.
14. Kucharska AM, Wisniewska A, Popko K, Demkow U. Association between the polymorphism A/G at position 49 of exon 1 of the

CTLA-4 gene and antithyroid antibody production in children with Hashimoto's thyroiditis. *Horm Res Paediatr.* 2012;78(2):67-72. doi: 10.1159/000338997.
15. Ni J, Qiu LJ, Zhang M, et al. CTLA-4 CT60 (rs3087243) polymorphism and autoimmune thyroid diseases susceptibility: a comprehensive meta-analysis. *Endocr Res.* 2014;39(4):180-188. doi: 10.3109/07435800.2013.879167.
16. Ting WH, Chien MN, Lo FS, et al. Association of cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) gene polymorphisms with autoimmune thyroid disease in children and adults: Case-control study. *PLoS One.* 2016;11(4):e0154394. doi: 10.1371/journal.pone.0154394.
17. Heward JM, Brand OJ, Barrett JC, et al. Association of PTPN22 haplotypes with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(2):685-690. doi: 10.1210/jc.2006-2064.
18. Dultz G, Matheis N, Dittmar M, et al. The protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 C1858T polymorphism is a joint susceptibility locus for immunthyroiditis and autoimmune diabetes. *Thyroid.* 2009;19(2):143-148. doi: 10.1089/thy.2008.0301.
19. Huang CY, Chang TY, Chu CC, et al. The HLA-B gene and Hashimoto disease in Han Chinese children: a case-control and family-based study. *Tissue Antigens.* 2012;80(5):431-436. doi: 10.1111/tan.12003.
20. Bougacha-Elleuch N, Charfi N, Kharrat N, et al. A 20 year history of clinical and genetic study of thyroid autoimmunity in a Tunisian multigenerational family: Evidence for gene interaction. *Meta Gene.* 2014;2:63-71. doi: 10.1016/j.mgene.2013.11.003.
21. Рымар О.Д., Пьянкова А.К., Максимов В.Н., и др. Полиморфизм C(-1)T гена CD40, связь с семейными случаями аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2013. – Т. 9. – № 3. – С. 45–50. [Rymar OD, Pyankova AK, Maksimov VN, et al. Association between CD40 C/T1 polymorphism and familial autoimmune thyroid disease. *Clinical and experimental thyroidology.* 2013;9(3):45-50. (in Russ.)] doi: 10.14341/ket20139345-50.

Рымар Оксана Дмитриевна – д.м.н., заведующая лабораторией клинико-популяционных и профилактических исследований терапевтических и эндокринных заболеваний ФГБНУ "Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины", Новосибирск, Россия. **Пьянкова Анна Константиновна** – врач-эндокринолог, аспирантка ФГБНУ "Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины", Новосибирск, Россия. **Максимов Владимир Николаевич** – д.м.н., доцент, заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний ФГБНУ "Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины", Новосибирск, Россия. **Шахматов Сергей Геннадьевич** – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории этиопатогенеза и клиники внутренних заболеваний ФГБНУ "Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины", Новосибирск, Россия. **Щепина Юлия Владимировна** – научный сотрудник лаборатории этиопатогенеза и клиники внутренних заболеваний ФГБНУ "Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины", Новосибирск, Россия. **Рябиков Андрей Николаевич** – д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории этиопатогенеза и клиники внутренних заболеваний ФГБНУ "Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины", Новосибирск, Россия. **Мустафина Светлана Владимировна** – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинико-популяционных и профилактических исследований терапевтических и эндокринных заболеваний ФГБНУ "Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины", Новосибирск, Россия.

Для корреспонденции: Рымар Оксана Дмитриевна – Orymar23@gmail.com. Тел.: 8-913-735-43-48.

© "Клиническая и экспериментальная тиреоидология", 2016