

ПОЛИМОРФИЗМЫ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *TNFA* И ИХ ДВУХЛОКУСНЫЕ ГАПЛОТИПЫ У БОЛЬНЫХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

© 2018 г. Д. С. Сташкевич, А. А. Кобеляцкая, А. Л. Бурмистрова

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

Поступила: 04.05.2018. Принята: 18.06.2018

В работе приведены результаты исследования по распределению частот встречаемости аллельных вариантов, генотипов и гаплотипов полиморфизмов гена *TNFA* —1031T/C, —863C/A, —308G/A, —238G/A у больных неспецифическим язвенным колитом русской популяции Челябинской области. Генотипирование промоторной области *TNFA* осуществлено методом полиморфизма длин рестриционных фрагментов с последующей детекцией методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле. В группе больных НЯК установлено: повышение частот встречаемости аллеля *TNFA*-238*A, гетерозиготного генотипа *TNFA*-238GA, гомозиготного генотипа по предковому аллелю —863CC, двухлокусных гаплотипов *TNFA*-863*C-*TNFA*-238*A, *TNFA*-308*G-*TNFA*-238*A, *TNFA*-238*A-*TNFA*-1031*C. В группе больных реже встречались носители гетерозиготного генотипа *TNFA*-863C/A, гомозиготного генотипа *TNFA*-238GG, двухлокусного гаплотипа *TNFA*-308*G-*TNFA*-238*G, *TNFA*-238*G-*TNFA*-1031*C. Определены модели наследования для следующих полиморфных сайтов гена *TNFA*: сверхдоминантная модель характерная для *TNFA*-863C/A, а кодоминантная для *TNFA*-238G/A. Полученные данные свидетельствуют о том, что значимым для развития предрасположенности НЯК является полиморфизм —238 G/A *TNFA*.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, фактор некроза опухоли альфа, неспецифический язвенный колит

DOI: 10.31857/S102872210002425-2

Адрес: Челябинск, ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет» Сташкевич Дарья Сергеевна.

Тел.: +79080693872; **E-mail:** stashkevich_darya@mail.ru

Авторы:

Сташкевич Д. С., к. б. н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия;

Кобеляцкая А. А., магистрант кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия;

Бурмистрова А. Л., д. м. н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии, декан биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Неспецифический язвенный колит (НЯК) — это хроническое воспалительное аутоиммунное заболевание слизистой оболочки толстого кишечника. По распространенности НЯК зани-

мает одно из ведущих мест среди заболеваний органов пищеварения [1]. НЯК — заболевание с аутоиммунным компонентом, на иммунопатогенез которого оказывает влияние спектр провоспалительных цитокинов, в том числе TNFA [1, 2, 3]. Геном ассоциированные исследования (GWAS), проводимые во всем мире показали, что генетический компонент неспецифического язвенного колита включает в себя несколько локусов, расположенных на разных хромосомах: 16q12 (IBD1), 12q13 (IBD2), 6P13 (IBD3), 14q11 (IBD4), 5q31–33 (IBD5), 19P13 (IBD6), 1P36 (IBD7), 16P (IBD8), 3P (IBD9) и 7q [3]. Область IBD3, расположенная на в позиции бр21, содержит ген фактора некроза опухоли α (*TNFA*). Ген *TNFA*, благодаря своему положению между генами *HLA I* и *HLA II* класса, является одним из наиболее вероятных генов-кандидатов предрасположенности к НЯК [4, 5]. Ген *TNFA* является, пожалуй, одним из самых полиморфных

генов цитокинов. Его промоторно-энхансерная область содержит от 9 до 13 полиморфных сайтов типа SNPs, наиболее известными среди которых являются транзиции G/A в точках –308, –238, –163; транзиция T/C и C/T в сайтах –1031, –857, и трансверсия C/A –863. Кроме того, транскрибируемая часть гена содержит полиморфизмы типа SNP и микросателлиты. Общепринятой является точка зрения о том, что замены в точках –1031, –863, –308 повышают экспрессию [5, 6], а замена в –238, наоборот, снижает выработку белка TNF α [6]. Кроме того, для SNPs –1031, –863 и –857 характерно неравновесное сцепление [6, 7], и предполагается, что два SNPs –308 и –238 ассоциированы друг с другом: аллель –308*A встречается с –238*G, а аллель –308*G сочетается с –238*A [4].

Цель: провести анализ распределения частот аллелей, генотипов и гаплотипов, образованных SNPs в точках –1031 T/C, –863 C/A, –308 G/A, –238 G/A *TNFA* у больных неспецифическим язвенным колитом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данное исследование относится к ретроспективному типу «случай – контроль». Выборка больных состояла из 143 человек русской этнической группы с диагнозом НЯК (мужчин – 64, женщин – 79, средний возраст – 41,9 \pm 1,3), которые находились на лечении в гастроэнтерологических отделениях г. Челябинска. Группа сравнения состояла из 224 человек (128 мужчин, 96 женщин, средний возраст – 34,6 \pm 0,75), выбранных случайным образом из популяционной выборки, сформированной на основе ДНК-банка потенциальных доноров стволовой клетки ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», проживающих в г. Челябинске и Челябинской области. Популяционная принадлежность определялась по данным генеалогического анамнеза до третьего поколения (согласно рекомендациям 8-го Международного Симпозиума в 1980 г., Лос-Анджелес, США).

Выделение ДНК из образцов венозной крови проводилось колоночным методом с использованием реактивов PROTRANS DNA Box 500 (Германия). Определение однонуклеотидных полиморфизмов в промоторной области гена *TNFA* проводилось с помощью Полиморфизма длин рестрикционных фрагментов: ПЦР-амплификация (праймеры производства Синтол, г. Москва), инкубация с эндонуклеазами рестрикции (TaqI, BspI, TaqI, NcoI, BamHI производства

Fermentas by Thermo Fisher Scientific, USA) [автореферат Шашкевич]. Детекция результатов: горизонтальный электрофорез в 3% агарозном геле с последующей визуализацией с проходящим УФ-свете.

Статистическая обработка результатов. Критерии для анализа: частоты аллелей и генотипов (метод прямого подсчета), частоты гаплотипов и параметры сцепления (EM-алгоритм в статистическом пакете «Arlequin ver 3.5.1.2»). Для выявления достоверности различий частот применяли анализ таблиц сопряженности с определением критерия χ^2 Пирсона, χ^2 с поправкой Йетса, точный двусторонний критерий Фишера. В качестве меры количественной оценки взаимосвязи исхода и фактора определяли показатель отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (95% CI). Определение моделей наследования осуществляли с помощью онлайн-программы SNPStats [8]. Анализ данных проводился согласно 5 моделям наследования: кодоминантная, доминантная, рецессивная, сверхдоминантная и лог-аддитивная. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, незначимыми при $p > 0,10$; для промежуточных значений p ($0,05 > p > 0,10$) обсуждали тенденцию к различиям.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе было проведено сравнение наблюдаемых частот генотипов с ожидаемыми, согласно равновесию Харди-Вайнберга.

1. Анализ распределения частот встречаемости аллелей и генотипов позволил установить особенности распределения SNPs в следующих точках –863, –238. Группа больных неспецифическим язвенным колитом характеризовалась снижением частоты встречаемости аллеля с заменой –863*A (10,5% vs 15%; $\chi^2=3,04$, $p=0,08$; OR= 0,67, 95% CI 0,42–1,1), сниженной частотой гетерозиготного генотипа C/A–863, несущего высокопродуктивный аллель –863*A (18,2% vs 27,2%; $\chi^2=3,9$, $p=0,047$; OR= 0,59, 95% CI 0,35–0,99) и повышенной частотой гомозиготного генотипа –863CC по предковому аллелю (80,4% vs 71,4%; $\chi^2=3,8$, $p=0,05$; OR= 1.64, 95% CI 0,99–2,72). Согласно критерию отношения шансов прогностическое значение имеет снижение носительства аллеля с заменой и гетерозиготного генотипа. Анализ моделей наследования показал, что наиболее вероятной моделью, описывающей ассоциацию генотипа C/A с предрасположенностью к НЯК является

сверхдоминантная модель ($p=0,06$) согласно которой эффект гетерозиготного генотипа превышает эффекты гомозиготных генотипов.

Данные по распределению частот аллелей и генотипов, образованных полиморфизмом в точке $-238 G/A$ представлены в таблице.

Как видно из результатов, для больных было характерно снижение частоты гомозиготного по предковому аллелю генотипа ($TNFA-238GG$) и повышение частоты аллеля с заменой $TNFA-238^*A$ и несущего его гетерозиготного генотипа $TNFA-238GA$. Такое распределение имело прогностическое значение у лиц, несущих аллель с заменой -238^*A и генотип $TNFA-238GA$ вероятность возникновения НЯК возрастает в 2 раза согласно критерию отношения шансов (OR). В то время как гомозиготный генотип по предковому аллелю $TNFA-238GG$ может являться протектором возникновения НЯК у русских Челябинской области (OR=0,39; 95% CI 0,21–0,75). Анализ моделей наследования позволяет предположить, что фенотипический эффект проявления работы гомозиготного генотипа $TNFA-238GG$ и гетерозиготного генотипа $TNFA-238GA$ описываются кодоминантной моделью наследования ($p=0,003$).

Частоты встречаемости аллелей и генотипов SNPs $-308 G/A$, $-1031 T/C$ гена $TNFA$ не различались в выборках больных неспецифическим язвенным колитом и условно-здоровых лиц русской популяции Челябинской области.

2. На втором этапе работы были проанализированы частоты встречаемости и параметры

сцепления двухлокусных гаплотипов, образованных $-1031 T/C$, $-863 C/A$, $-308 G/A$, $-238 G/A$ $TNFA$. Установлено, что все исследуемые точки сцеплены друг с другом.

Двухлокусные гаплотипы $TNFA-308G/A - TNFA-863 C/A$. Было установлено снижение частоты гаплотипа $TNFA-308^*G-TNFA-863^*A$ у больных НЯК в сравнении с контрольной группой на уровне тенденции ($\chi^2=2,8$, $p=0,095$, OR=1,1295% CI 0,7–1,79). В обеих группах предковые аллели $TNFA-308^*G$ и $TNFA-863^*C$ не сцеплены ($D'=-1,00$), а аллели гаплотипов $TNFA-308^*G-TNFA-863^*A$, $TNFA-308^*A-TNFA-863^*C$, напротив, абсолютно сцеплены ($D'=1,00$).

Двухлокусные гаплотипы $TNFA-308G/A - TNFA-238 G/A$. Выявлено снижение частоты гаплотипа $TNFA-308^*G-TNFA-238^*G$ и увеличение частоты гаплотипа $TNFA-308^*G-TNFA-238^*A$ у больных НЯК в сравнении с контрольной группой ($\chi^2=6,032$, $p=0,015$; $\chi^2=11,279$, $p<0,001$). При расчете отношения шансов, показано, что гаплотип $TNFA-308^*G-TNFA-238^*G$ возможно оказывает протективный эффект (OR=0,636, 95% CI 0,44–0,91), а носительство гаплотипа $TNFA-308^*G-TNFA-238^*A$ повышает вероятность возникновения заболевания в 2,7 раза (OR=2,738, 95% CI 1,49–5,03). В обеих исследуемых группах предковые аллели $TNFA-308^*G$ и $TNFA-238^*G$ не сцеплены ($D'=-1,00$), а аллели гаплотипов $TNFA-308^*G-TNFA-238^*A$, $TNFA-308^*A-TNFA-238^*G$ являются абсолютно сцепленными ($D'=1,00$).

Таблица. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма гена $TNFA -238G/A$ у больных НЯК и контрольной группы

TNFA -238G/A	Больные НЯК		Контроль		χ^2 ; p	OR (95%CI)
	n=143	%	n=224	%		
Частоты встречаемости генотипов						
GG	117	81,8	206	91,69	3,76 p=0,053	OR=0,393 95% CI 0,21–0,75
GA	23	16,1	18	8,04	$\chi^2=5,697$ p=0,017	OR=2,2 95% CI 1,1–4,2
AA	3	2,1	0	0	$\chi^2=2,5$ p=0,11	-
Частоты встречаемости аллелей						
-238*G	257	89,86	430	95,98	$\chi^2=9,92$ p=0,002	OR= 0,371 95% CI 0,2–0,7
-238*A	29	10,14	18	4,02		OR=2,7 95% CI 1,47–4,95

Двухлокусные гаплотипы *TNFA-308G/A -TNFA-1031T/C*. Распределение частот гаплотипов полиморфизмов гена *TNFA -308G/A* и *-1031T/C* показывает на отсутствие достоверных различий между исследуемыми группами. И в группе больных НЯК, и в контрольной группе предковые аллели *TNFA-308*G TNFA-1031*T* находятся в не сцепленном состоянии ($D' = -1,00$), а аллели гаплотипов *TNFA-308*G-TNFA-1031*C*, *TNFA-308*A-TNFA-1031*T* абсолютно сцеплены ($D' = 1,00$).

Двухлокусные гаплотипы *TNFA-238G/A -TNFA-863C/A*. Особенностью группы больных явилось существование неравновесного сцепления между предковыми аллелями (*-238*G* и *-863*C*), тогда как в группе сравнения неравновесное сцепление между данными аллелями отсутствовало. Данный феномен требует дальнейшего изучения.

Анализ частот гаплотипов полиморфизмов гена *TNFA -863C/A* и *-238G/A* выявил следующие различия: снижение частоты гаплотипа *TNFA-863*C-TNFA-238*A* и повышение частоты гаплотипа *TNFA-863*A-TNFA-238*G* у больных НЯК ($\chi^2 = 4,78$, $p = 0,029$; $\chi^2 = 7,402$, $p = 0,007$). Расчет отношения шансов показал возможный протективный эффект гаплотипа *TNFA-863*A-TNFA-238*G* ($OR = 0,51$, 95% CI 0,31–0,83) и повышение вероятности возникновения НЯК в 2 раза для носителей гаплотипа *TNFA-863*C-TNFA-238*A* ($OR = 2,021$, 95% CI 1,06–3,84).

Двухлокусные гаплотипы *TNFA-863C/A -TNFA-1031T/C*. Выявлено, что аллели гаплотипов *TNFA-863*C-TNFA-1031*T*, *TNFA-863*A -TNFA-1031*C* находятся в сцепленном состоянии ($D' = 0,92$), а аллели гаплотипов *TNFA-863*C-TNFA-1031*C*, *TNFA-863*A-TNFA-1031*T* — не сцепленном ($D' = -0,92$). Распределение частот двухлокусных гаплотипов *TNFA-863C/A-TNFA-1031T/C* не имело значимых различий между исследуемыми группами.

Двухлокусные гаплотипы *TNFA-238G/A -TNFA-1031T/C*. Показано увеличение частоты гаплотипа *TNFA-238*A-TNFA-1031*C* на уровне тенденции и достоверное снижение частоты гаплотипа *TNFA-238*G-TNFA-1031*C* у больных НЯК в сравнении с контролем ($\chi^2 = 3,588$, $p = 0,059$; $\chi^2 = 4,141$, $p = 0,042$). Расчет отношения шансов показывает, что гаплотип *TNFA-238*A-TNFA-1031*C* повышает вероятность возникновения НЯК в 2 раза ($OR = 1,99$, 95% CI 0,96–4,1), а гаплотип *TNFA-238*G-TNFA-1031*C* возможно оказывает протективный эффект ($OR = 0,61$,

95% CI 0,38–0,99). В обеих группах аллели всех гаплотипов находятся в неравновесном сцеплении.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования частот аллельных вариантов, генотипов и гаплотипов полиморфизмов гена *TNFA -308G/A, -863C/A, -238G/A, -1031T/C* у больных НЯК нами было определена возможная ассоциация полиморфных сайтов *-863C/A* и *-238G/A* гена *TNFA* с НЯК.

Аллельный вариант полиморфизма гена *TNFA-863*A* связывают с более высокой продукцией цитокина [6], однако интересно то, что аллель с заменой скорее оказывает протективный эффект, нежели вызывает предрасположенность к патологии.

Вариативный аллель полиморфизма гена *TNFA-238*A* обуславливающий снижение экспрессии гена [4, 6], ассоциирован с увеличением вероятности возникновения заболевания в 2–3 раза. Таким образом, возможно именно снижение уровня продукции *TNFA* вносит вклад в иммунопатогенез НЯК. Частоты встречаемости двухлокусных гаплотипов в доступной литературе не описаны. Следует отметить, что все наиболее значимые отклонения в частотах встречаемости, имеющие прогностическое значение для формирования предрасположенности/устойчивости к неспецифическому язвенному колиту, характерны для двухлокусных гаплотипов несущих SNP-238G/A.

Это новые данные, которых нет в доступной нам литературе. Дальнейшее их изучение позволит по-новому взглянуть на диагностику, профилактику и лечение неспецифического язвенного колита.

ВЫВОДЫ:

Установлена значимость SNPs *-863C/A* и *-238G/A* гена *TNFA* для формирования устойчивости/предрасположенности к НЯК у русских Челябинской области согласно сверхдоминантной и кодоминантной моделям наследования соответственно.

Гаплотипы *TNFA-308*G-TNFA-238*G*, *TNFA-863*A-TNFA-238*G*, *TNFA-238*G-TNFA-1031*C* могут выступать в качестве протекторных, а гаплотипы *TNFA-308*G-TNFA-238*A*, *TNFA-863*C-TNFA-238*A* вероятные маркеры предрасположенности к НЯК у русских Челябинской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Главнов П. В., Лебедева Н. Н., Кащенко В. А., Варзин С. А. Язвенный колит и болезнь Крона. Современное состояние проблемы этиологии, ранней диагностики и лечения. Вестник СПбГУ 2015, 4, 48–72. [Glavnov P. V., Lebedeva N. N., Kash'enko V. A., Varzin S. A. Ulcerative colitis and Crohn disease. The modern state of problem of etiology, early diagnostics and treatment. Vestnik SPbGU2015, 4, 48–72].
2. Конович Е. А., Халиф И. Л., Шапина М. В. Иммунопатогенез воспалительных заболеваний кишечника. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии 2013, 4, 69–78. [Konovich E. A., Khalif I. L., Shapina M. V. Immunopatogenesis of irritable bowel diseases. Russian journal of immunology 2013, 4, 69–78].
3. Gök İ., Uçar F., Ozgur O. Inflammatory cytokine gene polymorphism profiles in Turkish patients with ulcerative colitis. Medicinski Glasnik 2015, 12 (1), 33–39.
4. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины: СПб.: Фолиант, 2008, 552 с. [Ketlinskiy S. A., Simbirtsev A. S. Cytokine. St. Petersburg. Foliant, 2008, 552].
5. Сташкевич Д. С., Бурмистрова А. Л., Кобеляцкая А. А. Полиморфизм генов провоспалительных цитокинов IL-1b, IL-6, TNFA у больных неспецифическим язвенным колитом русской популяции Челябинской области. Современные проблемы науки и образования. 2016, 4, 1–8. [Электронный ресурс] (URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25083>) [Stashkevich D. S., Burmistrova A. L., Kobelyatskaya A. A. Polymorphism of the genes of the proinflammatory cytokines IL-1b, IL-6, TNFA in patients with ulcerative colitis of the Russian population of the Chelyabinsk region. Modern problems of science and education. 2016, 4, 1–8. [An electronic resource]].
6. Сташкевич Д. С. Аллели и генотипы генов основных цитокинов и их межгенные и внутригенные связи в ассоциации с ревматоидным артритом у русской и башкирской популяций.: автореф дис. ... канд. биол. наук: 14.00.36 Челябинск., 2009. 23 с. [Stashkevich D. S. Alleles and genotypes of genes of the main cytokines and their intergenic and intragenic relationships in association with rheumatoid arthritis in Russian and Bashkir populations. ... cand. Biol. Sciences: 14.00.36 Chelyabinsk., 2009. 23 p.].
7. TNF tumor necrosis factor [Homo sapiens (human)] [Electronic resource] / 11-Apr-2018. (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124>).
9. SNPStats: Your web tool for SNP analysis [Electronic resource] / Institut Català d'Oncologia, 2016. (URL: <https://www.snpstats.net/start.htm?>).

POLYMORPHISMS OF THE PROMOTE REGION OF THE *TNFA* GENE AND THEIR TWO-LOCUS HAPLOTYPES IN PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS RUSSIAN POPULATION OF THE CHELYABINSK REGION

© 2018 D. S. Stashkevich, A. A. Kobelyatskaya, A. L. Burmistrova

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

Received: 04.05.2018. Accepted: 18.06.2018

The results of the study on the distribution of frequency of occurrence of allelic variants, genotypes and haplotypes of polymorphisms of the gene *TNFA-1031T/C*, *-863C/A*, *-308G/A*, *-238G/A* in patients with nonspecific ulcerative colitis of the Russian population of the Chelyabinsk region are presented. Genotyping of the *TNFA* promoter region was carried out by polymorphism of restriction fragment lengths followed by detection by horizontal electrophoresis in 3% agarose gel. In the group of patients with UC, an increase in the frequency of occurrence of the *TNFA-238*A* allele, the heterozygous genotype of *TNFA-238GA*, the homozygous genotype from the ancestral allele *-863CC*, the two-locus haplotypes *TNFA-863*C-TNFA-238*A*, *TNFA-308*G-TNFA-238*A*, *TNFA-238*A-TNFA-1031*C* was found. In the group of patients carriers of heterozygous genotype *TNFA-863C/A*, homozygous genotype *TNFA-238GG*, two-locus haplotypes *TNFA-308*G-TNFA-238*G*, *TNFA-238*G-TNFA-1031*C* were less common. Inherited models for the following polymorphic sites of the *TNFA* gene have been identified: a superdominant model is characteristic of *TNFA-863C/A*, and codominant – for *TNFA-238G/A*. The obtained data indicate that polymorphism *-238G/A TNFA* is significant for the for development of predisposition to ulcerative colitis.

Key words: genetic polymorphism, tumor necrosis factor alpha, ulcerative colitis

Authors:

Stashkevich D. S., ☒ candidate of biological sciences, docent of microbiology, immunology and general biology department of biological faculty of Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia;

Chelyabinsk, Chelyabinsk State University. Phone: +79080693872; **E-mail:** stashkevich_dary@mail.ru;

Kobelyatskaya A. A., graduate student of microbiology, immunology and general biology department of biological faculty of Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia;

Burmistrova A. L., doctor of medical sciences, professor, dean of biological faculty of Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia.