

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА У ЖИТЕЛЕЙ ОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Пасечник О.А.¹, Вильмс Е.А.¹, Пиценко Н.Д.¹, Блох А.И.¹

¹ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет Минздрава России», Омск, Россия, e-mail: opasechnik@mail.ru

Гены про- и противовоспалительных цитокинов играют важную роль в клиническом течении и исходе различных социально значимых заболеваний. Была изучена распространенность полиморфизмов генов фактора некроза опухоли альфа, интерлейкинов 2, 4, 10 у жителей Омской области. Полиморфизмы генов исследованы методом single nucleotide polymorphism (SNP). Генотипирование образцов геномной ДНК проводилось при помощи аллель-специфической полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Частота обнаружения полиморфного варианта rs 1800629 гена TNF-А составила 0,135, rs 2069762 гена IL- 2 – 0,245, rs 2243250 гена IL-4 – 0,155, rs 1800872 гена IL-10 – 0,220. Распространенность мутантных аллелей гена TNF-А у обследованных мужчин была выше, чем у женщин. В данной статье представлены результаты собственных исследований в сравнении с литературными данными.

Ключевые слова: полиморфизм генов, цитокины, мультифакториальные заболевания, TNFA, IL-2, IL-4, IL-10

STUDY OF FREQUENCY DISTRIBUTION OF IMMUNE RESPONSE GENES POLYMORPHISMS AMONG THE POPULATION OF OMSK REGION

Pasechnik O.A.¹, Vilms E.A.¹, Pitsenko N.D.¹, Blokh A.I.¹

State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Training «Omsk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, opasechnik@mail.ru

The genes of pro- and anti-inflammatory cytokines have an important role in the clinical course and outcomes of various socially significant diseases. We studied the frequency distribution of polymorphisms of tumor necrosis factor alpha, interleukin 2, 4, 10 among residents of the Omsk region. Polymorphisms of genes were studied with single nucleotide polymorphism (SNP). Genotyping of genomic DNA samples was performed using allele-specific polymerase chain reaction in real time. The frequency of polymorphic variant rs 1800629 of gene TNF-A was 0.135, rs 2069762 of gene IL- 2 – 0,245, rs2243250 of gene IL-4 – 0,155, rs1800872 of gene IL-10 – 0,220. We found more frequent occurrence of the studied polymorphism of TNF-A in the male population of Omsk region. The results of the research were compared with literature data.

Keywords: gene polymorphisms, cytokines, multifactorial disease, TNFA, IL-2, IL-4, IL-10

Актуальной задачей современной профилактической медицины является использование достижений молекулярной биологии и генетики для оценки риска развития и предупреждения массовых социально значимых заболеваний [2].

К генам, контролирующим тип иммунного ответа, резистентность или чувствительность к инфекции, предрасположенность к разным формам течения инфекционных заболеваний и их осложнений, относят в первую очередь гены цитокинов [8]. Отдельные аллельные варианты генов могут быть ассоциированы с уровнем продукции соответствующего белкового продукта, что непосредственно оказывает влияние на характер течения и исход заболевания [9].

Омская область на протяжении ряда лет характеризовалась значительной распространенностью таких актуальных социально значимых заболеваний, как ВИЧ-

инфекция, туберкулез, вирусный гепатит С, онкологические заболевания, в клиническом течении и исходе которых важную роль играют гены цитокинов [6, 10].

Цель исследования

Оценка распространенности аллельных вариантов и генотипов промоторных регионов генов иммунного ответа IL 2, IL4, IL10, TNF A у взрослого населения Омской области.

Материалы и методы

Контингент обследованных лиц включал 100 неродственных жителей г. Омска и Омской области европейского происхождения (75 мужчин и 25 женщин) в возрасте от 19 до 60 лет, средний возраст обследуемых составил $37,5 \pm 2,3$ лет. От всех участников было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с требованиями Локального этического комитета ГБОУ ВПО ОмГМУ от 30.01.2015 г. № 66.

Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови проводилось с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» в соответствии с инструкцией производителя (НПФ «Литех, Россия).

Полиморфизмы генов исследованы методом SNP (single nucleotide polymorphism) с использованием комплекта реагентов для выявления мутаций (полиморфизмов) в геноме человека тест-системы «SNP – экспресс» (НПФ «Литех», Россия).

Исследовано четыре полиморфных варианта промоторных регионов генов цитокинов – интерлейкина 2 – IL-2 -330 T > G, интерлейкина 4 — IL4 -590C>T, интерлейкина 10 – IL 10 —592C> A, фактора некроза опухоли альфа TNF-A- 308G>A (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика полиморфных вариантов изучаемых генов

Ген	Кодируемый цитокин	Полиморфный локус	dbSNP_rs*	генотип
TNFA	Фактор некроза опухоли альфа	-308G>A	rs 1800629	GG, GA, AA
IL 2	Интерлейкин 2	- 330T> G	rs 2069762	TT, TG, GG
IL 4	Интерлейкин 4	-590C>T	rs 2243250	CC, CT, TT
IL 10	Интерлейкин 10	-592C> A	rs 1800872	CC , CA, AA

* Идентификационный номер SNP в международной базе NCBI dbSNP [12]

Генотипирование образцов геномной ДНК проводилось при помощи аллель-специфической полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на амплификаторе «iQ5» (BioRad, США) на базе ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора».

Частота отдельных генотипов определялась как отношение индивидов, несущих генотип, к общему числу обследованных в группе по формуле: $f = n/N$, где n – количество раз встречаемости генотипа, N – численность обследованных.

Частоты генотипов по исследованным локусам были проверены на соответствие равновесию Харди—Вайнберга при помощи точного теста Фишера (pHWE). Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft), MS Excel (Microsoft). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости p принимался равным или меньше 0,05.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования была определена распространенность аллелей и генотипов генов цитокинов (табл. 2)

Таблица 2

Характеристика распределения генотипов анализируемых генов иммунного ответа в исследуемой популяционной группе

Полиморфизм	Аллели		Генотипы		Гетерозиготность		pHWE
	вариант	частота аллеля	вариант	частота генотипа	наблюдаемая	ожидаемая	
TNFA -308G>A	G	0,685	GG	0,730	0,270	0,236	0,139
	A	0,135	GA	0,270			
IL 2 - 330 G > T	G	0,755	GG	0,630	0,250	0,369	0,001*
	T	0,245	GT	0,250			
IL 4 -590T>C	C	0,845	CC	0,700	0,290	0,262	0,349
	T	0,155	CT	0,290			
IL10 - 592C> A	C	0,780	CC	0,600	0,360	0,343	0,667
	A	0,220	CA	0,360			
			AA	0,040			

*отклонения от равновесия Харди—Вайнберга

Фактор некроза опухоли альфа TNF-A – белок, синтезируемый активированными макрофагами, участвует в противовирусном, противоопухолевом и трансплантационном иммунитете. Полиморфизм гена TNF-A -308G>A включает в себя замену гуанина (G) на аденин (A) и связан с увеличением уровней экспрессии TNF-A. В патогенезе ВИЧ-инфекции TNF-A играет отрицательную роль, так как способствует дальнейшему инфицированию иммунокомпетентных клеток, а также вирусной репликации. Фактор некроза опухоли альфа индуцирует гибель неинфицированных Т-лимфоцитов CD4+ и CD8+ по механизму апоптоза, что обеспечивает прогрессирование иммунодефицита [3]. TNF-A- 308 GA полиморфизм связан с повышенным риском гепатоцеллюлярной карциномы (как неблагоприятного исхода хронического вирусного гепатита В и С), которая занимает в мире третье место среди причин смерти от онкологических заболеваний [12].

Частота аллеля А гена TNFA у обследованных лиц Омской области составила 0,135 (табл. 2).

Полиморфизмы гена IL2, связанного с продукцией интерлейкина 2, используют в качестве маркера неблагоприятных исходов инфекционных и онкологических заболеваний. Интерлейкин 2 – белок, кодируемый геном IL2, который играет центральную роль в регуляции клеточного иммунитета. IL-2 участвует в усилении пролиферации активированных В-клеток в присутствии IL-4, является фактором роста для всех популяций Th-лимфоцитов, которые принимают активное участие в противоопухолевом, противовирусном и антибактериальных ответах [4]. Установлена связь между полиморфизмом гена IL2- 330 G > T и клиническим исходом заболевания вирусными гепатитами В и С. Генотип IL2-330 TT ассоциирован с повышенным риском хронизации вирусных гепатитов В и С, более тяжелым течением и частым развитием цирроза, тогда как генотип IL2-330 GG ассоциирован с наиболее благоприятными исходами заболевания [16]. Наличие одного или двух G 330 аллелей IL2 в 1,4 раза повышало риск развития рака молочной железы в китайской популяции [14], тогда как в популяции европеоидов достоверно повышена частота T 330 аллеля IL-2, ассоциированная с раком молочной железы, тела и шейки матки с метастазированием в регионарные лимфатические узлы [1].

У обследованных лиц в Омской области частота аллеля G составила 0,245.

Интерлейкин 4, кодируемый геном IL-4, является одним из основных цитокинов, секретируемых Th2 клетками, подавляет продукцию цитокинов воспаления (TNFA, IL-1, IL-8, IL-2, INF γ). При варианте -590 T уровень продукции интерлейкина 4 повышен, что, в частности, приводит к угнетению клеточного иммунитета и повышению уровня IgE.

T-аллель 590 IL-4 регулирует экспрессию корецепторов CCR5 и CXCR4, используемых вирусом иммунодефицита человека для проникновения в клетку человека, снижает уровень CCR5 и повышает уровень CXCR4 на поверхности CD 4+ клеток, редуцирует репликацию штаммов R5 и усиливает репликацию штаммов X4. Мутантный аллель IL-4-590T, который чаще встречается у ВИЧ-негативных лиц, имеет протективный эффект при передаче инфекции при гетеросексуальном контакте и замедляет прогрессирование ВИЧ-инфекции [17]. Распространенность мутантного аллеля T гена IL-4-590 в исследуемой группе составила 0,155.

Интерлейкин 10 играет основную роль в регуляции воспалительного и иммунного ответов, являясь продуктом Th2 клеток. IL-10 ингибирует синтез ряда цитокинов, продуцируемых Th1, таких как INF γ , IL-2, TNFA. Мутантный аллель А гена IL-10 -592 ассоциирован с уменьшением продукции IL-10, с усилением репликации ВИЧ и значительным ускорением прогрессирования ВИЧ-инфекции [5]. Аллель А IL-10- 592C> А

может быть фактором риска туберкулеза у европейцев [15, 18]. В исследуемой популяции европеоидов Омской области частота встречаемости С аллеля IL-10 составила 0,780, А аллеля – 0,220.

Анализ гендерного распределения частот встречаемости мутантных аллелей генов цитокинов в данном исследовании показал наличие статистически значимых различий полиморфизма гена TNFA. Полиморфный вариант rs 1800629 гена TNFA среди мужчин встречался чаще, чем среди женщин: $16,0 \pm 5,6$ % и $6,0 \pm 3,6$ % соответственно ($p=0,04$; рис. 1).

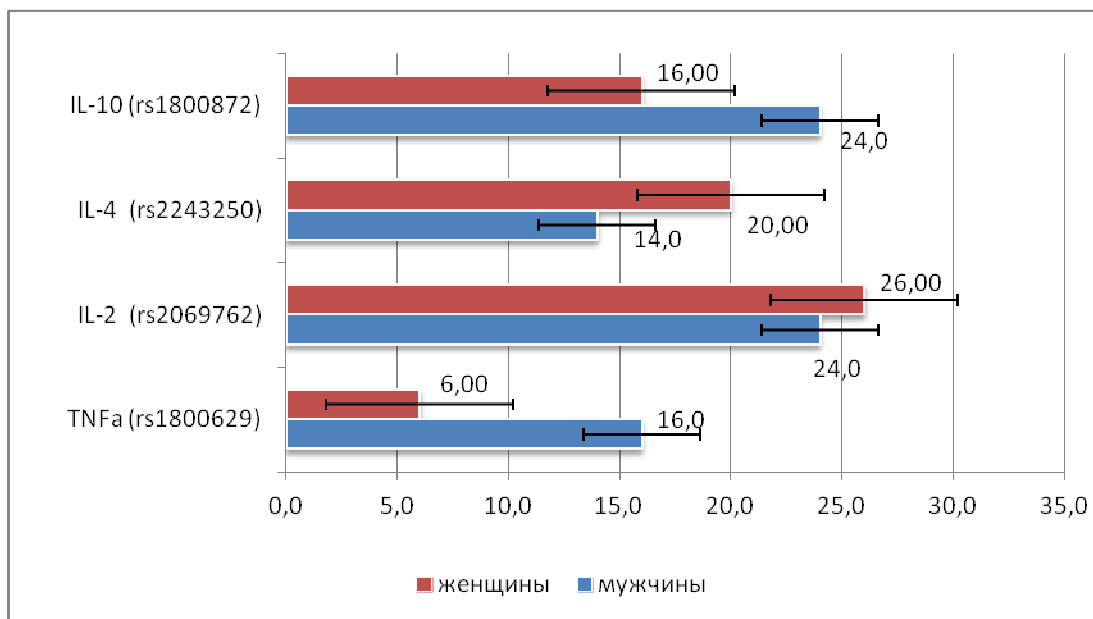


Рис. 1. Распространенность мутантных аллелей изучаемых генов у мужчин и женщин, участвовавших в исследовании (на 100 обследованных)

SNP полиморфизмы одних и тех же генов у разных этнических групп могут быть как протективными, так и ассоциированными с заболеваниями, что важно учитывать при региональном изучении распространенности аллельных вариантов, их ассоциированности с риском заболеваний [7].

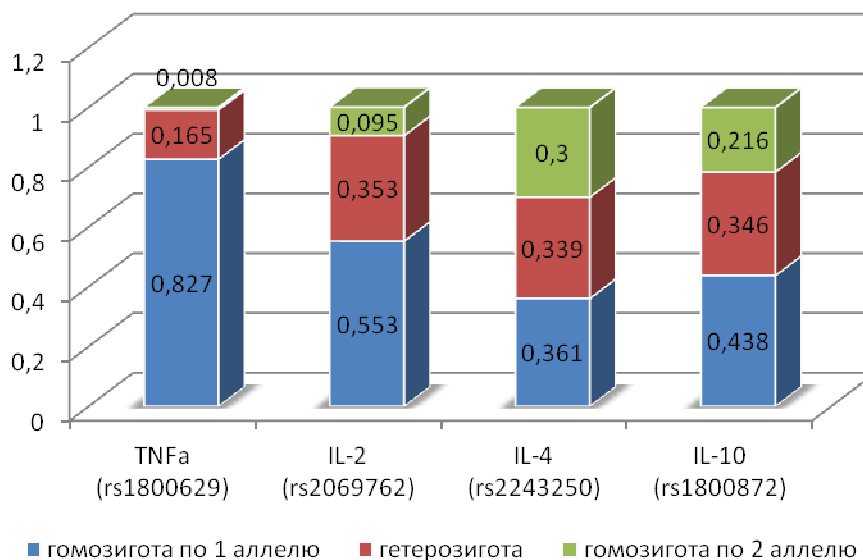


Рис. 2. Распределение частот генов иммунного ответа в мировой популяции (международная база данных Ensembl, <http://www.ensembl.org/>, 2015 г.)

На рисунке 2 представлены частоты встречаемости генотипов генов иммунного ответа в мировой популяции по данным международной базы данных Ensembl (проект «1000 Genomes» [11]).

При сопоставлении частотного распределения SNP генов изучаемых цитокинов у жителей Омской области и среднемировых соотношений аллелей в популяциях мира выявлены статистически значимые различия частот полиморфных вариантов rs 1800629 гена TNFA (0,135 и 0,09; $p=0,01$), rs 2243250 гена IL-4 (0,155 и 0,470; $p=0,000$), rs 1800872 гена IL-10 (0,220 и 0,435; $p=0,000$).

Выводы

В данном исследовании нами была определена распространенность полиморфизмов генов иммунного ответа – про- и противовоспалительных цитокинов, которая составила для полиморфного варианта rs 1800629 гена TNF-A — 0,135, для rs 2069762 гена IL- 2 — 0,245, для rs 2243250 гена IL-4 – 0,155, rs1800872 гена IL-10 – 0,220. Полученные данные представляют интерес для дальнейшего изучения ассоциации полиморфизмов генов цитокинов с различными вариантами клинического течения и исходов актуальных социально значимых мультифакториальных заболеваний.

Работа выполнена при поддержке внутривузовского гранта (ВГ-21-2014) ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Список литературы

1. Анохина Е.Н., Тугуз А.Р., Руденко К.А. Ассоциация полиморфизмов генов IL-4, IL-2 со злокачественными новообразованиями женских репродуктивных органов // Вестник Адыгейского Государственного Университета. Серия естественно-математических и технических наук. – 2014. – № 1 (133). – С. 51–55.
2. Вильмс Е.А., Долгих Т.И., Турчанинов Д.В. Распространенность полиморфизмов генов, ассоциированных с социально значимыми мультифакториальными заболеваниями, у населения Омска // Медицинский альманах. — 2012. — № 3(22). — С. 169–172.
3. Дунаев П.Д., Бойчук С.В., Мустафин И.Г. Свойства и роль фактора некроза опухолей альфа в патогенезе ВИЧ-инфекции// Казанский медицинский журнал. — 2012. — Т. 93, № 2. — С. 290–293.
4. Кишкун А.А. Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике. — М.: ООО «МИА», 2009. — 712 с.
5. Коненков В.И., Смольникова М.В. Структурные основы и функциональная значимость аллельного полиморфизма генов цитокинов человека и их рецепторов // Медицинская иммунология. — 2003. — Т. 5, № 1-2. С. 11–28.
6. Пасечник О.А., Руднева С.Н., Татаринцева М.П., Шахова Т.А. Динамика заболеваемости и факторы риска развития ВИЧ-ассоциированного туберкулеза в Омской области // Здравоохранение Российской Федерации. — 2015. — Т. 59. — № 2. — С. 29–32.
7. Руденко К.А. Полиморфизмы генов основных провоспалительных цитокинов IL-17A, TNF-A, IL-6, ассоциированные с риском развития бронхиальной астмы в мировых популяциях и у жителей Республики Адыгея // Вестник Адыгейского государственного университета. Серия 4: Естественно-математические и технические науки. — 2013. — № 3 (122). — С. 54–61.
8. Цыган В.Н., Иванов А.М., Камилова Т.А., Никитин В.Ю., Протасов О.В., Артюшкин С.А. Генетический полиморфизм цитокинов // Вестник Российской военно-медицинской академии. — 2010. — № 2 (30). — С. 211–219.
9. Шевченко А.В. Иммуногенетический анализ полиморфизма генов цитокинов, матричных металлопротеиназ и фактора роста эндотелия сосудов при ряде мультифакториальных заболеваний: Автореф. дис. доктора биол. наук. — Новосибирск, 2015. — 41 с.
10. Ширлина Н.Г., Стасенко В.Л., Долгих Т.И. Спектр полиморфизмов гена BRCA1 и гена BRCA2 у женского населения г. Омска// Медицинский альманах. — 2012. — № 3. — С. 172–175.

11. Altshuler D.M., Gibbs R. A., Peltonen L. et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations // Nature. 2010. URL: <http://www.nature.com/nature/journal/v467/n7311/abs/nature09298.html>.
12. International NCBI dbSNP database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
13. Feng H., Kuai J.H., Zhang M.Y., Wang G.C., Shi Y.J., Zhang J.Y. Tumor necrosis factor-alpha gene -308G > A polymorphism alters the risk of hepatocellular carcinoma in a Han Chinese population// Diagn Pathol. 2014. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4282739/>.
14. Gao Q.J., Liu D.W., Zhang S.Y., Wu L.H., Jia M. Relations between IL-2-330 polymorphisms and the outcome of hepatitis B and/or hepatitis C virus infection// Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2010. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21162873>.
15. Gao X., Chen J., Tong Z., et al. Interleukin-10 promoter gene polymorphisms and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis// PLoS One. 2015. 1;10(6):e0127496.
16. Hu X.B., Ouyang L.Z., Tang LL. Interleukin-2 gene polymorphisms and prognosis of breast cancer// Genet Test Mol Biomarkers. 2013. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23477313>.
17. Marmor M. et al. Resistance to HIV infection// J.Urban.Health. — 2006. — Vol. 83, № 1. — P. 5–17.
18. Sivangala R., Ponnana M., Thada S. et al. Association of Cytokine Gene Polymorphisms in Patients with Tuberculosis and Their Household Contacts// Scandinavian Journal of Immunology. 2014. Vol. 79. № 3, p. 197–205.

Рецензенты:

Чеснокова М.Г., д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО ОмГМУ Минздрава России, г. Омск;

Аксютин Л.П., д.м.н., врач-методист КУЗОО «Специализированная детская туберкулезная клиническая больница», г. Омск.