

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ IL-1b, IL-6, TNFA У БОЛЬНЫХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Сташкевич Д.С., Бурмистрова А.Л., Кобеляцкая А.А.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, e-mail: stashkevich_dary@mail.ru

Был проведен сравнительный анализ распределения частот аллелей, генотипов и комбинаций генотипов генов основных провоспалительных цитокинов IL-1b, IL-6, TNFA у больных неспецифическим язвенным колитом (НЯК) и здоровых лиц русской популяции Челябинской области. Установлено снижение частоты аллеля с заменой +3953*Т IL-1β у больных НЯК. В доминантной модели наследования аллель дикого типа +3953*С IL-1β в гомозиготной форме чаще встречается у больных НЯК, и вероятно может влиять на предрасположенность к данной патологии. Показаны маркерные комбинации генотипов для неспецифического язвенного колита: IL-1β +3953СС- IL-6 -174 GG, TNFA -308 GG - IL-6 -174 СС. Выявлено снижение носительства комбинации генотипов IL-1β +3953 TC - IL-6 -174 СС у больных НЯК.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, провоспалительные цитокины, неспецифический язвенный колит.

POLYMORPHISM OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IL-1B, IL-6, TNFA GENES IN PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS IN RUSSIAN POPULATION OF CHELYABINSK REGION

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

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, e-mail: stashkevich_dary@mail.ru

The comparative analysis of frequency distribution alleles, genotypes and genotype combinations of genes key pro-inflammatory cytokines IL-1b, IL-6, TNFA was conducted in patients with ulcerative colitis (UC) and healthy subjects Russian population of the Chelyabinsk region. A reduction of + 3953 *Т IL-1β rare allele frequency in patients with ulcerative colitis was found out. The dominant pattern of inheritance of the wild-type allele + 3953 *С IL-1β in a homozygous form was more common in patients with ulcerative colitis, and can probably influence to the predisposition to this disease. The marker combination of genotypes for ulcerative colitis: IL-1β + 3953СС- IL-6 -174 GG, TNFA -308 GG - IL-6 -174 СС were shown. A reduction in carrier combination of genotypes of IL-1β +3953 TC - IL-6 -174 СС in patients with ulcerative colitis was found out.

Keywords: genetic polymorphism, proinflammatory cytokines, ulcerative colitis.

Несмотря на то, что неспецифический язвенный колит (НЯК) известен более 150 лет, на данный момент нет точной информации относительно его этиологии и патогенеза. Считают, что возможно в основе патологии лежит процесс дискриминации иммунного гомеостаза в толстой кишке – микробиота /эпителиально-иммунно-нервная единица. Значительным звеном в развитии НЯК считают наследственную предрасположенность. Согласно литературным данным, у пациентов с неспецифическим язвенным колитом нарушается баланс между про- и противовоспалительными цитокинами. Дисрегуляция иммунных реакций вызывает чрезмерный синтез и активацию провоспалительных цитокинов, что отражается в повышении концентрации провоспалительных цитокинов, таких как IL-1b, TNFA в слизистой кишечника [7, 8].

Кроме того, по данным Nanaola T. и Yoshimura A., в биоптатах слизистой оболочки толстой кишки у больных НЯК установлено повышение уровня IL-6, коррелирующее со

степенью активности воспаления и содержанием острофазовых белков. Согласно данным последних лет, различия в генах, контролирующих защитные реакции организма, могут влиять на уровень продукции кодируемых белков и, тем самым, на характер протекания иммунного ответа. В связи с этим функциональный полиморфизм генов цитокинов представляет значительный интерес, т. к. именно эти белки вносят наибольший вклад в регуляцию иммунитета [2].

При отсутствии главного причинного гена, исследование наследственных основ сводится к установлению комплекса генов, обуславливающих подверженность к сложнаследуемому заболеванию, в частности к неспецифическому язвенному колиту. Составной частью подобного рода молекулярно-генетических исследований является анализ ассоциаций заболевания с полиморфными вариантами генов-кандидатов, белковые продукты которых, предположительно, могут быть вовлечены в патогенез заболевания.

Цель: сравнительный анализ распределения частот встречаемости аллельных вариантов, генотипов и комбинаций генотипов полиморфизмов генов IL-1 β +3953C/T, IL-6-174G/C, TNF- α -308G/A у больных неспецифическим язвенным колитом и здоровых лиц русской популяции Челябинской области.

Задачи:

1. Установить частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфизмов генов IL-1 β +3953C/T, IL-6-174G/C, TNFA -308G/A у больных неспецифическим язвенным колитом в сравнении с практически-здоровыми лицами русской популяции Челябинской области.
2. Оценить вклад взаимодействий межгенных комбинаций генотипов генов IL-1 β , IL-6, TNFA в предрасположенность/устойчивость к НЯК.

Материалы и методы

Проведенная работа относится к типу ретроспективных исследований «случай–контроль».

Контингент обследуемых лиц. Выборка больных НЯК состояла из 127 человек русской этнической группы с диагнозом НЯК, которые находились на лечении в гастроэнтерологических отделениях Дорожной клинической больницы МПС на станции Челябинск и ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница».

В качестве контрольной группы (234 человек) использовали популяционную выборку, сформированную случайным образом 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).

Демографическая характеристика обследуемых групп

	Контрольная группа		Больные НЯК	
	234	%	127	%
Мужчин	47	55,3	56	44,1
Женщин	38	44,7	71	55,9
Средний возраст, лет	34,6±0,75		41,9±1,3	

Методы исследования

Эксперимент состоял из следующих этапов:

1. Пробоподготовка – выделение ДНК из цельной крови;
2. ПЦР-амплификация;
3. Детекция – электрофорез и гель-документирование.

В качестве биологического материала для исследования использовалась венозная кровь, взятая в пробирки с 0,5 % раствором калиевой соли этилендиаминтетра уксусной кислоты (ЭДТА). Выделение ДНК проводили с использованием реагентов PROTRANS DNA Box 500. Определение SNPs в полиморфных сайтах +3953C/T, -174G/C и -308G/A генов IL-1 β , IL-6, TNFA проводилось аллель-специфической ПЦР с реактивами ООО НПФ «Литех» г. Москва с последующей УФ-детекцией результатов в 3% агарозном геле.

Характеристика исследуемых генов

Ген IL-1 β содержит 22 экзона, 20 из которых альтернативные (т.е. имеют структурные варианты) и 9 интронов, из которых альтернативных 8 и располагается на второй хромосоме. Исследования последних лет показали, что за измененный характер экспрессии и продукции соответствующих белков ответственны некоторые аллельные ассоциации генов семейства IL-1. Выявлен ряд точечных маркеров гена IL-1 β : -3737, -1469, -999, -511, -31, +3953, +3962, однако наиболее изученными являются два полиморфизма гена IL-1 β : в промоторной части в положении -511 (C-511T) и в 5-м экзоне (C3953T), ассоциированные с измененной экспрессией [3].

Ген IL-6 у человека находится в составе 7 хромосомы на ее коротком плече в участке p15-21 и состоит из 4 экзонов и 5 интронов. В гене IL-6 были обнаружены однонуклеотидные замены, наиболее изучен полиморфный участок промоторной области в точке -174, где происходит замена гуанина на цитозин (-174G/C) [4].

Ген TNFA расположен на 6 хромосоме на ее коротком плече в области p21.3 и содержит 4 экзона. Имеются данные о взаимосвязи полиморфизма гена TNFA с количеством его продукции. Выявлены несколько SNP гена TNFA: -1031T/C, -863C/A и -857C/A, -308G/A

и -238G/A. Наиболее изучены два полиморфных варианта гена TNFA: -238G/A -308G/A, имеющие разнонаправленное влияние на продукцию данного цитокина: в положении -308 замена гуанина на аденин повышает продукцию цитокина TNFA, а в точке -238 напротив снижает [1, 6].

Статистическая обработка

Для расчета достоверности различий по частоте встречаемости аллельных вариантов, генотипов, сочетаний генотипов между группами здоровых русских и больных НЯК использовали следующие критерии: для степеней свободы выше 1 - критерий максимального правдоподобия (G или χ^2_{ML}), который рассчитывался с помощью иерархического логлинейного анализа; для степени свободы 1 - критерий Пирсона (χ^2), применяли χ^2 с поправкой Йетса, точный двусторонний критерий Фишера [5].

Оценка достоверности различий в распределении частот генотипов согласно моделям наследования и соответствие закону Харди-Вайнберга проводились с использованием онлайн приложения SNPStats [9].

Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, незначимыми при $p > 0,10$; для промежуточных значений p ($0,05 \leq p \leq 0,10$) обсуждали тенденцию к различиям.

Результаты исследования

Наблюдаемые в исследовании частоты аллелей и генотипов в выборках больных НЯК и условно-здоровых лиц соответствуют ожидаемым согласно закону Харди-Вайнберга.

На первом этапе анализа было установлено распределение частот встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма генов IL-1 β +3953C/T, IL-6-174G/C, TNFA-308G/A у больных НЯК и контрольной группы русской популяции Челябинской области.

Установлено, что в группе больных снижена частота аллеля с заменой +3953*T (18,89% против 24,78%, на уровне тенденции). Распределение генотипов полиморфизма гена IL-1 β не отличалось между исследуемыми выборками. Наблюдали некоторое повышение гомозиготного генотипа по предковому аллелю, но данные были статистически не достоверны ($\chi^2 = 2,48$ $p = 0,1150$). Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма гена IL-1 β +3953C/T у больных НЯК и контрольной группы

IL-1 β +3953C/T	Больные НЯК		Контроль		достоверность χ^2
	количество	%	количество	%	
аллели	254		468		
T	48	18,89	116	24,78	3,25 $p = 0,07$

С	206	81,10	352	75,21	
Генотипы	127		234		
ТТ	4	3,14	15	6,41	p= 0,22
СТ	40	31,49	86	36,75	1,00 p= 0,32
СС	83	65,35	133	56,83	2,48 p= 0,12

Согласно анализу моделей наследования предковый генотип С/С ассоциирован с предрасположенностью к НЯК у русских Челябинской области на уровне тенденции. Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

Ассоциация полиморфизма +3953 IL-1 β +3953С/Т с предрасположенностью к НЯК

Модель наследования	Распределение генотипов IL-1 β +3953С/Т согласно моделям наследования	Уровень значимости
Доминантная	С/С Т/Т-С/Т	P=0.091
Рецессивная	Т/Т С/С – С/Т	P=0.22
Кодоминантная	Т/Т С/Т С/С	P=0.18
Сверхдоминантная	С/Т Т/Т - С/С	P=0.24

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма - 174G/C гена IL-6 характеризовалось незначительными колебаниями частот аллелей (p=0,18) и некоторым повышением носительства гомозиготного генотипа по аллелю с заменой у больных НЯК (26,77% против 19,13% p=0,16), однако данные не достигали статистической значимости (данные не приводятся). Анализ ассоциации полиморфизма IL-6 -174G/C с предрасположенностью к НЯК при различных моделях наследования также показал отсутствие статистической значимости.

Таблица 4

Ассоциация полиморфизма IL-6 -174G/C с предрасположенностью к НЯК

Модель наследования	Распределение генотипов IL-6 -174G/C согласно моделям наследования	Уровень значимости
Доминантная	G/G С/С-G/C	p=0.77
Рецессивная	С/С G/G– G/C	p=0.26
Кодоминантная	С/С G/C G/G	p=0.54

Сверхдоминантная	G/C C/C - G/G	p=0.49
------------------	------------------	--------

Распределение частот встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма гена TNFA не отличалось между больными НЯК и контрольной группой и не влияет на формирование предрасположенности к НЯК при любой модели наследования (данные не приводятся).

На следующем этапе исследования согласно второй задаче был проведен анализ межгенных взаимодействий в виде комбинаций генотипов с использованием иерархического логлинейного анализа. В ходе которого были составлены комбинации генотипов исследуемых полиморфизмов +3953C/T, -174G/C и -308G/A генов IL-1 β , IL-6, TNFA.

Статистически значимым оказалось трехфакторное взаимодействие между генотипами

IL-1 β и IL-6 и их ассоциацией с предрасположенностью к НЯК (G=9,0114, 4 степени свободы, p=0,06, тенденция). В связи с чем, проанализирована значимость каждой комбинации генотипов IL-1 β и IL-6.

Группа больных НЯК характеризовалась следующими особенностями:

1. Сниженная частота комбинации C/T (IL-1b) - G/G (IL-6), несущий гетерозиготный генотип IL-1 β (TC), ассоциированный с повышением содержания IL-1b, и гомозиготный по предковому аллелю генотип IL-6 (GG) (7,2% против 15,18 % , p=0,0962, на уровне тенденции);
2. Повышенная частота комбинации CC (IL-1b) - G/G (IL-6) (18,4% против 8,86% $\chi^2=2,79$, p=0,0947, на уровне тенденции), содержащей гомозиготные по предковым аллелям генотипы, ассоциированные со средним уровнем продукции цитокинов согласно литературным данным.

Трехфакторное взаимодействие между генотипами TNFA и IL-6 а также их ассоциацией с предрасположенностью к НЯК оказалось на границе значимости(G=7,3841, 4 степени свободы, p=0,11), что позволило установить, что у больных НЯК повышена комбинация генотипов TNFA-308G/G - IL-6 -174C/C, содержащая генотип со средним уровнем продукции TNFA и генотип снижающий продукцию IL-6 (20% против 10,12 % , p=0,095).

Анализ комбинаций генотипов IL-1 β – TNFA с предрасположенностью/устойчивостью к НЯК показал отсутствие статистической значимости трехфакторного и входящих в него двухфакторных взаимодействий (G=0,9168, 4 степени свободы, p= 0,9, данные не приводятся).

Таким образом, исследуемые полиморфные гены, вероятнее всего, не имеют решающего значения в формировании восприимчивости к неспецифическому язвенному

колиту у русских Челябинской области. Следует отметить, что все значимые комбинации несут генотипы гена IL-6 у больных увеличивается частота комбинаций генотипов ассоциированных со средним и низким уровнем продукции и снижается частота комбинаций с высокопродуктивным аллелем +3953*Т гена IL-1 β .

По нашему мнению, ведущее значение в реализации предрасположенности/устойчивости отводится IL-6 именно в комбинации генотипов IL-6 и IL-1 β , IL-6 и TNFA, однако этот феномен требуют дальнейшего изучения.

Выводы:

1. Установлено снижение частоты аллеля с заменой +3953*Т IL-1 β у больных НЯК ($\chi^2=3,25$ $p=0,0713$, на уровне тенденции). В доминантной модели наследования аллель дикого типа +3953*С IL-1 β в гомозиготной форме чаще встречается у больных НЯК.
2. Обнаружено: снижение частоты комбинации гетерозиготного генотипа IL-1 β (ТС) и гомозиготного по предковому аллелю генотипа IL-6 (GG) ($p=0,0962$, на уровне тенденции); повышение частоты комбинации гомозиготных по предковым аллелям генотипов IL-1 β (СС) и IL-6 (GG) ($\chi^2=2,79$, $p=0,0947$, на уровне тенденции), повышение частоты комбинации гомозиготного по предковому аллелю генотипа TNFA (GG) и гомозиготного по аллелю с заменой генотипа IL-6 (СС) ($\chi^2=2,79$ $p=0,0949$, на уровне тенденции) у больных НЯК по сравнению с контрольной группой.

Список литературы

1. Барановский А.Ю. Полиморфизм гена TNF- α у пациентов с язвенным колитом / А.Ю. Барановский, Э.А. Кондрашева, А.Г. Харитонов, Ю.А. Насыхова, Т.Э. Иващенко // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования. – 2011. – Т. 3, № 3. – С. 41-45.
2. Громова А.Ю. Полиморфизм генов семейства ИЛ-1 человека/ А. Ю. Громова, А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. - 2005. - № 2. – С. 3- 12.
3. Кетлинский С. А., Симбирцев А.С. Цитокины: монография / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. – СПб. : Фолиант, 2008. – 552 с.
4. Семенова Н.А. Роль полиморфизма гена IL-6-174С/Г в развитии хронической HCV-инфекции / Н. А. Семенова, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий, В. А. Бычков, О. Е. Чечина // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 5. – С. 93-97.
5. 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/ Д.С. Сташкевич. – Челябинск, 2009. – 23 с.

6. Якубовская А.Г. Полиморфизм генов NOD2/CARD15 и TNF- α у больных язвенным колитом Рязанского региона / А. Г. Якубовская, А. А. Низов, В. С. Баранов, Ю. А. Насыхова, Т. Э. Иващенко // Вестник современной клинической медицины. – 2013. – Т. 6, № 4. - С. 17-21.

7. Muro M. Interleukin (IL)-1 Gene Cluster in Inflammatory Bowel Disease: Is IL-1RA Implicated in the Disease Onset and Outcome? M. Muro, A. Mrowiec // Digestive Diseases and Sciences – 2015. – Vol. 60. – P.1126–1128.

8. López-Hernández R. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene single-nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease / R. López-Hernández, M. Valdés, J. A. Campillo et al. // International Journal of Immunogenetics. – 2014, Vol.42. — P.38 – 45.

9. SNPStats your web tool for SNP analysis [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats> (дата обращения: 16.07.16).