

УДК 579.252.5:57.21:578.85/86

*А. К. ХАНСЕИТОВА, В. Г. НИГМАТОВА, Е. Е. АШИРБЕКОВ, Н. А. АЙТХОЖИНА*

## ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПРОМОТОРА ГЕНА *NFκB1A* В СВЯЗИ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ У НАСЕЛЕНИЯ КАЗАХСТАНА

Был изучен инсерционно-делеционный полиморфизм промотора гена *NFκB1A* у пациентов с рассеянным склерозом (РС) и в контрольной группе с помощью PCR-RFLP. Распределение частот аллелей и генотипов оценивалось с использованием теста  $\chi^2$ . Распределение частот аллелей и генотипов в исследованных группах соответствует распределению Харди-Вайнберга. Генотипирование показало минимальные различия между РС пациентами и контролем в казахской этнической группе ( $\chi^2=0,041281$ ).

**Введение.** Рассеянный склероз – мультифакторное заболевание, для которого характерна аутоиммунность, обусловленная определенным сочетанием генетических и внешних компонент. В основе РС лежат аутоиммунные реакции организма, изучение которых при помощи генов-кандидатов дает информацию не только о механизмах РС, но и для ряда других комплексных аутоиммунных заболеваний, таких как диабет, астма, ревматоидный артрит [1]. Изменение иммунного ответа организма, вызванное генетическими и внешними факторами, приводит к возникновению аутоиммунных процессов в отношении миелиновой оболочки аксонов, проявляющихся в гетерогенных формах заболевания, обусловленных генетической составляющей. Наличие полиморфных маркеров у генов-кандидатов является важным инструментом для изучения генетической предрасположенности к РС на популяционном и семейном уровнях. Обнаружено, что полиморфизм некоторых генов может ассоциироваться с предрасположенностью или устойчивостью индивида. В настоящее время изучается более сотни генов-кандидатов, белковые продукты которых играют определенную роль в развитии нейродегенеративных патологий и рассеянного склероза в частности.

*NFκB* – регулятор транскрипции, который активируется различными внутри- и внеклеточными стимулами, такими как цитокины, свободные радикалы, ультрафиолет и бактериальные либо вирусные продукты. Несвоевременная активация *NFκB* связана с множеством воспалительных заболеваний, в том числе и аутоиммунного характера. Соответственно, ингибитор активации *NFκB* явился мишенью нашего исследования для подтверждения возможности его вовлечения в

процесс развития рассеянного склероза, как заболевания, имеющего аутоиммунный характер [2].

**Материалы и методы.** Исследование проводилось на материале, полученном от здоровых доноров и больных РС. В исследование было включено 303 образца крови, из них 210 образцов, отобранных у практически здоровых людей Алматинской популяции без клинических проявлений РС и семейного анамнеза по неврологическим заболеваниям, 93 образца крови больных РС (г. Алматы и г. Астана). Соотношение мужчины-женщины в контрольной выборке и группе больных составляло 1:2. ДНК выделяли из крови по стандартной методике фенольно-хлороформной депротеинизации. Последовательности праймеров к каждому исследуемому участку подбирались при помощи программы Primer-Express, согласно последовательностям, полученным из геномных баз данных ENSEMBL и NCBI [3].

Анализ варибельных участков генов проводили с использованием метода PCR-RFLP. После амплификации и рестрикции *MnI* проводили электрофоретическое разделение продуктов в 8% акриламидном геле. Достоверность различий в частотах встречаемости аллелей оценивали с помощью критерия  $\chi^2$ .

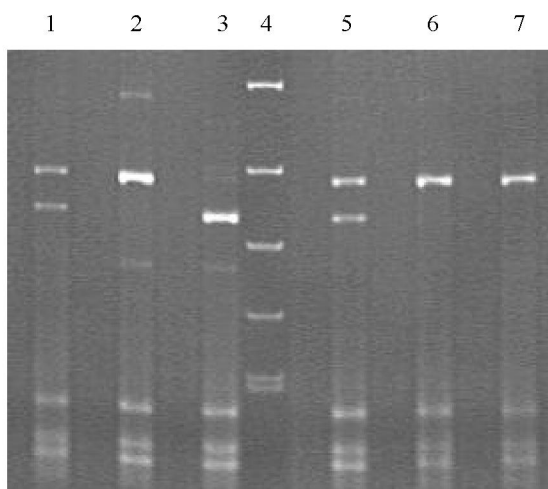
**Результаты и обсуждение.** Как было упомянуто ранее, *NFκB* – это фактор транскрипции, роль которого показана в воспалении и иммунном ответе. Таким образом, ингибитор активации данного фактора также имеет очень важную функциональную роль в развитии аутоиммунных заболеваний.

Соответствующий ген расположен на хромосоме 14q13 и содержит 6 экзонов, общей продолжительностью около 3.5 кб. В данном гене обнаружено множество вариаций: на настоящий момент по данным базы данных NCBI их 56, в

том числе 2 миссенс замены, одна замена, приводящая к сдвигу рамки считывания и 5 синонимичных замен (не приводящих к изменению в аминокислотной последовательности белка). Остальные вариабельные сайты находятся либо в интронах исследуемого гена, либо в нетранслируемых участках [3]. Исследуемый нами сайт (rs11569591), по данным Mitterski B et al. [4], находится в -708 позиции промотора гена NFkBIA.

Чтобы протестировать вовлеченность данного гена в развитие РС, было проведено исследование инсерционно-делеционного полиморфизма промотора данного гена. Поскольку данный регион является промоторным, изменения в его последовательности могут приводить к изменению экспрессии гена. Поиск по базам данных сайтов связывания транскрипционных факторов обнаружил потенциальный сайт связывания для фактора теплового шока в позиции -708 промотора гена NFkBIA. Белки теплового шока поддерживают правильный фолдинг других белков, действуя как шапероны. Они играют важную роль в защите клетки от любых видов стресса, включая тепловой шок, ишемию (недостаток кислорода), воспаление [4].

Нами было проведено исследование распределения аллелей и генотипов данного полиморфизма для определения возможной связи данного полиморфизма с патогенезом рассеянного склероза. На рисунке показана электрофореграмма продуктов амплификации и рестрикции промоторного полиморфизма гена NFkBIA.



Электрофорез продуктов рестрикции амплифицированного фрагмента гена NFkBIA. Дорожки 2, 6, 7 – генотип DD; дорожка 3 – II; дорожки 1, 5 – ID, дорожка 4 – маркер

Критерий  $\chi^2$  использовался для оценки статистической достоверности проведенных исследований и составил 0,041281 для генотипов и 0,030584 для аллелей. Величина  $\chi^2$  как для аллелей, так и для генотипов не превышает критического значения, следовательно, различия, наблюдаемые между частотами аллелей и генотипов, в группе больных рассеянным склерозом и в контрольной группе носят случайный характер.

Как показано в табл. 1, ожидаемые частоты генотипов значительно не отличаются от фактически полученных в результате опыта. Отклонения в частотах носят случайный характер, а распределение частот аллелей и генотипов соответствует распределению Харди-Вайнберга.

Таблица 1. Распределение частот генотипов rs11569591 (инсерция/делеция 8 пп) гена NFkBIA

Частота генотипов	Конт- роль	Больные РС	HWE exp. контроль	HWE exp. больные РС
DD	0,741	0,729	0,714	0,702
ID	0,207	0,219	0,262	0,271
II	0,052	0,052	0,024	0,026
		p=	<b>0,424751881</b>	<b>0,477687463</b>

*Примечание.* Аллель I соответствует наличию инсерции, аллель D – ее отсутствию, HWE exp – соответствие распределению Харди-Вайнберга.

В табл. 2 приведены все доступные на настоящий момент сведения по популяционным различиям в распределении аллелей и генотипов данного полиморфизма. Как можно заметить, распределение аллелей и генотипов в исследованной нами группе отличается как от европейских популяций, так и от африканской группы. Тем не менее, данный полиморфизм является перспективным для исследования, поскольку по данным проекта HarMap расположен в «горячей точке» (hotpoint – точки с высокой вероятностью кроссоверных событий) и не обнаруживает неравновесного сцепления с другими вариабельными сайтами данной хромосомы [5].

Однако при сравнении группы больных РС и контрольной группы не обнаружено статистически значимых различий между частотами аллелей и генотипов, из чего можно сделать вывод об отсутствии связи данного полиморфизма и риска развития рассеянного склероза. Полученные нами данные подтверждаются аналогичными исследованиями данного полиморфизма в

Таблица 2. Распределение частот аллелей и генотипов rs11569591 (инсерция/делеция 8 пн) гена NFκB1A в различных популяциях

	DD	ID	II	D	I	Источник
Казахи	0,741	0,207	0,052	0,838	0,162	Данное иссл.
Немцы	–	–	–	0,716	0,284	Miterski B et al [6]
Африканцы	0,667	0,333	–	0,833	0,167	PGA-UW-FHCRC [5]
Европейцы	0,522	0,391	0,087	0,717	0,283	PGA-UW-FHCRC [5]

группе немецких пациентов, страдающих РС. Учеными Германии не обнаружено связи между данным заболеванием и инсерционным полиморфизмом промоторного региона гена NFκB1A [6]. Тем не менее, по данным других исследований, данный ген показал свою вовлеченность во множество заболеваний, таких как различные виды рака, болезнь Крона, диабет первого и второго типа, а также различные сосудистые нарушения и воспалительные заболевания [6].

Таким образом, роль данного гена в развитии различных патологий несомненна, однако, в качестве предиктивного маркера рассеянного склероза полиморфизм гена NFκB1A использовать как таковой не представляется возможным. Тем не менее, некоторыми исследованиями показано использование данного полиморфизма для диагностики других аутоиммунных заболеваний (болезнь Крона, сахарный диабет первого типа) в комплексе с полиморфными вариантами других генов.

*Авторы статьи выражают благодарность медицинским работникам, оказавшим помощь в сборе материала для исследования, д. м. н. Ж. М. Ермакову и А. С. Кайсарбековой (общественное объединение «Рассеянный склероз», Казахская Государственная Медицинская Академия, кафедра нейрохирургии и неврологии, г. Астана), а также больным РС, давшим свое согласие на участие в исследовании.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Ebers G.C., Sadovnick D.A. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility // J. Neuroimmunol. 1994; 53: 117-122.
2. Gilmore T.D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. Oncogene. 2006. 25 (51): 6680-4.
3. www.ncbi.nlm.nih.gov
4. Miterski B., Bohringer S., Klein W. et al. Inhibitors in the NFkappaB cascade comprise prime candidate genes predisposing to multiple sclerosis, especially in selected combinations // Genes Immun. 2002. 3(4): 211-9.
5. www.hapmap.org
6. Li Q., Verma I.M. NF-kappaB regulation in the immune system // Nat. Rev. Immunol. 2002. 2(10): 725-34.

Резюме

Шашыраңқы склероз ауруымен ауыратын науқастар мен бақылау топтарында NFκB1A гені промоторының инсерция-делециялық полиморфизмі PCR-RFLP әдісі арқылы зерттелді. Аллельдер мен генотиптердің таралу жиілігі с2-әдісі арқылы бағаланды. Зерттеу топтарындағы аллельдер мен генотиптердің таралуы Харди-Вайнберг таралуына сәйкес келді. Генотиптеу қазақ этникалық тобы арасындағы өзгешеліктің аз ғана екенін көрсетті (с2 = 0,041281).

Summary

The insertion-deletion polymorphism of NFκB1A gene promoter in the group of multiple sclerosis (MS) patients in comparison with control group was studied by PCR-RFLP. The alleles and genotypes frequencies distribution was estimated by using χ2-test. The alleles and genotypes frequencies distribution correspond to Hardy-Wainberg equilibrium. The minimal differences between MS patients and controls in Kazakh ethnic group (χ2=0,041281) was shown by genotyping.

*Институт молекулярной биологии и биохимии им М. А. Айтхожина  
МОН РК, г. Алматы*

*Поступила 14.02.08г.*