

УДК 579.252.5:57.21:578.85/86

**А.К. ХАНСЕИТОВА, М.А. МЕНДЕЦ, Т.Н. МИРОШНИК,
В.Г. НИГМАТОВА, Н.А. АЙТХОЖИНА**

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПРОМОТОРА ГЕНА TNF α В СВЯЗИ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ У НАСЕЛЕНИЯ КАЗАХСТАНА

Изучен полиморфизм промотора гена TNF α (tumor necrosis factor α) у пациентов с рассеянным склерозом (РС) и в контрольной группе с помощью PCR-RFLP. Распределение частот аллелей и генотипов оценивалось с использованием теста χ^2 . Распределение частот аллелей и генотипов в исследованных группах соответствует распределению Харди-Вайнберга. Показано отсутствие ассоциации данного полиморфизма с РС в казахской этнической группе и наличие минимальной аллельной ассоциации ($\chi^2=4.617$) в русской этнической группе.

Введение. Фактор некроза опухоли (TNF α) – потенциальный иммуномодулятор и провоспалительный цитокин, вовлеченный в патогенез аутоиммунных и воспалительных заболеваний (1). TNF α обычно сверхпродуцируется при хронических воспалительных/аутоиммунных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит и рассеянный склероз (РС). Ключевая роль TNF в патогенезе воспалительных демиелинизирующих заболеваний центральной нервной системы была подтверждена многими исследованиями РС у людей и при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (EAЕ – experimental autoimmune encephalomyelitis), классической аутоиммунной модели человеческого РС. TNF сверхпродуцируется в сыворотке и цереброспинальной жидкости РС пациентов, а также ассоциирован с астроцитами и макрофагами в области склеротических бляшек мозга. Иммунносупрессивная роль TNF α была предложена в нескольких моделях системных и органоспецифических аутоиммунных заболеваний (2). TNF может индуцировать селективную цитотоксичность у олигодендроцитов *in vitro* и повреждение миелина мозга, а также напрямую вовлечен в процесс демиелинизации. Установлена активность TNF в инициации и протекании местного воспаления, что опосредовано его известным индуктивным эффектом в экспрессии молекул адгезии и активации макрофагов, что может также вносить свою лепту в повреждение ЦНС. При EAЕ анти-TNF обработка полностью предотвращает начало патологии и облегчает протекание установленной болезни. Более того, сходно с органоспецифическим воспалительным фенотипом наблюдаемым у неко-

торых TNF-сверхпродуцирующих трансгенных и мутантных мышей, TNF-сверхэкспрессия в ЦНС у трансгенных мышей показывает потенциал данного цитокина индуцировать воспалительные демиелинизирующие ЦНС заболевания. У этих трансгенных моделей TNF-запускаемая ЦНС демиелинизирующая болезнь характеризуется апоптозом олигодендроцитов, первичной демиелинизацией, инфильтрацией лимфоцитов и макрофагов в ЦНС, приводящих к потере нервных функций (3).

Материалы и методы. Исследование проводилось на материале, полученном от здоровых доноров и больных РС. В исследование было включено 298 образцов крови, из них 202 образца, отобранных у практически здоровых людей Алматинской популяции без клинических проявлений РС и семейного анамнеза по неврологическим заболеваниям, 96 образцов крови больных РС (г.Алматы и г.Астана). ДНК выделяли из крови по стандартной методике фенольно-хлороформной депротеинизации. Использовали последовательности праймеров к исследуемому участку, указанные A.G. Wilson (4).

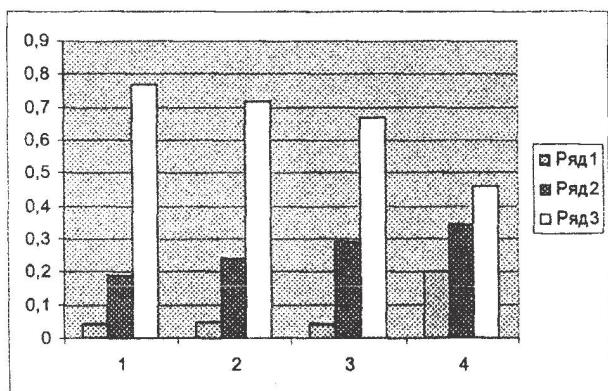
Анализ вариабельных участков генов проводили с использованием метода PCR-RFLP. После амплификации и рестрикции *Nco*I проводили электрофоретическое разделение продуктов в 8% акриламидном геле. Достоверность различий в частотах встречаемости аллелей оценивали с помощью критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение: Ген TNF α расположен на хромосоме 6р21.3 и содержит 4 экзоны, общей продолжительностью около 1.5 кб. В данном гене обнаружено множество вариаций: на

настоящий момент по данным базы данных NCBI их 69, в том числе 5 миссенс замен и 2 синонимичных замены. Остальные вариабельные сайты находятся либо в инtronах исследуемого гена, либо в нетранслируемых участках (5).

Промоторный полиморфизм rs1800629 гена TNF α обуславливает замену G на A в -308 позиции. Данный участок промотора обеспечивает связывание с факторами активации транскрипции и ассоциирован с уровнем экспрессии гена TNF α (3, 6). Носители аллеля A имеют более высокий уровень транскрипционной активности гена, чем носители предкового аллеля G (1). Соответственно, аллель A является рисковым, поскольку повышенный уровень TNF α показан при развитии аутоиммунных и воспалительных заболеваний (2).

Чтобы протестировать вовлеченность данного гена в развитие РС, было проведено исследование -308G/A полиморфизма промотора данного гена. Амплифицируется участок размером 107 пн, после рестрикции образуется два фрагмента 87 пн и 20 пн.

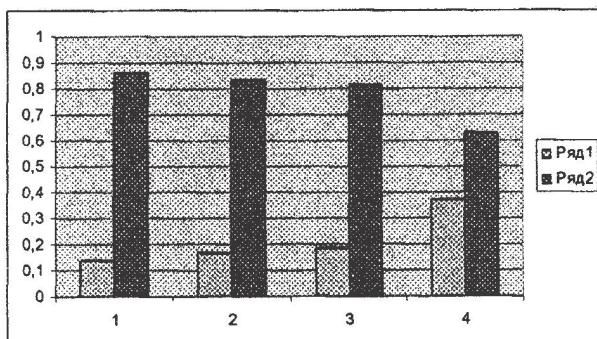


Ряд 1 – AA генотип, ряд 2 – AG генотип, ряд 3 – GG генотип
1 - группа здоровых казахов, 2 - группа больных РС казахов, 3 – группа здоровых русских, 4 – группа больных РС русских

Рисунок 1. Распределение частот генотипов rs18006291 гена TNF α

На рисунке 1 представлено распределение частот генотипов в двух этнических группах больных рассеянным склерозом и соответствующих контрольных группах. Как видно из представленного рисунка, распределение частот генотипов в казахской этнической группе практически не различается между больными РС и контрольной

группой. Данный вывод можно подтвердить тем, что χ^2 по распределению генотипов ($\chi^2=0.093$) не превышает стандартного, т.е. наблюдаемые различия носят исключительно случайный характер. Различия, наблюдаемые в распределении генотипов в русской группе, также не являются статистически достоверными ($\chi^2=1.199$). Тем не менее, при рассмотрении распределения частот аллелей в исследуемых группах (рисунок 2), видно, что частоты аллелей различаются внутри русской этнической группы (частота рискового аллеля A в группе больных РС значительно выше, чем в контрольной группе: $\chi^2=4.617$). Распределение частот генотипов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга (кроме больных РС русской этнической группы).



Ряд 1 – частота аллеля A, ряд 2 – частота аллеля G
1 - группа здоровых казахов, 2 - группа больных РС казахов, 3 – группа здоровых русских, 4 – группа больных РС русских

Рис. 2. Распределение частот аллелей rs18006291 гена TNF α

Таким образом, в работе показано отсутствие связи -308G/A полиморфизма гена TNF α в казахской этнической группе. Тем не менее, русская группа показала явные различия в частотах распределения аллелей и генотипов данного полиморфизма. В частности, различия в частотах распределения аллелей невозможно объяснить статистическими отклонениями, что позволяет констатировать определенную зависимость возникновения РС в русской этнической группе от структуры промотора гена TNF α .

Авторы статьи выражают благодарность, д.м.н Ермекову Ж.М. и Кайсарабековой А.С. (общественное объединение «Рассеянный склероз», Казахская Государственная Медицинская Академия, кафедра нейрохирургии и

неврологии, г. Астана), оказавшим помощь в сборе материала для исследования и в диагностике по критериям Позера и шкале EDSS, а также больным РС, давшим свое согласие на участие в исследовании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wilson A.G., Symons J.A., McDowell T.L. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor β promoter on transcriptional activation. PNAS USA. 1997. 94: 3195-9.
2. Hofman F.M., Hinton D.R., Johnson K. et al. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. J. Exp. Med. 1989. 170(2): 607-12,
3. Akassoglou K., Bauer J., Kassiotis G., et al. Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendroglialopathy. Am. J. Pathol.. 1998. 153(3):801-813.
4. Wilson A.G., di Giovine F.S., Blakemore A.I.F. et al. Single base polymorphism in the human Tumor Necrosis Factor alpha (TNF β) gene detectable by *Nco*I restriction of PCR product. 1(5): 353.
5. www.ncbi.nlm.nih.gov
6. You-peng C., Pfab T., Slovinski T. et al. Impact of genetic

variation of tumor necrosis factor- β on gestational hypertension. Chin. Med. J. 2006. 119(9): 719-24.

Резюме

Шашыранқы склероз (ШС) ауруымен ауыратын науқастар мен бақылау топттарында TNF α (tumor necrosis factor α) гені промоторының полиморфизмі PCR-RFLP әдісі арқылы зерттелді. Аллелдер мен генотиптердің таралу жиілігі χ^2 -тесті арқылы есептелді. Зерттеу топттарындағы аллелдер мен генотиптердің таралуы Харди-Вайнберг таралуына сәйкес болды. Атальмыш полиморфизміндең казақ этникалық тобында ШС байланысы жоқтыры, ал орыс этникалық тобында аздаған аллелдік байланыс ($\chi^2=4.617$) бар екені аныкталды.

Summary

Promoter's polymorphism of TNF α gene 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 χ^2 -test. The alleles and genotypes frequencies distribution correspond to Hardi-Wainberg equilibrium. The minimal allelic association with MS ($\chi^2=4.617$) in Russian ethnic group and the absence of association with MS in Kazakh ethnic group was shown.

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

Алматы

Поступила 15.07.09