

© Ю.В. Останкова¹,
Т.Э. Иващенко¹,
Н.А. Келембет²,
Л.А. Желенина², В.С. Баранов¹

¹ НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта РАМН,

² НИИ пульмонологии
СПб ГМУ им. акад. И.П. Павлова,
Санкт-Петербург

✿ Методом полимеразной цепной реакции и ПДРФ-анализа изучены –238A/G и –308A/G полиморфные варианты гена *TNFA* у детей с atopической бронхиальной астмой (83 человека) и в популяции Санкт-Петербурга (117 человек). Согласно полученным данным, частота аллеля –238A *TNFA* достоверно снижена в группе больных бронхиальной астмой (1,2%) по сравнению с популяционной выборкой (5,6%). При анализе частоты полиморфизма G –308A гена *TNFA* показано достоверное увеличение частоты –308A аллеля в группе больных бронхиальной астмой (9%) по сравнению с популяционной выборкой (4%). Согласно коэффициенту соотношения шансов, риск развития atopической бронхиальной астмы при наличии аллеля A полиморфизма G-308A гена *TNFA* увеличивается более чем в 2 раза (OR = 2,483; CI: 1,059–5,822). Интересно отметить, что среди больных atopической бронхиальной астмой частота аллеля A в положении –308 гена *TNFA* достоверно выше у женщин (14,8%) по сравнению с мужчинами (2,6%, $p = 0,0064$, $df = 1$). Сравняя распределение генотипов по *TNFA* гену в –238 и –308 положениях совместно, выявлены достоверные различия между группой больных бронхиальной астмой и популяционной выборкой. Сочетанный генотип –238A/G + –308G/G по гену *TNFA*, связанный с наиболее низкой экспрессией гена, приводит к значительному уменьшению риска заболевания БА (OR = 0,097).

✿ **Ключевые слова:** генетическая предрасположенность; полиморфизм; ассоциация; ген *TNFA*; мультифакториальные заболевания; астма

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *TNFA* С РАЗВИТИЕМ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

ВВЕДЕНИЕ

Бронхиальная астма (БА) является одним из наиболее распространенных мультифакториальных заболеваний. Эпидемиологические исследования, проведенные в Западной Европе в 1990-е годы, свидетельствуют, что в общей популяции БА встречается более чем в 5%. Исследования, проведенные в России с использованием современных методологических подходов, также свидетельствуют о широкой распространенности этого заболевания. Согласно статистическим данным, в нашей стране бронхиальной астмой болеет около 7 млн человек [1].

Аллергическая бронхиальная астма относится к семейству так называемых atopических болезней, которые включают аллергический ринит (сенная лихорадка) и аллергические дерматиты.

Современная трактовка заболевания исходит из воспалительной теории бронхиальной астмы, согласно которой патогенетической основой этого заболевания является воспалительная реакция вне зависимости от степени ее тяжести. В воспалительном процессе участвуют эозинофилы, тучные клетки, лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, эпителиальные клетки. Результатом воспаления являются патологические изменения в легких, для которых характерны десквамация эпителиальной выстилки бронхов, гипертрофия серозных и бокаловидных клеток. Важная роль в этиопатогенезе бронхиальной астмы отводится наследственной предрасположенности, то есть генетическим факторам [2].

Адекватная оценка риска индивидуальной предрасположенности к бронхиальной астме может быть получена только при наличии достаточно полной информации о патогенетических механизмах заболевания и, прежде всего, о генах, которые их кодируют.

Известно, что цитокины участвуют в механизмах передачи межклеточных сигналов как в норме, так и при патологии. Они обеспечивают сеть коммуникативных сигналов между клетками иммунной системы и клетками других органов и тканей. В отличие от гормонов, поддерживающих гомеостатический баланс, цитокины определяют ответную реакцию на внедрение чужеродных тел, иммунное повреждение, а также воспаление. К цитокинам относятся интерлейкины, фактор некроза опухоли, интерфероны, эйкозаноиды, калликреины-кинины, серотонин, гистамин и другие вещества.

Фактор некроза опухоли (TNF) — клеточный медиатор, продуцируемый макрофагами и лимфоцитами, обладает значительной биологической

Таблица 1

Характеристика обследуемой группы больных атопической бронхиальной астмой

Параметры	N	%
Мальчики	39	46,9
Девочки	44	53,1
Средний возраст манифестации заболевания	6,8 ± 4,2	—
Атопический дерматит	43	51,8
Положительный кожный тест	83	100,0
Тяжесть течения заболевания:		
легкая	21	25,3
средняя	44	53,0
тяжелая	18	21,7

активностью. Кахектин — продукт гена *TNFA*, играет важную роль в регуляции процессов дифференцировки, роста и метаболизма клеток. Кроме того, он выполняет роль медиатора патологических воспалительных процессов при различных заболеваниях [3, 4, 5]. Кахектин, или *TNFA*, также как и интерлейкин-6, инициируют образование свободных радикалов. Увеличение количества свободных радикалов или ослабление ферментных механизмов антиоксидантной защиты, а так же сочетание указанных факторов приводят к развитию оксидативного стресса, вызывая повреждение клеток.

Важнейшее значение *TNFA*, в развитии оксидативного стресса состоит в активации индуцибельной NO-синтетазы (*iNOS*) — энзима, ответственного за синтез оксида азота, играющего важную роль в образовании и трансформации свободных радикалов.

Существуют данные об ассоциации полиморфных аллелей гена *TNFA* с развитием некоторых легочных заболеваний, таких как хроническая обструктивная болезнь легких, атопическая бронхиальная астма, бронхолегочная дисплазия у новорожденных [6, 7, 8, 9, 10].

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей частот аллельного полиморфизма гена *TNFA* у пациентов с атопической бронхиальной астмой и сравнение с таковыми в популяции северо-западного региона России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методом ПЦР/ПДРФ-анализа исследованы частоты аллелей –238А и –308А гена *TNFA* у 83 жителей Санкт-Петербурга с манифестацией атопической бронхиальной астмы до 18 лет (табл. 1), а также у 117 человек, не имеющих хронических заболеваний органов дыхания на момент сбора материала и проживающих на территории Северо-Запада России.

Для амплификации фрагментов гена *TNFA* использованы праймеры, содержащие одну замену основания для создания сайта рестрикции, необходимого для выявления полиморфного варианта гена. *TNFA1*: 5' < ATC TGG AGG AAG CGG TAG TG > 3'; *TNFM1*: 5' < AAT AGG TTT TGA GGG CCA TG > 3' (содержит G в положении –313); *TNFM2*: 5' < AGA AGA CCC CCC TCG GAA CC > 3' (содержит T в положении –240). Праймеры А1 и М1 использовали для амплификации фрагмента с полиморфизмом в положении –308, а праймеры А1 и М2 использовали для амплификации фрагмента с полиморфизмом в положении –238.

Смесь для амплификации, объемом 25 мкл включала 15 нМ каждого праймера, 67 мМ трис-НСl, рН 8,8, 16,6 мМ сульфата аммония, 6,7 мМ MgCl₂, 6,7 мкМ ЭДТА, 10 мМ меркаптоэтанола, 170 мкг BSA, 1,0 мМ каждого dNTP и 1U Tth-ДНК-полимеразы (Бион, Москва).

Амплификации проводили на программируемом термоджеле фирмы ДНК-технология (Москва) при следующих условиях: после денатурации (94 °С, 7 мин.) проводили 12 циклов амплификации в режиме 96 °С — 15 сек; 65 °С — 20 сек; затем 23 цикла в режиме 96 °С — 10 сек; 58 °С — 30 сек, 72 °С — 30 сек и заключительный синтез 72 °С (3 мин). После окончания реакции специфичность амплификации и количество ПЦР-продукта проверяли методом электрофореза в 7%-ом полиакриламидном геле (ПААГ).

Для идентификации аллельных вариантов *TNFA* гена ПЦР-продукты гидролизировали при 37 °С в течение 16 часов эндонуклеазой *Bsp19I* для детекции полиморфизма G-308А и эндонуклеазой *MspI* для детекции полиморфизма G-238А 238А/G [11].

Рестриктию амплифицированных ДНК-фрагментов проводили согласно рекомендации фирмы-изготовителя (Сибэнзим). Полноту гидролиза оценивали по результатам электрофореза в 7,5% ПААГ.

Определение достоверности различий частот аллелей производили с помощью точного двустороннего критерия Фишера по стандартной формуле с учетом поправки Йетса для парных сравнений с контрольной группой, а так же с помощью критерия хи-квadrat (χ^2) по стандартной формуле с учетом поправки Йетса для парных сравнений и поправки Бонферрони для множественных сравнений с контрольной группой [12].

В случае достоверных отличий между сравниваемыми признаками в исследуемых группах, также использовали коэффициент соотношения шансов (*odds ratio* — **OR**). Значение **OR**, применительно к нашим данным, показывает, во сколько раз выше вероятность иметь заболевание, при наличии определенного генотипа [13].

Таблица 2

Частота генотипов и аллелей полиморфизма G-238A и G-308A гена *TNFA* в группе больных бронхиальной астмой (N = 83) и в популяционной выборке (N = 117)

Исследуемые группы	N	Частота генотипов, %			Частота аллелей, %	
		-238A/A	-238A/G	-238G/G	-238A	-238G
Больные с бронхиальной астмой	83	0	2,3	97,6	1,2	98,8
Популяционная выборка	117	0	11,0	89,0	5,6	94,4
Исследуемые группы	N	Частота генотипов, %			Частота аллелей, %	
		-308A/A	-308A/G	-308G/G	-308A	-308G
Больные с бронхиальной астмой	83	3,7	10,8	85,5	9,0	91,0
Популяционная выборка	117	1	6	93	4,0	96,0

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 2 представлены частоты аллелей и генотипов полиморфных вариантов G-238A и G-308A гена *TNFA* в группе больных бронхиальной астмой и в популяционной выборке.

При анализе полиморфного варианта G-238A гена *TNFA* выявлено достоверное уменьшение частоты аллели A у больных бронхиальной астмой (1,2%) по сравнению с популяционной выборкой (5,6%) ($p = 0,0304$, $df = 1$).

При этом генотип A/G у больных с atopической бронхиальной астмой (2,3%) встречался достоверно реже, чем в контрольной группе (11,0%; $p = 0,0274$). Согласно рассчитанному коэффициенту соотношения шансов при наличии генотипа A/G в положении -238 промоторной области гена *TNFA* риск развития atopической бронхиальной астмы уменьшается ($OR = 0,1975$; $CI: 0,0433-0,900$).

Анализ другого полиморфного варианта гена *TNFA* G-308A выявил достоверное увеличение частоты аллели A у больных бронхиальной астмой (9,0%) в сравнении с популяционной выборкой (4,0%) ($p = 0,0346$, $df = 1$). Распределение генотипов по этому полиморфизму у больных бронхиальной астмой достоверно не отличалась от такового в популяционной выборке, хотя частота носительства редкого A аллеля была в два раза выше в группе больных бронхиальной астмой по сравнению с популяционной выборкой.

Следует отметить, что среди больных atopической бронхиальной астмой частота аллели A в положении -308 гена *TNFA* оказалась достоверно выше у девочек (14,8%) по сравнению с таковым у мальчиков с бронхиальной астмой (2,6%, $p = 0,0064$, $df = 1$) (табл. 3) и в 3 раза выше, чем у женщин из популяционной группы (4,3%, $p = 0,0108$, $df = 1$).

Согласно рассчитанному коэффициенту соотношения шансов носительство аллеля A в положении -308 гена *TNFA* почти в 4 раза увеличивает риск развития atopической бронхиальной астмы у лиц женского пола ($OR = 3,848$; $CI: 1,317-11,246$).

При анализе частоты генотипов с учетом двух полиморфных вариантов гена *TNFA* (-238G/A и -308G/A) мы также выявили достоверные различия в распределении сочетанных генотипов между группой больных бронхиальной астмой и популяционной выборкой ($p = 0,0270$, $df = 4$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что многофункциональный цитокин TNFA вовлечен в развитие воспалительного ответа и играет важную роль в генезе воспалительных реакций. TNFA с одной стороны, участвует в регуляции нормальной дифференцировки, роста и метаболизма клеток, а с другой стороны, выступает в качестве медиатора патологических воспалительных процессов при различных заболеваниях человека.

Описаны, по крайней мере, 8 полиморфных вариантов гена *TNFA*. Проявление большинства из них на молекулярном и биохимическом уровнях достаточно хорошо изучено. Так, например, известно, что некоторые полиморфные варианты промоторной области гена *TNFA* влияют на его экспрессию. Показано, что аллель A в положении -308 ассоциирован с повышенной продукцией TNFA [14, 15, 16]. Тогда как для другого полиморфного варианта гена *TNFA* (G-238A), аллель A ассоциирован с понижением продукции TNF [17].

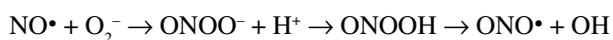
В ходе работы нами было показано достоверное уменьшение как частоты генотипа A/G, так и частоты аллеля -238A, связанного со снижением экспрессии *TNFA* у больных бронхиальной астмой по сравнению с

популяционной выборкой. Согласно рассчитанному коэффициенту соотношения шансов, при наличии генотипа $-238A/G$ гена *TNFA* риск развития атопической бронхиальной астмы уменьшается ($OR = 0,1975$).

При анализе полиморфизма G-308A, ассоциированного с повышением продукции TNFA, показано достоверное увеличение частоты аллеля A в группе больных бронхиальной астмой по сравнению с популяционной выборкой. Риск развития БА у лиц носителей редкой аллеля A в положении -308 промоторной области гена увеличивается в 2,4 раза.

Известно, что провоспалительный цитокин TNFA активирует индуцибельную NO-синтазу — фермент, который появляется в клетках только после индукции бактериальными эндотоксинами и/или некоторыми медиаторами воспаления. Увеличение экспрессии индуцибельной NO-синтазы может обуславливать увеличение продукции NO, проявляющего в повышенных концентрациях цитотоксические свойства [18].

Известно, что NO образует активные промежуточные соединения, такие как нитрозоний (NO^+), нитроксил (NO^-) и пероксинитрит ($ONOO^-$) [19, 20]. При этом наибольшим цитотоксическим эффектом обладает $ONOO^-$, который интенсивно нитрозирует белки и может являться источником токсичного гидроксил-радикала OH в реакции:



Появление свободных радикалов OH \cdot вызывает перекисное окисление липидов и другие явления, входящие в понятие «окислительный стресс». Естественно предполагать, что снижение экспрессии гена *TNFA* при наличии аллели $-238A$, приводит к уменьшению концентрации белка и как следствие этого — к снижению

уровня iNOS. Напротив, наличие аллели $-308A$, как указано выше, ведет к повышению экспрессии гена *TNFA*. Это способствует повышению содержания iNOS, вследствие чего происходит увеличение концентрации свободных радикалов, играющих важную роль в иммуновоспалительных процессах и в развитии оксидативного стресса.

Таким образом, оксидативный стресс может возникать не только при воздействии на организм неблагоприятных факторов внешней среды, но и провоцироваться наличием определенных генетических особенностей, способных активизировать ту или иную биохимическую систему. Можно предположить, что, так же как и в случае несбалансированной работы системы детоксикации и накопления промежуточных электрофильных метаболитов, накопление свободных радикалов за счет повышенной активизации iNOS, может приводить к дегрануляции тучных клеток дыхательных путей, в процессе которой образуется широкий спектр биологически активных веществ. Воздействие повышенных концентраций данных биологически активных веществ на клетки легочного эпителия индуцирует воспалительный процесс в бронхах, приводит к развитию их гиперчувствительности и гиперреактивности.

Рассматривая сочетанное распределение генотипов *TNFA* гена в полиморфных вариантах -238 и -308 , мы выявили достоверные отличия между группой больных бронхиальной астмой и популяционной выборкой. Обращает на себя внимание тот важный факт, что сочетанный генотип $-238A/G + -308G/G$ по гену *TNFA*, связанный с наиболее низкой экспрессией гена, приводит к значительному уменьшению риска заболевания БА ($OR = 0,097$).

Таблица 3

Частота генотипов и аллелей полиморфизма G-238A и G-308A гена *TNFA* среди девочек и мальчиков, больных бронхиальной астмой и в популяционной выборке

Исследуемые группы	Пол	N	Частота генотипов, %			Частота аллелей, %	
			$-238A/A$	$-238A/G$	$-238G/G$	$-238A$	$-238G$
Больные с бронхиальной астмой	Девочки	44	0,0	4,5	95,5	2,3	97,7
	Мальчики	39	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Популяционная выборка	Женщины	58	0,0	12,1	87,9	6,0	94
	Мужчины	57	0,0	10,5	89,5	5,3	94,7
Исследуемые группы	Пол	N	Частота генотипов, %			Частота аллелей, %	
			$-308A/A$	$-308A/G$	$-308G/G$	$-308A$	$-308G$
Больные с бронхиальной астмой	Девочки	44	6,8	15,9	77,3	14,8	85,2
	Мальчики	39	0,0	5,1	94,9	2,6	97
Популяционная выборка	Женщины	58	1,7	5,2	93,1	4,3	95,7
	Мужчины	57	0,0	7,0	93,0	3,5	96,5

Следует подчеркнуть, что у больных бронхиальной астмой частота аллеля А в положении –308 гена *TNFA* у женщин оказалась значительно выше, чем у больных БА мужчин и женщин популяционной выборки. Риск развития БА у женщин, имеющих данный аллель, увеличивается в 3,8 раза. Выявленные нами отличия в распределении частот аллеля А в положении –308 гена *TNFA* у больных БА разного пола достаточно сложно объяснить. Однако следует отметить, что продукция *TNFA* регулируется эстрогенами [21]. Можно предположить, что в женском организме с высокой и циклически изменяющейся концентрацией эстрогенов, колебание и абсолютное содержание *TNFA* в клетках эпителия дыхательного пути будут выражены значительно сильнее, чем у мужчин. Последние и могут быть пусковым механизмом развития тех форм atopической бронхиальной астмы, в основе которых лежат воспалительные реакции легочного эпителия. Это предположение требует серьезных дополнительных исследований.

В настоящее время достаточно сложно однозначно сказать каким образом *TNF* участвует в патогенезе астмы, однако наличие аллели –308А уже сейчас можно рассматривать как фактор генетического риска развития atopической бронхиальной астмы. Напротив, присутствие аллели –238А даже в гетерозиготном состоянии и тем более в компаунде с –308G аллелью гена *TNFA* можно рассматривать как благоприятный протективный признак в отношении заболевания особенно у детей в семьях высокого риска.

Работа выполнялась в лаборатории пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний человека НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН при непосредственном финансировании гранта CRDF «Молекулярно-биологические основы здоровья человека и окружающей среды Северо-Запада России» и гранта Санкт-Петербурга в сфере научной и научно-технической деятельности.

Литература

1. Лешукович Ю.В. Эпидемиология бронхиальной астмы // Библиотека врача общей практики. Бронхиальная астма. Т. 2. — М.: МИА, 1996. — С. 12–16.
2. Пузырев В.П., Степанов В.А. Патологическая анатомия генома человека. — Новосибирск: Наука, 1997. — 223 с.
3. Mooney D.P., Gamelli R.L., O'Reilly M. // Surgical Forum — 1988. — Vol. 39. — P. 77–79.
4. Arzt E. et al. // Life Sci. — 1991. — Vol. 48(26). — P. 2557–2562.
5. Salomon G.D., Kasid A., Cromack D., et al. // Ann. Surg. — 1991. — Vol. 214(2). — P. 175–180.
6. Сеутова Г.Н., Букреева Е.Б., Буйкина С.В. и др. Роль полиморфизма в промоторной области гена *TNF* в развитии хронической обструктивной болезни легких. // Бюлл. сибирской медицины. 2004. — № 2. — С. 29–34.
7. Albuquerque R.V., Hayden C.M., Palmer L.J., et al. // Clin Exp Allergy. — 1998. — May; 28(5). — P. 578–84.

8. Castro J., Telleria J.J., Linares P. et al. // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. — 2000. — May–Jun; 10(3). — P. 149–54.
9. Shin H.D., Park B.L., Kim L.H., et al. // Hum. Mol. Genet. — 2004. — Feb 15; 13(4). — P. 397–403. Epub 2003 Dec 17.
10. Wilson A.G., Symons J.A., McDowell T.L., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA — 1997 — 94 — P. 3195–3199.
11. Kazzi S.N., Kim U.O., Quasney M.W., Buhimschi I. // Pediatrics. — 2004 — Aug; 114(2) — P. e243–8.
12. Day C.P., Grove J., Daly A.K. et al. // Diabetologia — 1998 — 41 — P. 430–434.
13. Гланц С. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
14. Lau J., Ioannidis J.P., Schmid C.H. // Ann. Intern. Med. — 1997. — Vol. 127, N 9. — P. 820–826.
15. Bouma G., Xia B., Crusius J.B., et al. // Clin. Exp. Immunol. — 1996. — 103 — P. 391–396.
16. Louis E., Franchimont D., Piron A., et al. // Clin. Exp. Immunol. — 1998. — 113. — P. 401–406.
17. Huizinga T.W., Westendorp R.G., Bollen E.L., et al. // J. Neuroimmunol. — 1997. — 72. — P. 149–153.
18. Винк Д.А., Водовоз Й., Кук Дж.А., et al. // Биохимия. — 1998. — 63. — P. 948–957.
19. Albina J.E., Reichner J.S. // Cancer Metastasis Rev. — 1998. — Mar; 17(1). — P. 39–53.
20. Estevez A.G., Spear N., Pelluffo H., et al. // Methods in Enzymology. — 1999. — 301. — P. 393–402.
21. Middle F., Jones I., Robertson E. et al. // Psychiatr. Genet. — 2000. — Dec; 10(4). — P. 195–8.

Association of promoter region polymorphism of the *tnf α* gene with the development of atopical bronchial asthma

Ostankova J.V.,¹ Ivashchenko T.E.,¹ Kelembet T.E.,² Jelenina L.A.,² Baranov V.S.¹

¹Ott's Institute of Obstetrics and Gynecology RAMS, ²Institute of Pulmonology; Saint-Petersburg

✳ **SUMMARY:** Atopic bronchial asthma (ABA) is a complex genetic disease characterized by increased airway responsiveness to a variety of stimuli, reversible airway obstruction, and airway inflammation. The genetic polymorphisms –238 A/G and –308 A/G of the *TNFA* gene were studied by PCR–RFLP analysis in the group of asthmatic patients with age of manifestation before 18 years (83) and the population group (117). According to obtained data the frequency of –238A allele of the *TNFA* gene was significantly lower in the group of patients with ABA (1,2%) as compared to the population group (5,6%). The analysis of distribution of the G –308A polymorphism of the *TNFA* gene revealed significant increase of the frequency of –308A allele in the patients with ABA (9,0%) as compared to the population (4,0%). According to odds ratio the carriers of –308A allele of the *TNFA* gene have 2-fold increased risk of the development of ABA (OR = 2,48; CI: 1,06–5,82). The frequency of –308A allele of the *TNFA* gene in the group of patients was significantly higher in women (14,8 %) as compared to men (2,6 %, p = 0,0064, df = 1). After comparing the distribution of genotypes of –238 and –308 polymorphisms of the *TNFA* gene together significant difference between patients with ABA and population was observed. Combined genotype –238A/G + –308G/G of the *TNFA* gene associated with the lowest level of gene expression resulted in considerable decrease of ABA risk (OR = 0,097). Different hypotheses of the role of polymorphic variants of the *TNFA* gene in pathogenesis of ABA were discussed.

✳ **KEY WORDS:** genetic predisposition; polymorphism; association; *TNFA* gene; multifactorial diseases; asthma