

## Анализ ассоциации полиморфизма –308G>А гена *TNF* с риском развития саркоидоза легких у русского населения Республики Карелия

И.Е. МАЛЫШЕВА<sup>1</sup>, Л.В. ТОПЧИЕВА<sup>1</sup>, Э.Л. ТИХОНОВИЧ<sup>2</sup>, О.Ю. БАРЫШЕВА<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра РАН», Петрозаводск, Россия; <sup>2</sup>Республиканская больница им. В.А. Баранова, Петрозаводск, Россия; <sup>3</sup>ФБГУ ВПО «Петрозаводский государственный университет» Минздрава России, Петрозаводск, Россия

### Резюме

**Цель исследования.** Анализ ассоциации полиморфизма –308G>А гена *TNF* с риском развития саркоидоза легких (СЛ) у русского населения Республики Карелия.

**Материалы и методы.** Обследовали 84 больных с персистирующим СЛ и 96 доноров из контрольной группы (без клинических проявлений данного заболевания). С помощью методов полимеразной цепной реакции с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов идентифицировали аллели и генотипы по –308G>А полиморфному маркеру гена *TNF*. Уровень транскриптов указанного гена в лейкоцитах периферической крови здоровых и больных людей определяли методом ПЦР в реальном времени.

**Результаты.** Не выявлено достоверных различий по распределению частот аллелей и генотипов по –308G>А полиморфному маркеру гена *TNF* между контрольной группой и группой больных СЛ. Установлено достоверное повышение количества транскриптов гена *TNF* в лейкоцитах периферической крови у больных СЛ по сравнению с контролем. При этом выраженных различий по уровню экспрессии мРНК указанного гена у носителей разных генотипов по полиморфному маркеру –308G>А гена *TNF* в группах не установлено.

**Заключение.** Полиморфный маркер –308G>А гена *TNF* не ассоциирован с риском развития СЛ у русского населения Республики Карелия. Отсутствие различий по содержанию мРНК гена *TNF* у носителей разных генотипов по указанному маркеру позволяет предположить, что обнаруженный нами повышенный уровень транскриптов указанного гена у пациентов с диагнозом СЛ обусловлен развитием воспалительных реакций в организме при данном заболевании.

**Ключевые слова:** саркоидоз легких, цитокины, ген *TNF*, полиморфизм, экспрессия.

## Analysis of an association of *TNF* –308G>A polymorphism with a risk for pulmonary sarcoidosis in the Russian population of the Republic of Karelia

I.E. MALYSHEVA<sup>1</sup>, L.V. TOPCHIEVA<sup>1</sup>, E.L. TIKHONOVICH<sup>2</sup>, O.YU. BARYSHEVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia; <sup>2</sup>V.A. Baranov Republican Hospital, Petrozavodsk, Russia; <sup>3</sup>Petrozavodsk State University, Ministry of Health of Russia, Petrozavodsk, Russia

**Aim.** To analyze an association of *TNF* –308G>A polymorphism with a risk for pulmonary sarcoidosis (PS) in the Russian population of the Republic of Karelia

**Subjects and methods.** 84 patients with persistent PS and 96 donors without clinical manifestations of this disease (a control group) were examined. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis was used to identify alleles and genotypes by the marker of *TNF* –308G>A polymorphism. The level of transcripts of the above gene in the peripheral blood leukocytes of healthy and sick people was determined by real-time PCR.

**Results.** There were no significant differences in the distribution of allelic and genotypic frequencies by the marker of *TNF* –308G>A polymorphism between the control and PS patient groups. There was a significant increase in the number of *TNF* gene transcripts in the peripheral blood leukocytes of patients with PS compared to the controls. At the same time, there were no marked differences in mRNA expression levels in the above gene in the carriers of different genotypes by the marker of *TNF* –308G>A polymorphism in all the examined groups.

**Conclusion.** The marker of *TNF* –308G>A polymorphism is unassociated with the risk of PS in the Russian population of the Republic of Karelia. No differences in *TNF* mRNA levels in the carriers of different genotypes by the above marker may suggest that the found elevated level of transcripts in the above gene in patients with diagnosed with PS is due to the development of the body's inflammatory responses in this disease.

**Keywords:** pulmonary sarcoidosis, cytokines, *TNF* gene, polymorphism, expression.

ПЦР — полимеразная цепная реакция  
ПЦР-РВ — ПЦР в реальном времени

СЛ — саркоидоз легких  
TNF- $\alpha$  —  $\alpha$ -фактор некроза опухоли

### Сведения об авторах:

Топчиева Людмила Владимировна — в.н.с. лаб. генетики

Тихонович Элла Леонидовна — зав. отд.-нием респираторной терапии

Барышева Ольга Юрьевна — д.м.н., проф. каф. госпитальной терапии

### Контактная информация:

Малышева Ирина Евгеньевна — с.н.с. лаб. генетики; 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11; тел.: +7(814)257-1879; e-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

Саркоидоз — мультисистемное воспалительное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся образованием в различных органах, преимущественно в легких и внутригрудных лимфатических узлах, эпителиоидно-клеточных гранулам [1]. В России распространенность саркоидоза колеблется от 22 до 47 на 100 тыс. населения, а в Республике Карелия составляет 73 на 100 тыс. населения, т.е. выше, чем в центральных регионах [1, 2]. Данной патологией страдают преимущественно лица в возрасте 20–40 лет.

Саркоидоз является мультифакторным заболеванием, при котором генетическая предрасположенность наряду с факторами окружающей среды вносит вклад в развитие данной патологии. Более частое возникновение заболевания в определенных расовых и этнических группах, а также описанные случаи семейного наследования саркоидоза подтверждает это предположение [3]. В развитии хронического гранулематозного воспаления и образовании гранулемы при саркоидозе важную роль играют провоспалительные цитокины, а именно  $\alpha$ -фактор некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ) [4]. Данный цитокин участвует в регуляции пролиферации и апоптоза клеток, а также в аккумуляции макрофагов и их дифференцировке в эпителиоидные клетки при формировании гранулемы [5, 6]. Согласно данным литературы существенное влияние на генетическую предрасположенность к развитию саркоидоза и исход заболевания оказывает полиморфизм генов цитокинов, в том числе гена *TNF* [7, 8]. Наиболее изучена связь точечной мутации в положении –308 промоторной области гена *TNF* с повышенным риском развития данной патологии [9]. Замена аденина гуанином в указанном сайте промотора значительно повышает его транскрипционную активность, вероятно, за счет изменения способности связывать транскрипционный фактор [10]. Усиление транскрипционной активности может влиять на продукцию самого белка и вносить вклад в патогенез заболевания [11]. Однако имеются и противоположные данные. Так, увеличение транскрипционной активности гена *TNF* и продукция TNF- $\alpha$  у больных людей ассоциирована с аллелем G и генотипом GG [12, 13]. Важно отметить, что данные, полученные относительно связи указанного полиморфного маркера гена *TNF* с развитием саркоидоза, немногочисленны и противоречивы. Так, в работах некоторых авторов показана ассоциация полиморфизма –308G>A гена *TNF* с развитием саркоидоза, в то время как в других исследованиях такой связи не установлено [14, 11]. Стоит также подчеркнуть, что в литературе мало сведений о наличии или отсутствии ассоциации полиморфизма –308G>A гена *TNF* с риском развития саркоидоза в Российских популяциях, а для жителей Республики Карелия они отсутствуют. В связи с этим цель настоящего исследования заключалась в анализе ассоциации полиморфного маркера –308G>A гена *TNF* с риском развития саркоидоза легких (СЛ) у русского населения Республики Карелия.

## Материалы и методы

В исследование включили 84 больных с диагнозом персистирующий СЛ (средний возраст  $44,80 \pm 1,35$  года) и 96 здоровых доноров (контроль) (средний возраст  $42,67 \pm 1,50$  года). Диагноз СЛ устанавливали на основании клинико-рентгенологических изменений и подтверждали морфологически. Критерии исклю-

чения из исследования: сахарный диабет, выраженные нарушения функции внутренних органов, а также перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, курение табака, беременность и лактация, алкогольная зависимость, индекс массы тела  $\geq 28$  кг/м. Информированное согласие получено от всех пациентов. Работа утверждена этическим комитетом ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова».

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью набора Analytik jena (Германия). Генотипирование полиморфизма –308G>A гена *TNF* осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с полиморфизм одно рестриционных фрагментов (ПДРФ). ПЦР проводили на приборе iQ5 («Bio-Rad», США). Для амплификации использовали наборы Screen mix и праймеры производства фирмы «Евроген» (Россия). Последовательность праймеров указана в работе М. Ито и соавт. [15]. Продукты ПЦР обрабатывали эндонуклеазой рестрикции NcoI (1 е.а.) («Thermo Scientific», Германия) в течение 3 ч при температуре 37 °C и разделяли в 6% полиакриламидном геле. После окрашивания в растворе бромистого этидия их визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Тотальную РНК из клеток крови выделяли на колонках Ахургер Multisource Total RNA Miniprep Kit («Ахуген», США). Для удаления остатков ДНК раствор тРНК обрабатывали ДНКазой («Сибэнизм», Россия) (1 е.а.) при температуре 37 °C в течение 30 мин. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора MMLV RT kit («Евроген», Россия). Экспрессию гена *TNF* оценивали методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на приборе iCycler iQ5 («Bio-Rad», США). Для амплификации использовали наборы qPCRmix-HS SYBR. Последовательность праймеров для ПЦР-РВ («Евроген», Россия) указана в работе J. Pinto и соавт. [16]. Уровень экспрессии гена *TNF* рассчитывали относительно уровня экспрессии референсного гена *GAPDH*. ПЦР-РВ для каждого образца проводили не менее 3 раз.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ StatGraphics 2.1, а также Microsoft Excel 2010. Достоверность различий частот аллелей и генотипов в группах оценивали с помощью критерия  $\chi^2$ , достоверность различий уровня транскриптов гена между группами — с помощью непараметрического критерия U Вилкоксона—Манна—Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

## Результаты

Данные о распределении частот аллелей и генотипов полиморфного маркера –308G>A гена *TNF* в контрольной группе и у больных СЛ представлены в таблице. Согласно результатам исследования достоверных различий по распределению частот аллелей и генотипов полиморфного маркера –308G>A гена *TNF* в обследованных группах не выявлено. Проведенный тест на соответствие распределения равновесию Харди—Вайнберга показал, что генотипы исследуемого полиморфного маркера гена *TNF* находились в соответствии с этим распределением в контрольной группе ( $\chi^2=2,96$ ;  $df=2$ ;  $p < 0,05$ ) и у больных с СЛ ( $\chi^2=0,64$ ;  $df=2$ ;  $p < 0,05$ ).

По результатам анализа установлено значительное повышение количества транскриптов гена *TNF* в лейкоцитах крови больных СЛ по сравнению с контролем:  $0,086 \pm 0,004$  и  $0,053 \pm 0,010$  соответственно ( $p < 0,05$ ). При этом не обнаружено достоверных различий по уровню экспрессии гена *TNF* у носителей разных генотипов по полиморфному маркеру –308G>A гена *TNF* как в контрольной группе, так и в группе больных ( $p > 0,05$ ).

**Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера –308G>A гена *TNF* в группе больных СЛ и в контрольной группе**

Параметр	Контроль (n=96)	Больные СЛ (n=84)	Критерий $\chi^2$
Аллели:			
G	177 (0,92)	155 (0,92)	0,515 ( $p>0,05$ )
A	19 (0,08)	13 (0,08)	
Генотипы:			
GG	79 (0,82)	71 (0,84)	1,777 ( $p>0,05$ )
GA	15 (0,16)	13 (0,16)	
AA	2 (0,02)	—	

### Обсуждение

Однонуклеотидные замены (SNPs) в регуляторных областях генов цитокинов, в том числе *TNF*, связаны с повышенным риском развития различных заболеваний, в том числе многих патологий легких, например таких как, хронический бронхит, фиброзирующий альвеолит, бронхиальная астма, силикоз и др. [13]. В проведенном нами исследовании не выявлена ассоциация полиморфизма –308G>A гена *TNF* с риском развития СЛ в исследуемой группе больных ( $p>0,05$ ). Отсутствие связи указанного полиморфного маркера с риском развития данной патоло-

гии показано также в работе С. Swider и соавт. [17]. При этом авторами отмечена более высокая частота аллеля А в группе больных с синдромом Лефгрена по сравнению с группой пациентов с персистирующей формой СЛ. Аналогичные результаты по распространенности аллеля А отмечены у больных СЛ с синдромом Лефгрена в чешской популяции [18]. По данным литературы, у больных СЛ в плазме крови наблюдается повышенный уровень *TNF- $\alpha$*  [19]. Увеличение содержания провоспалительных цитокинов у пациентов с этим диагнозом может быть обусловлено не только генетическими факторами, а скорее всего патологическим процессом и регуляцией иммунного ответа при СЛ. Об этом свидетельствует, что в отсутствие достоверных различий по распределению частот аллелей и генотипов по –308G>A-маркеру гена *TNF* в исследуемых нами группах людей выявлена высокая транскрипционная активность гена *TNF* в лейкоцитах периферической крови больных СЛ по сравнению с контролем.

Таким образом, в проведенном нами исследовании не установлена связь –308G>A полиморфного маркера гена *TNF* с риском развития СЛ у русского населения Республики Карелия.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема №0221-2014-0008).

**Конфликт интересов отсутствует.**

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Саркоидоз*: Монография. Под ред. А.А. Визеля. Серия монографий Российского респираторного общества. Гл. ред. серии А.Г. Чучалин. М.: Атмосфера, 2010.
2. Тихонович Э.Л., Везикова Н.Н., Маркелова О.А., Малышева И.Е. Эпидемиология, особенности клиники, диагностики и лечения саркоидоза в Карелии. *Ученые записки Петрозаводского государственного университета. Серия: Естественные и технические науки*. 2015;6(151):67-71.
3. McDougal K, Fallin M, Moller D, Song Z, Cutler D, Steiner L, Cutting G. Variation in the lymphotoxin-alpha/tumor necrosis factor locus modifies risk of erythema nodosum in sarcoidosis. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(8):1921-1926. doi:10.1038/jid.2008.456
4. Iannuzzi M, Rybicki B, Teirstein A. Sarcoidosis. *The New England journal of medicine*. 2007;357:2153-2165. doi:10.1056/NEJMra071714
5. Agostini C, Semenzato G. Cytokines in sarcoidosis. *Seminars in respiratory infections*. 1998;13(3): 184-196.
6. Goetz F, Planas J, MacKenzie S. Tumor necrosis factors. *Developmental and comparative immunology*. 2004;28(5):487-497. doi:10.1016/j.dci.2003.09.008
7. Feng Y, Zhou J, Gu C, Ding Y, Wan H, Ni L, Niu W. Association of six well-characterized polymorphisms in *TNF- $\alpha$*  and *TNF- $\beta$*  genes with sarcoidosis: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(11):e80150. doi:10.1371/journal.pone.0080150.
8. Medica I, Kastrin A, Maver A, Petrliin B. Role of genetic polymorphisms in ACE and *TNF-alpha* gene in sarcoidosis: a meta-analysis. *Journal of human genetics*. 2007;52(10):836-847. doi:10.1007/s10038-007-0185-7
9. Song G, Kim J, Lee Y. Associations between *TNF- $\alpha$*  -308 A/G and lymphotoxin- $\alpha$  +252 A/G polymorphisms and susceptibility to sarcoidosis: a meta-analysis. *Molecular biology reports*. 2014;41(1):259-267. doi:10.1007/s11033-013-2859-x
10. Wilson A, Symons J, McDowell T, McDevitt H, Duff G. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(7):3195-3199.
11. Seitzer U, Swider C, Stüber F, Suchnicki K, Lange A, Richter E, Zabel P, Müller-Quernheim J, Flad HD, Gerdes J. Tumor necrosis factor alpha promoter gene polymorphism in sarcoidosis. *Cytokine*. 1997;9:787-790. doi:10.1006/cyto.1997.0224
12. Топчиева Л.В., Малышева И.Е., Курбатова И.В., Корнева В.А., Степанова А.И., Немова Н.Н. Анализ ассоциации полиморфного маркера – 308G>A гена *TNF* с развитием эссенциальной артериальной гипертензии у жителей Карелии. *Медицинская генетика*. 2014;13(12):11-15.
13. Helmig S, Aliahmadi N, Stephan P, Dührel J, Schneider J. *TNF- $\alpha$*  -308 genotypes are associated with *TNF- $\alpha$*  and *TGF- $\beta$* ? mRNA expression in blood leucocytes of humans. *Cytokine*. 2011;53(3):306-310. doi:10.1016/j.cyto.2010.11.018
14. Sharma S, Ghosh B, Sharma S K. Association of *TNF* polymorphisms with sarcoidosis, its prognosis and tumour necrosis factor (*TNF*)- $\alpha$  levels in Asian Indians. *Clinical and experimental immunology*. 2008;151(2):251-259. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03564.x

15. Ito M, Takahashi H, Fuse K, Hirono S, Washizuka T, Kato K, Yamazaki F, Inano K, Furukawa T, Komada M, Aizawa Y. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Japanese heart journal*. 2000;41(2):183-191. doi:10.1536/jhj.41.183
16. Pinto J, Dias V, Zoller H, Porto G, Carmo H, Carvalho F, de Sousa M. Hepcidin messenger RNA expression in human lymphocytes. *Immunology*. 2010;130(2):217-230. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03226.x
17. Swider C, Schnittger L, Bogunia-Kubik K, Gerdes J, Flad H, Lange A, Seitzer U. TNF-alpha and HLA-DR genotyping as potential prognostic markers in pulmonary sarcoidosis. *European cytokine network*. 1999;10(2):143-146. doi:10.1006/cyto.1997.0224
18. Mrazek F, Holla L, Huturova B, Znojil V, Vasku A, Kolek V, Welsh K, Vacha J, du Bois R, Petrek M. Association of tumour necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha and HLA-DRB1 gene polymorphisms with Löfgren's syndrome in Czech patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens*. 2005;65(2):163-171. doi:10.1111/j.1399-0039.2005.00370.x
19. Li Z, Chen W, Hou X, Yu R. Detection of TNF-alpha and NCF in the serum and BALF of patients with sarcoidosis and evaluate their clinical significance. *Zhonghua jie he hu xi za zhi*. 1999;22(1):37-39.

Поступила 25.04.2016