

УДК: 616.24-002.5-078.73:616.89+577.175.14

DOI: 10.14427/jipai.2016.2.23

## Анализ ассоциации полиморфизма -238G>A гена TNF с саркоидозом легких у русского населения Республики Карелия

И.Е. Малышева<sup>1</sup>, Л.В. Топчиева<sup>1</sup>, Э.Л. Тихонович<sup>3</sup>, О.Ю. Барышева<sup>2</sup>,  
Т.О. Волкова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии Карельского научного центра РАН (ИБ КарНЦ РАН), Петрозаводск, Россия

<sup>2</sup> Республиканская больница им. В.А. Баранова, Петрозаводск, Россия

<sup>3</sup> Петрозаводский Государственный университет (ПетрГУ), Петрозаводск, Россия

## Analysis of association of polymorphism -238G>A TNF gene with pulmonary sarcoidosis in the ethnic Russians of Karelia

I.E. Malysheva<sup>1</sup>, L.V. Topchieva<sup>1</sup>, E.L. Tikhonovich<sup>3</sup>, O.Y. Barysheva<sup>2</sup>, T.O. Volkova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biology of Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences (IB KarRC RAS), Petrozavodsk, Russia

<sup>2</sup> Republican Hospital named after V.A. Baranov, Petrozavodsk, Russia

<sup>3</sup> Petrozavodsk State University (PetrSU), Petrozavodsk, Russia

### Аннотация

*Цель исследования.* Анализ ассоциаций полиморфного маркера -238G>A гена TNF с риском развития саркоидоза легких у пациентов русского происхождения, проживающих на территории Республики Карелия.

*Материалы и методы.* В исследование включено 180 человек (84 больных саркоидозом легких и 96 здоровых доноров (контроль)). Исследовали распределение аллелей и генотипов полиморфизма -238G>A гена TNF в указанных группах. Идентификацию аллелей данного полиморфного маркера проводили методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов.

*Результаты.* По результатам сравнительного анализа не выявлено значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного маркера -238G>A гена TNF между контрольной группой и группой больных саркоидозом легких ( $p>0,05$ ).

*Заключение.* Полиморфный маркер -238G>A гена TNF не ассоциирован с риском развития саркоидоза легких у пациентов русского происхождения, проживающих на территории Республики Карелия.

### Ключевые слова

Саркоидоз легких, цитокины, ген TNF, полиморфизм.

### Summary

*Aim.* To analyze the associations of the -238G>A polymorphism of TNF gene with susceptibility to pulmonary sarcoidosis in ethnic Russian patients of Karelia republic.

*Subjects and methods.* The distribution of alleles and genotypes of the -238G>A polymorphism of TNF gene was studied in 84 patients with pulmonary sarcoidosis and 96 healthy controls. The polymorphic alleles were identified by polymerase chain reaction-restriction fragment length analysis.

*Results.* Comparative analysis revealed no significant differences in the frequency of the alleles of the -238G>A polymorphism of TNF gene in investigated groups.

*Conclusion.* The -238G>A polymorphism of TNF gene is not associated with the risk of pulmonary sarcoidosis in ethnic Russian patients of Karelia republic

### Keywords

Pulmonary sarcoidosis, cytokines, TNF gene, polymorphism

Саркоидоз – иммунопосредованное заболевание, характеризующееся развитием гранулематозного воспаления в пораженных органах

и образованием в них неказеинфицирующихся эпителиоидноклеточных гранул [1, 2]. Патологические изменения могут затрагивать любые ор-

ганы, но наиболее часто локализуются в легких. В большинстве случаев заболевание заканчивается спонтанной ремиссией, однако в 20% наблюдается прогрессирующее течение с последующим развитием фиброза легких и респираторной недостаточности [3, 4].

Распространенность саркоидоза в разных странах неоднородна: от 100 чел. на 100 тыс. населения среди афро-американцев, 40-70 чел. на 100 тыс. в скандинавских странах. [5]. В России распространенность саркоидоза колеблется от 22 до 47 чел. на 100 тыс. населения, а в Республике Карелия составляет 73 чел. на 100 тыс. населения, т.е. чаще, чем в центральных регионах [6].

Хотя этиология заболевания до настоящего времени не установлена, считают, что генетические факторы играют важную роль в патогенезе саркоидоза. Это подтверждается семейной кластеризацией, повышенной конкордантностью у монозиготных близнецов и различием в восприимчивости и презентации заболевания среди различных расовых и этнических групп [7, 8].

Как было отмечено ранее, хроническое гранулематозное воспаление и образование гранулемы являются характерной особенностью данной патологии. Воспалительный процесс при саркоидозе сопровождается выработкой повышенного количества провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL1 и др.), при этом TNF $\alpha$  считается ключевым цитокином, участвующим в формировании гранулемы при саркоидозе [9, 10]. Так, в эксперименте с использованием модельных животных было показано, что у мышей, дефицитных по TNF $\alpha$  формировались гранулемы с участками обширного некроза. Все это в дальнейшем приводило к широкой десиминации *M. tuberculosis* и последующей гибели животных [11]. Показано, что при формировании гранулемы TNF $\alpha$  принимает участие в аккумуляции макрофагов, и их дифференцировке в эпителиоидные клетки [9, 12]. Повышенное количество данного цитокина

наблюдается в местах локализации саркоидных гранул [13, 14].

Уровень продукции этого провоспалительного белка в организме определяется не только развитием процесса воспаления, но регулируется генетическими факторами. Мутации, возникающие в промоторной области гена TNF, могут приводить к изменению транскрипционной активности данного гена. Так, в ряде исследований показано, что однонуклеотидная замена (SNP) в позиции -238G>A промоторной области гена TNF, влияет на уровень транскрипции данного гена и продукции соответствующего белка [15]. Имеющиеся в литературе данные о влиянии полиморфизма -238G>A гена TNF на риск развития саркоидоза достаточно противоречивы. Так, в ряде исследований установлена ассоциация данного полиморфного локуса гена TNF с риском развития саркоидоза у азиатских индийцев [16]. В то время как такой связи не установлено у населения Греции, Японии [17, 18]. Что касается сведений о влиянии этого полиморфизма гена TNF на риск развития саркоидоза в Российских популяциях, то такого рода данные малочисленны, а для жителей Республики Карелия они отсутствуют.

Цель настоящего исследования заключалась в анализе ассоциации полиморфного маркера -238G>A гена TNF с наличием саркоидоза легких у русского населения Республики Карелия.

### Материалы и методы

В исследование включено 180 человек: 84 больных с диагнозом персистирующий саркоидоз легких и 96 здоровых доноров (контроль).

Диагноз саркоидоз легких устанавливался на основании клинико-рентгенологических изменений, подтвержден морфологически. Материалом служили пробы периферической крови. Критерии исключения из исследования: наличие сахарного диабета, выраженные нарушения функции

**Таблица 1. Характеристика обследуемых групп**

Параметры	Больные саркоидозом легких	Контроль (здоровые доноры)
<i>n</i>	84	96
Средний возраст	44,80 $\pm$ 1,35 года	42,67 $\pm$ 1,50 года
мужчины	<i>n</i>	
	26	36
Ср. Возраст	45,03 $\pm$ 1,50 года	46,92 $\pm$ 1,72 года
женщины	<i>n</i>	
	58	60
Ср. Возраст	44,47 $\pm$ 1,50 года	38,04 $\pm$ 2,05 года

Примечание: *n*-число обследуемых лиц

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. Информационное согласие было получено от всех пациентов. Работа утверждена Этическим комитетом ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова».

Геномную ДНК из лейкоцитов периферической крови (ЛПК) выделяли с помощью набора «Analytik jena» (Германия). Генотипирование полиморфизма -238G>A гена TNF осуществляли с помощью метода ПЦР-ПДРФ. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на приборе «Махугене» (США). Для амплификации использовали наборы «HS-Screen mix» и праймеры производства фирмы «Евроген» (Россия). Последовательность праймеров указана в работе [19]. Гидролиз ПЦР-продуктов осуществляли эндонуклеазой рестрикции MspI («Сибэнзим», Россия) в течение 3 ч при 37°C. Фрагменты рестрикции разделяли в 8%-ном полиакриламидном геле, окрашивали 1%-ным раствором бромистого этидия и визуализировали в проходящем УФ-свете.

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  $\chi^2$ . Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Возраст доноров указан в виде средних значений и стандартного отклонения.

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

## Результаты

Распределение генотипов исследуемого полиморфизма гена TNF находилось в соответствии с

распределением по уравнению Харди–Вайнберга в группе больных саркоидозом легких ( $\chi^2 = 0,15$  ( $df=2$ ,  $p < 0,05$ )) и не соответствовало в контрольной группе ( $\chi^2 = 19,91$  ( $df=2$ ,  $p < 0,05$ )).

Показано, что частота аллелей и генотипов по -238G>A полиморфному маркеру гена TNF в группе больных саркоидозом легких и в контрольной группе значимо не различалась ( $p > 0,05$ ) (табл. 2).

Наиболее часто представлен в обеих группах гомозиготный GG генотип, доля которого составила 93,75% в контрольной группе и 91,67% у больных саркоидозом легких. При этом редкий AA генотип исследуемого полиморфного маркера гена TNF выявлен только в контрольной группе (табл. 2).

По результатам сравнительного анализа не установлено достоверных различий в частотах аллелей и генотипов по -238G>A полиморфному маркеру гена TNF в исследуемых группах ( $p > 0,05$ ) (табл. 2).

## Обсуждение результатов

Многочисленными исследованиями подтверждена важная роль провоспалительного цитокина TNF $\alpha$  в иммунном ответе, в процессе воспаления, а также его значимая роль в патогенезе саркоидоза [10, 11].

Установлено, что TNF $\alpha$  может стимулировать пролиферацию и рост клеток через активацию NF- $\kappa$ B-зависимого пути, а с другой стороны выступать в качестве индуктора программируемой гибели клеток через TNFR-1 путь [20, 21]. Влияние данного цитокина на этот процесс зависит от концентрации, типа ткани, стадии дифференцировки клеток и состояния внутриклеточных сигнальных путей. В экспериментальных моделях гранулематозного воспаления показана ключевая роль TNF $\alpha$  в формировании гранулемы, поскольку он участвует в самых начальных этапах каскада патогенетических изменений

**Таблица 2. Распределение аллелей и генотипов полиморфного маркера -238G>A гена TNF в группе больных саркоидозом легких и в контрольной группе**

Показатель		Контроль, $n=96$	Больные саркоидозом легких, $n=84$	Критерий $\chi^2$
Аллели	G	184 (0,958)	161 (0,958)	0,070 ( $p > 0,05$ )
	A	8 (0,042)	7 (0,042)	
Генотипы	GG	90 (0,938)	77 (0,917)	3,044 ( $p > 0,05$ )
	GA	4 (0,042)	7 (0,083)	
	AA	2 (0,020)	–	

Примечание: n – число обследованных лиц

при саркоидозе [22]. Предполагают, что данный цитокин играет двойственную роль в развитии саркоидоза. С одной стороны, он поддерживает хроническое воспаление путем сегрегации иммунокомпетентных клеток, в то время как с другой стороны, он способствует снижению апоптоза Т-лимфоцитов, что способствует поддержанию гранулемы. Установлено, что повышенный уровень этого цитокина наблюдается у больных саркоидозом в образцах бронхолегочного лаважа [23].

Ген TNF является важным геном кандидатом в развитии данного заболевания. Полиморфизм в промоторной области этого гена представляют большой интерес, поскольку показано, что мутации в промоторной части гена (в позиции -238G>A и -308G>A) оказывают влияние на транскрипционную активность гена TNF. Это, в свою очередь, влияет на уровень продукции TNF $\alpha$  и реализацию иммунного ответа при саркоидозе [24].

Экспериментальные исследования о влиянии указанного полиморфизма гена TNF на риск развития саркоидоза носят противоречивый характер. Так, в работах некоторых авторов показано отсутствие ассоциации -238G>A полиморфного маркера гена TNF с риском развития саркоидоза легких у населения Греции, Голландии [17, 26]. Не обнаружена связь данного полиморфизма гена TNF с риском развития саркоидоза у населения Дании, Британии, Японии [25, 18]. В то время как такая ассоциация установлена у азиатских индийцев [16].

В проведенном нами исследовании мы проанализировали частоту встречаемости аллелей и генотипов -238G>A полиморфного маркера гена TNF в группе больных саркоидозом легких и в контрольной группе. Частота встречаемости аллелей и генотипов данного полиморфного маркера была аналогичной популяциям западно-европейских стран [25, 26]. По результатам проведенного исследования не установлена связь -238G>A полиморфизма гена TNF с риском развития саркоидоза легких у русского населения, проживающего на территории республики Карелия. Отсутствие ассоциации исследуемого полиморфизма гена TNF возможно связано с тем, что данный полиморфный маркер ассоциирован не риском развития заболевания, а с степенью тяжести патологии. Так, в исследовании Veloso et al. показано, что -238G>A полиморфный маркер гена TNF может влиять на титр вирусных частиц в крови пациентов, страдающих СПИД [27]. В исследовании Sharma et al. показано, что риск смертельного исхода выше в 2,5 раза ( $p=0,02$ ), у больных с терминальной стадией болезни почек, имеющих генотип AA по -238G>A полиморфному маркеру гена TNF [28].

Таким образом, результаты исследования позволяют предположить, что исследуемый полиморфизм не вовлечен в генетическую предрасположенность русского населения Республики Карелия к развитию саркоидоза легких.

*Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств гранта Правительства РФ №11.G31.34.0052. и федерального бюджета на выполнение государственного задания: Тема №0221-2014-0008.*

## Литература

1. Саркоидоз: Монография. Под ред. А.А. Визеля. Серия монографий Российского респираторного общества. Гл. ред. серии А.Г. Чучалин. М.: Атмосфера, 2010.
2. Müller-Quernheim J, Schürmann M, Hofmann S et al. Genetics of sarcoidosis. Clin Chest Med 2008; 29: 391-414, doi:10.1016/j.ccm.2008.03.007.
3. Lynch JP, Ma YL, Koss MN, White ES. Pulmonary sarcoidosis. Semin Respir Crit Care Med. 2007; 28: 53-74. doi:10.1055/s-2007-970333.
4. Nunes H, Bouvry D, Soler P, Valeyre D. Sarcoidosis. Orphanet J Rare Dis. 2007; 2: 46. doi:10.1186/1750-1172-2-46.
5. Чучалин А.Г., Визель А.А., Илькович М.М. и др. Диагностика и лечение саркоидоза. Резюме федеральных согласительных клинических рекомендаций. Часть I. Классификация, этиопатогенез, клиника. 2014; 7(4): 62-70.
6. Тихонович Э.Л., Везикова Н.Н., Маркелова О.А., Малышева И.Е. Эпидемиология, особенности клиники, диагностики и лечения саркоидоза в Карелии. Ученые записки Петрозаводского гос. унив. Серия: Естеств. техн. н. 2015; 6(151): 67-71.
7. Broos CE, van Nimwegen M, Hoogsteden HC et al. Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis. Front Immunol. 2013; 10(4): 437. doi: 10.3389/fimmu.2013.00437.
8. McDougal K, Fallin M, Moller D et al. Variation in the lymphotoxin-alpha/tumor necrosis factor locus modifies risk of erythema nodosum in sarcoidosis. J Invest Dermatol. 2009; 129(8):1921-6. doi: 10.1038/jid.2008.456.
9. Agostini C., Semenzato G. Cytokines in sarcoidosis. Seminars in respiratory infections. 1998; 13(3): 184-96.

10. Iannuzzi M, Rybicki B, Teirstein A. Sarcoidosis. *New Engl J Med.* 2007; 357: 2153-65. DOI: 10.1056/NEJMra071714
11. Sharma S, Rathored J, Ghosh B, Sharma S. Genetic polymorphisms in TNF genes and tuberculosis in North Indians. *BMC Infect Dis.* 2010; 10: 165. DOI: 10.1186/1471-2334-10-165
12. Goetz F, Planas J, MacKenzie S. Tumor necrosis factors. *Develop Comp Immunol.* 2004; 28(5): 487-97. DOI:10.1016/j.dci.2003.09.008.
13. Prasse A, Georges CG, Biller H et al. Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4 and CD8 T cells. *Clin Exp Immunol.* 2000; 122: 241-8.
14. Zheng L, Teschler H, Guzman J et al. Alveolar macrophage TNF- release and BAL cell phenotypes in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152: 1061-6.
15. D'Alfonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 1994; 39: 150-5.
16. 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. *Clin Exp Immunol.* 2008; 151(2): 251-9. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2007.03564.x.
17. Makrythanias P, Tzetzis M, Rapti A et al. Cystic fibrosis conductance regulator, tumor necrosis factor, interferon alpha 10, interferon alpha-17, and interferon gamma genotyping as potential risk markers in pulmonary sarcoidosis pathogenesis in Greek patients. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010; 14(4): 577-84. DOI: 10.1089/gtmb.2009.0198.
18. Yamaguchi E, Itoh A, Hizawa N, Kawakami Y. The gene polymorphism of tumor necrosis factor-beta, but not that of tumor necrosis factor-alpha, is associated with the prognosis of sarcoidosis. *Chest.* 2001; 119(3): 753-61. DOI:10.1378/chest.119.3.753.
19. Козловская М.А., Швед Н.Ю., Ярмолинская М.И. и др. Поиск ассоциации и анализ межгенных взаимодействий генов цитокиновой системы (IL-4, IL-4 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RATNES) при эндометриозе. *Мед. генет.* 2012; 9: 10-18.
20. Aggarwal B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(9): 745-56.
21. Shin SP, Kim NK, Kim JH et al. Association between hepatocellular carcinoma and tumor necrosis factor alphas polymorphisms in South Korea. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(46): 13064-72. doi: 10.3748/wjg.v21.i46.13064.
22. Armstrong L, Godinho SI, Uppington KM et al. Tumour necrosis factor-alpha processing in interstitial lung disease: a potential role for exogenous proteinase-3. *Clin Exp Immunol.* 2009; 156(2): 336-43.
23. Pejnović N, Tomić O, Vojvodić D et al. IL-1, TNF and IL-6 production by alveolar mononuclear cells in patients with sarcoidosis. *Srp Arh Celok Lek.* 1994; 122(1): 96-7.
24. Medica I, Kastrin A, Maver A, Petrlin B. Role of genetic polymorphisms in ACE and TNF-alpha gene in sarcoidosis: a meta-analysis. *J Hum Genet.* 2007; 52(10): 836-47. doi: 10.1007/s10038-007-0185-7
25. Grutters JC, Sato H, Pantelidis P. et al. Increased frequency of the uncommon tumor necrosis factor - 857T allele in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165(8): 1119-24.
26. Wijnen PA, Nelemans PJ, Verschakelen JA et al. The role of tumor necrosis factor alpha G-308A polymorphisms in the course of pulmonary sarcoidosis. *Tissue Antigens.* 2010; 75(3): 262-8. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2009.01437.x.
27. Veloso S, Olona M, Garcia F. Effects of TNF-alpha genetic variants and CCR5 delta 32 on the vulnerability to HIV-1 infection and disease progression in Caucasian Spaniards. *BMC Med Genet.* 2010; 11: 63. doi: 10.1186/1471-2350-11-63.
28. Sharma R, Agrawal S, Saxena A, Sharma RK. Association of IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  gene polymorphism with malnutrition inflammation syndrome and survival among end stage renal disease patients. *J Interf Cytokine Res.* 2013; 33(7): 384-91. DOI: 10.1089/jir.2012.0109.

### Сведения об авторах:

Ирина Евгеньевна Малышева, к.б.н., с.н.с. Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Карельского научного центра Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН), 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11; факс: (8142) 769810, e-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

Людмила Владимировна Топчиева, к.б.н., в.н.с. Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Карельского научного центра Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН), 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11; факс: (8142) 769810, e-mail: topchieva67@mail.ru

Элла Леонидовна Тихонович, зав. отделением респираторной терапии Республиканской больницы им. В.А. Баранова, 185019, г. Петрозаводск, ул. Пирогова, д. 3; тел.: (8142)763910, e-mail: tikhonovich.ella@mail.ru

Ольга Юрьевна Барышева, д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», 185910, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33, тел. (8142) 764445, e-mail: olvar@karelia.ru

Татьяна Олеговна Волкова, д.б.н., профессор кафедры молекулярной биологии, биологической и органической химии ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», 185910, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33, тел. (8142) 784697, e-mail: VolkovaTO@yandex.ru

Поступила 5.04.2016 г.