

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА G308A ГЕНА TNF α И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА СИНТЕЗ ФНО- α ПРИ РЕЦИДИВИРУЮЩИХ БРОНХИТАХ У ДЕТЕЙ

Бахронов Ш.С., Шарипова О.А., Маматкулова Д.Х., Мелиева Г.А.

Самаркандский медицинский институт, г. Самарканд, Узбекистан

✓ Резюме

Целью настоящего исследования явилось изучение частоты полиморфных аллелей и генотипов G-308A гена TNF- α , а также влияния их на синтез TNF- α у больных РБ. Исследование проведено у 119 детей в возрасте от 2 до 7 лет с РБ (основная группа). Все больные основной группы были разделены на 2 подгруппы: I подгруппа 62 детей с рецидивирующим бронхитом, II подгруппу составили 57 больных с РБ на фоне ЛГД. Группу контроля составили 110 условно-здоровых детей того же возраста. Распределение аллелей и генотипов гена TNF- α в исследованных группах больных с РБ и РБ на фоне ЛГД и контроля соответствовали равновесию Харди-Вайнберга. В активной фазе РБ уровень TNF α 6,7 раз был выше по сравнению с контрольной группой. У детей РБ на фоне ЛГД выявлено увеличение концентрации TNF α 4,9 раза. У больных II подгруппы в фазе ремиссии отмечалась тенденция к снижению TNF α ($P > 0,49$), тогда как у больных I подгруппы в фазе ремиссии уровень TNF α был достоверно сниженным ($P < 0,0001$). Полученные данные указывают, на то, что у больных РБ на фоне ЛГД процесс острого иммунного воспаления сохраняется дольше.

Отмечена наибольшая частота аллеля G и генотипа G/G в исследованных группах. При этом показатели аллеля G и гомозиготного генотипа G/G у больных II подгруппы имело тенденцию к снижению по сравнению с группой контроля, т.е. данный генотип оказывает протективный эффект. Минорный аллель A и гетерозиготный G/A генотип наиболее встречались во II подгруппе (17,7% - в I подгруппе и 21% - во II подгруппе) по сравнению с условно здоровых детей. При этом шанс развития РБ носителей гетерозиготного генотипа G/A, во II подгруппе составляет 1,6. Среди больных РБ и здоровых не выявлено ни одного случая носительства мутантных генотипов A/A. Присутствие A-аллели сопровождался увеличением продукции TNF α у больных РБ на фоне ЛГД, не зависимо от фазы заболевания.

Ключевые слова: рецидивирующий бронхит, лимфотико-гипопластический диатез, полиморфизм генов, цитокины, rs1800629, фактор некроза опухолей альфа.

THE ROLE OF TNF α GENE POLYMORPHISM G308A AND ITS EFFECT ON TNF- α SYNTHESIS IN RECURRENT BRONCHITIS IN CHILDREN

Bakhronov Sh.S., Sharipova O.A., Mamatkulova D.Kh., Melieva G.A.

Samarkand Medical Institute, Samarkand, Uzbekistan

✓ Resume

The aim of this study was to study the frequency of polymorphic alleles and genotypes G-308A of the TNF- α gene, as well as their influence on the synthesis of TNF- α in patients with RB. The study was carried out in 119 children aged 2 to 7 years with RB (main group). All patients of the main group were divided into 2 subgroups: subgroup I of 62 children with recurrent bronchitis, subgroup II consisted of 57 patients with RB on the background of LGD. The control group consisted of 110 healthy children of the same age. The distribution of alleles and genotypes of the TNF- α gene in the studied groups of patients with RB and RB on the background of LGD and the control group corresponded to the Hardy-Weinberg equilibrium. In the active phase of RB, the level of TNF α was 6.7 times higher than in the control group. In children of RB against the background of LGD, a 4.9-fold increase in the TNF α concentration was revealed. In patients of subgroup II in the remission phase, there was a tendency towards a decrease in TNF α ($P > 0.49$), while in patients of subgroup I in the remission phase, the level of TNF α was significantly reduced ($P < 0.0001$). The data obtained indicate that in RB patients against the background of LGD, the process of acute

immune inflammation lasts longer. The highest frequency of the G allele and the G/G genotype was noted in the studied groups. At the same time, the indices of the G allele and the homozygous G/G genotype in patients of the II subgroup tended to decrease in comparison with the control group, i.e. this genotype has a protective effect. The minor allele A and the heterozygous G / A genotype were greatest in subgroup II (17.7% in subgroup I and 21% in subgroup II) compared to conditionally healthy children. At the same time, the chance of developing of RB carriers of the heterozygous genotype G / A in subgroup II is 1.6. Not a single case of carriage of mutant genotypes A / A was revealed among patients with RB and healthy people. The presence of the A allele was accompanied by an increase in TNF α production in RB patients against the background of LGD, regardless of the phase of the disease.

Key words: recurrent bronchitis, lymphatic-hypoplastic diathesis, gene polymorphism, cytokines, rs1800629, tumor necrosis factor alpha.

БОЛАЛАРДА РЕЦИДИВЛАНУВЧИ БРОНХИТ КАСАЛЛИГИДА G308A TNF- α ГЕН ПОЛИМОРФИЗМИ ВА УНИНГ TNF- α ОМИЛИ СИНТЕЗИГА ТАЪСИРИ

Бахронов Ш.С., Шарипова О.А., Маматкулова Д.Х., Мелиева Г.А.

Самарқанд тиббиёт институти, Самарқанд, Ўзбекистан

✓ Резюме

Ушбу тадқиқотнинг мақсади G-308A TNF α генининг полиморф аллеллари ва генотипларининг частотасини, шунингдек уларнинг рецидивланувчи бронхит билан оғриган беморларда TNF α синтезига таъсирини ўрганиш эди.

Тадқиқот 2 ёшдан 7 ёшгача бўлган рецидивланувчи бронхити бор 119 болада (асосий гуруҳ) ўтказилди. Асосий гуруҳнинг барча беморлари 2 та кичик гуруҳга бўлинди: I- кичик гуруҳга рецидивланувчи бронхити бор бўлган 62 та бола, II-гуруҳга лимфатик-гипопластик диатез фонида ривожланган рецидивланувчи бронхит билан касалланган 57 та бемор. Назорат гуруҳида эса шу ёшдаги 110 та шартли соғлом бола текширилди.

Қайталанувчи бронхит ва лимфатик-гипопластик диатез фонида ривожланган рецидивланувчи бронхит билан касалланган беморларнинг ўрганилган гуруҳларида TNF α генининг аллеллари ва генотипларининг тарқалиши Харди-Вайнберг мувозанатига мос келди.

Рецидивланувчи бронхитнинг фаол фазасида TNF α миқдори назорат гуруҳига қараганда 6,7 барабар юқори эди. Лимфатик-гипопластик диатез фонида ривожланган рецидивланувчи бронхит билан касалланган беморларда TNF α концентрациясининг 4,9 баробар омиши аниқланди.

II-кичик гуруҳ беморларида ремиссия босқичида TNF α ($P>0,49$) пасайиш тенденцияси кузатишган бўлса, I-гуруҳ беморларида ремиссия босқичида TNF α даражаси сезиларли даражада пасайган ($P<0,0001$). Олинган маълумотлар шуни кўрсатадики, лимфатик-гипопластик диатез фонида ривожланган рецидивланувчи бронхит билан касалланган беморларда ўткир иммун яллигланиш жараёни узоқ давом этади.

Ўрганилган гуруҳларда G аллел ва G/G генотипининг энг юқори частотаси қайд этилди. Шу билан бирга, II кичик гуруҳдаги беморларда G аллел ва гомозиготали G/G генотипининг кўрсаткичлари назорат гуруҳига нисбатан пасайишга мойил эди, яъни бу генотип протектив таъсирга эга. Минор аллел A ва гетерозиготали G/A генотипи анъанавий соғлом болаларга нисбатан II-кичик гуруҳда (I кичик гуруҳда -17,7% ва II гуруҳда -21%) энг кўп кузатилди. Шу билан бирга, II-кичик гуруҳда G/A гетерозиготали генотип ташувчиларида рецидивланувчи бронхит ривожланиш эҳтимоли 1,6 га тенг. Рецидивланувчи бронхит билан оғриган беморлар ва соғлом болалар орасида мутант генотип A/A ни ташиш ҳолатлари аниқланмади. A аллелининг мавжудлиги, касалликнинг босқичидан қатъий назар, лимфатико-гипопластик диатез фонида ривожланган рецидивланувчи бронхит билан касалланган беморларида TNF α ишлаб чиқаришининг кўпайиши билан бирга кечди.

Калит сўзлар: рецидивланувчи бронхит, лимфатик-гипопластик диатез, ген полиморфизми, цитокинлар, rs1800629, ўсимта некротизининг алфа омили.

Актуальность

Несмотря на использования современных диагностических методов исследования, увеличивается доля бронхитов рецидивирующего характера течения. Так распространенность РБ у детей составляет в настоящее время 2,5 на 1000 детей. Несмотря на то, что проблема лечения, профилактики бронхитов у детей хорошо освещена в литературе, генетические основы остаются малоизученными. В этой связи актуальным является выявление и изучение генетических маркеров у детей с РБ. Исходя из современных данных патогенеза поражения органов дыхания у детей, гены про- и противовоспалительных цитокинов являются генами- кандидатами и тесно связаны с развитием и клиническим течением этих заболеваний [1,9]. Изучение полиморфизма генов цитокинов, регуляция функциональной активности клеток иммунной системы и генетический контроль иммунного ответа даёт возможность разработки критериев предрасположенности к заболеваниям, в том числе органов дыхания. В связи с этим, актуальным является изучение ассоциации полиморфизма генов цитокинов у детей РБ в Узбекской популяции.

Цель исследования: изучить информативность и частоту распределения аллелей и генотипов полиморфизма G308A гена TNF α у детей с рецидивирующим бронхитом на фоне лимфатико-гипопластического диатеза (ЛГД) в Узбекской популяции.

Материал и методы

В обследование были включены 119 детей в возрасте от 2 до 7 лет с РБ (основная группа): 77(64,7%) мальчиков и 42(35,3%) девочки. Все больные основной группы были разделены на 2 подгруппы: I подгруппа 62 детей с рецидивирующим бронхитом, II подгруппу составили 57 больных с РБ на фоне ЛГД. Средний возраст детей составила $4,1 \pm 0,82$ лет. У 12(35%) больных РБ на фоне ЛГД при рентгенографии грудной клетки не

обнаружена увеличение вилочковой железы. Степень тимомегалии оценивали по J. Gewolb (1979). При этом 1 степень тимомегалии обнаружена у 22 (48,8%; $\leq 0,33$ КТТИ $< 0,37$), 2 степени у 17 (37,7%; $\leq 0,37$ КТТИ $< 0,42$) и 3 степени у 12 (26,6%; $\geq 0,42$ КТТИ) детей с ЛГД. Группу контроля составили 110 условно-здоровых детей того же возраста. Диагноз РБ устанавливали в соответствии с критериями МКБ. Диагноз ЛГД выставляли на основании клинико-лабораторных исследований. Степень тимомегалии определяли с помощью рентгенографии грудной клетки. Больные обследовались в динамике заболевания двукратно: в остром периоде бронхита и в катмнезе, через 1 месяцев после последнего эпизода бронхита. Все больные находились на стационарном лечении в остром периоде рецидивирующего бронхита. При этом 19 (30,6%) детей первой подгруппы переносили обструктивный бронхит и 43(69,4%) ребенка – простой бронхит. Тогда как 42 (73,7%) ребенка второй подгруппы переносили обструктивный бронхит и 15 (26,3%) детей – простой бронхит.

Концентрацию цитокинов ФНО- α в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-системы для ИФА «ИФА-ФНО- α » («Вектор-Бест», Россия, 2009).

У всех больных РБ на фоне ЛГД, а также условно-здоровых детей в узбекской национальности, которые составили контрольную группу, проведено ПЦР генотипирование полиморфизма G308A гена TNF α в лаборатории молекулярной генетики НИИ гематологии и переливании крови. Взятия крови осуществляли натошак из локтевой вены обследуемых детей в стерильных условиях.

Результат и обсуждения

Результаты изучения концентрации TNF α в сыворотки крови представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Содержание TNF α у детей с РБ и РБ на фоне ЛГД ($M \pm m$)

	Контроль	Активная фаза	Ремиссия	P
Рецидивирующий бронхит I подгруппа	$7,6 \pm 0,81$	$51,1 \pm 4,14$	$18,9 \pm 1,86$	$< 0,0001$
Рецидивирующий бронхит на фоне ЛГД II подгруппа		$32,68 \pm 1,97$	$30,72 \pm 1,97$	$< 0,0001$

Примечание: Р-достоверность различия в сравнении с данными контрольной группы.

Как видно из таблицы 1. у детей с РБ в активной фазе выявлялось увеличение уровня TNF α , который в 6,7раз был выше в активной и в фазе ремиссии 2,5раза по сравнению контрольной группы (P<0,0001).

При изучении уровня TNF α у детей РБ на фоне ЛГД нами выявлено увеличение концентрации TNF α 4,9 раз в активной фазе заболевания и 4,3 раза в фазе ремиссии по сравнению контрольной (P<0,0001).

У больных II подгруппы в фазе ремиссии отмечалась тенденция к снижению TNF α (P>0,49), тогда как у больных I подгруппе в фазе ремиссии уровень TNF α был достоверно сниженным (P<0,0001). Полученные данные указывают, на то, что у

больных РБ на фоне ЛГД процесс острого иммунного воспаления сохраняется дольше и могут трансформироваться в хроническое.

Ген, кодирующий TNF- α расположен в коротком плече 6-й хромосоме 6 (6p21.1 – 6p21.3). В регуляторной области имеет несколько однонуклеотидных полиморфизмов [4,5,6]. На сегодняшний день наибольший значимым является вариант замены гуанина на аденин в позиции 308(G/A) (rs1800629). Аллельный вариант 308A данного гена влияет на уровень транскрипции мРНК и биосинтезу данного цитокина в организме [2,8].

Изучение частоты распределения аллелей и генотипов полиморфизма G308A гена TNF α представлены в табл. 2

Таблица 2.

Частота распределения аллелей и генотипов инсерционно-делеционного полиморфизма G-308A гена TNF- α в группах наблюдения (case-control)

Аллели и генотипы	Основная группа n=119		Контрольная группа n=110		χ^2	P	RR	95% CI	OR	95% CI
	n	%	n	%						
G	215	90.3	204	92.7	0.8	0.4	1.3	0.721; 2.448	1.4	0.701; 2.655
A	23	9.7	16	7.3						
G/G	96	80.7	94	85.5	0.9	0.3	0.9	0.84; 1.061	0.7	0.353; 1.429
G/A	23	19.3	16	14.5	0.9	0.3	1.3	0.742; 2.38	1.4	0.712; 2.830
A/A	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-

Как видно, из таблицы 2. Частота встречаемости дикого G аллеля гена TNF- α в группе общей выборки и контроля были статистически незначимыми и составляла 90 % и 92.7%. Неблагоприятный аллель rs1800629 A был редким и встречался у 7.3% в контрольной, 10% в основной группе больных. При проведение статистической обработке, несмотря на незначительные различия, выявлена высокая отношения шансов обнаружения неблагоприятного аллеля A у больных РБ в общей выборке (OR=1.4; 95% CI: 0.701-2.655). При этом в I подгруппе (n=62) частота неблагоприятного аллеля отмечалась в 8.9%, а во II подгруппе (n=57) в 10.5% случаев.

Носительство аллеля A II подгруппе была 1.4 раза выше чем контрольной ($\chi^2=1.03$; P=0.3; OR=1.5; 95% CI 0.684; 3.29) и 1,2 раза по сравнению с I подгруппой (OR=0.8; 95% CI 0.35; 1.957) табл.3; 4.

Известно, что ассоциация аллеля A с более высоким уровнем продукции ФНО- α указывает на возможное значение этого аллеля как фактора риска осложнений [3,5,7]. В наших исследованиях у детей в I подгруппе отмечалось незначительное увеличение частоты минорного аллеля A по сравнению с контрольной группой (8.9% против 7.3%) и через месяц после активной фазе отмечалось достоверное снижение уровня ФНО - α (P<0,0001) и осложненное течение заболевания не выявили.

Таблица 3.

Различия в частоте встречаемости аллелей и генотипов G308A гена TNF α I
подгруппе больных и контрольной выборке

Аллели и геноти пы	Подгруппа I n= 62		Контрольная группа n=110		χ^2	P	RR	95% CI	OR	95% CI
	n	%	n	%						
G	113	91.1	204	92.7	0.3	0.6	1.2	0.585; 2.545	1.2	0.557; 2.766
A	11	8.9	16	7.3						
G/G	51	82.3	94	85.5	0.3	0.6	1.0	0.838; 1.106	0.8	0.341; 1.828
G/A	11	17.7	16	14.5	0.3	0.6	1.2	0.605; 2.461	1.3	0.547; 2.935
A/A	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-

Таблица 4.

Различия в частоте встречаемости аллелей и генотипов G308A гена TNF α II
подгруппе больных и контрольной выборке

Аллели и геноти пы	Подгруппа II n=57		Контрольная группа n=110		χ^2	P	RR	95% CI	OR	95% CI
	n	%	n	%						
G	102	89.5	204	92.7	1.03	0.3	1.4	0.709; 2.954	1.5	0.684; 3.29
A	12	10.5	16	7.3						
G/G	45	79	94	85.4	1.14	0.3	0.9	0.791; 1.078	0.6	0.279; 1.462
G/A	12	21	16	14.5	1.14	0.3	1.4	0.736; 2.847	1.6	0.684; 3.588
A/A	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-

Анализ распределения генотипов G/G в основной группе больных составила 80.7% (82.3% - в I подгруппе и 79% - во II подгруппе больных), в контрольной группе регистрировалась 85.4%. Отмечена наибольшая частота аллеля G и генотипа G/G в исследованных группах. При этом показатели аллеля G и гомозиготного генотипа G/G у больных II подгруппе имело тенденцию к снижению по сравнению с группой контроля, т.е. данный генотип оказывает протективный эффект. Увеличение количество гомозиготного G/G генотипа у детей контрольной группы свидетельствует о возможном защитном эффекте данного генотипа в отношении формирования РБ на фоне ЛГД.

Частота гетерозиготного носительства G/A генотипа в основной группе больных составило 19.3% (17.7% - в I подгруппе и 21% - во II подгруппе больных) в контрольной группе встречалось 14.5%. Показатели гетерозиготного носительства генотипа G/A в

основной группе больных имело тенденцию к увеличению. При этом шанс развития в отношении РБ составил 1.4 (95% CI: 0.7-2.83). Изучение частоты встречаемости гетерозиготного G/A генотипа между подгруппами, выявлена наибольшая частота встречаемости этого генотипа у больных II подгруппе (17.7% - в I подгруппе и 21% - во II подгруппе) по сравнению условно здоровых детей. При этом шанс развития РБ носителей гетерозиготного генотипа G/A, во II подгруппе составляет 1.6 [CI95%: 0.684; 3.588] табл.4.

Из литературных данных известно, что полиморфный вариант для аллелей и генотипов полиморфизма G-308A гена TNF- α характерны некоторые различия частот между этническими группами [10]. Согласно этим данным для монголоидов частота встречаемости неблагоприятного генотипа A/A составляет 0-2% [NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) и Allele Frequencies in Worldwide populations]. Подтверждением этого является наше исследование, которые

показали, что во всех исследуемых группах не выявлено случаев носительства генотипов А/А гена TNF- α .

Таким образом, полученные результаты исследования указывают, что полиморфизм G-308A гена TNF- α влияет на уровень фактора некроза опухолей альфа в крови больных РБ на фоне ЛГД. Недостовверное снижение этого цитокина в фазе ремиссии показывает, что у больных РБ на фоне ЛГД острый иммунный воспалительный процесс сохраняется дольше и могут трансформироваться хроническое.

Заключение

Полученные результаты указывают, что наибольшая частота аллеля G и генотипа G/G промотора гена фактора некроза опухолей альфа rs1800629 в исследованных группах снижают вероятность развития заболевания, и свидетельствует о возможном защитном эффекте данного аллеля и генотипа в отношении формирования РБ и РБ на фоне ЛГД. При этом среди больных РБ и здоровых не выявлено ни одного случая носительства мутантных генотипов А/А. Присутствие А-аллели сопровождается увеличением продукции TNF α у больных РБ на фоне ЛГД, не зависимо от фазы заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Гулиев Н.Д., Рагимова Н.Д. Полиморфизм генов цитокинов у новорожденных с внутриутробными инфекциями. //Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2015 № 6. с.42-47.
2. Зыков М.В., Макеева О.А., Голубенко М.В. и др. Исследование полиморфизма rs1800629 (G308A) гена TNF α у больных инфарктом миокарда с подъёмом сегмента ST. Российский кардиологический журнал 2014. №10. С.-13-18.
3. Мирманова Н.А. Ассоциация генетического полиморфизма гена TNF α (G-308) с формированием тяжелых и осложненных форм гриппа у детей. //Читинская государственная медицинская академия Чита. Том 5, №4 2013 с.30-34.
4. Хотько Е.А., Таганович А.Д. Полиморфизм рецепторных генов и их лигандов при хронической обструктивной болезни легких. //Медицинский журнал № 3. С. 36-42. Беларусь 2016
5. Dawid S. [et al.] The signifcace of IL1 β +3953C>T, IL-6 -174G>C and -596G>A, TNF- α -308G>A gene polymorphisms and 86 bp variable number tandem repeat polymorphism of IL-1RN in bronchopulmonary dysplasia in infants born before 32 weeks of gestation // Cent Eur J Immunol. 2017: 42(3): pp.287-293
6. Hong S.J. [et al.] TNF-alpha (-308G/A) and CD14 (-159T/C) polymorphisms in the bronchial responsiveness of Korean children with asthma // J. Allergy Clin Immunol. 2007. No. 173. pp. 970-976.
7. HuGENavigator (2013). Available at: [http://www. Huge navigator.net/HuGENavigator/ gene Prospector](http://www.Huge navigator.net/HuGENavigator/gene Prospector) (accessed June 2013).
8. Hajeer A.H, Hutchinson I.V. Influence of TNF alpha gene polymorphisms on TNF alpha production and disease. Hum Immunol. 2001 Nov; 62(11):1191-9;
9. Patel J.A., Reuben Matalon Polymorphisms of immunity genes and susceptibility to otitis media in children. Published: April 9.2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093930>
10. Shevchenko A.V, Golovanova O.V, Konenkov V.I, Features of polymorphism of promoter regions of genes cytokines IL1, IL4, IL5, IL6, IL10 and TNF α at the European population of Western Siberia. Immunology 2010; 4; 176-181.

Поступила 09.09.2021