

УДК 575.113:616.24-003.661-057-084(477.61)

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА *TNF- α -308*G/A* ЯК БІОМАРКЕР РИЗИКУ РОЗВИТКУ ПНЕВМОКОНІОЗУ У ШАХТАРІВ ВУГІЛЬНИХ ШАХТ

Горovenko Н.Г.², Журахівська Н.В.^{1,2}, Басанець А.В.¹, Подольська С.В.²¹Інститут медицини праці АМН України, м.Київ²Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика, м.Київ

Пневмокониоз (ПК) є одним з найрозповсюдженіших мультифакторіальних захворювань у професійній патології і потребує нових підходів у профілактиці і вивченні механізмів патогенезу. Визначення біомаркерів спадкової схильності до ПК дозволить виявити групу ризику серед працюючих та своєчасно надати їм необхідну медичну допомогу. Одним з можливих біомаркерів спадкової схильності до розвитку пневмокониозу від впливу вугільного пилу є поліморфізм гена фактора некрозу пухлин *TNF- α -308*G/A*.

Алельний поліморфізм гена *TNF- α* було визначено у 138 здорових (контрольна група) та 112 хворих на ПК шахтарів зі стажем роботи під землею не менше 10 років. Наявність алелів визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів.

Частота виявлення алеля *TNF- α -308*A* у групі здорових шахтарів становила 8%, у групі хворих на ПК – 11,6%. Величина OR=1,5 (СІ: 0,8–2,76) вказувала на підвищення ризику розвитку ПК у носіїв алеля А. Для алеля G значних відмінностей у частоті розподілу між обстеженими групами не виявлено. Різницю між частотами генотипів за генотипом *TNF- α* у групі хворих на ПК і контрольній групі було виявлено лише для генотипу *TNF- α -308*G/A* (OR =1,4, СІ: 0,8–2,7).

Встановлено, що наявність алеля *TNF- α -308*A* та генотипу *TNF- α -308*G/A* є чинником ризику розвитку ПК у шахтарів вугільних шахт України.

Ключові слова: біомаркер, пневмокониоз, фактор некрозу пухлин

Вступ

Як було показано нами раніше, в основі спадкової схильності до ПК лежить широкий генетичний поліморфізм по ферментах, структурних та транспортних білках [2]. Процес розвитку ПК пов'язаний з надмірним розвитком склеротичної тканини. Однією з причин цього явища є підвищена активність макрофаг-похідних цитокінів та факторів росту. У низці досліджень показано ключову роль фактора некрозу пухлин α (*TNF- α*) у розвитку силікозу [7, 13, 16]. Також було доведено, що концентрація *TNF*-рецепторів у сироватці крові корелює з фіброзним процесом при ПК, а рівні цитокінів залежать від стадії перебігу захворювання [14, 18, 19].

TNF- α – це прозапальний цитокін, що відіграє важливу роль у виникненні запальних процесів, будучи потужним медіатором запалення та імунної відповіді організму. Для багатьох типів клітин цей цитокін виступає як регулятор росту та диференціації. Проте, при надлишковій секреції він діє як фактор активації макрофагів та нейтрофілів, індуюючи синтез каскаду інтерлейкінів (IL), з яких у патогенезі ПК найбільш значущими є IL1, IL6, IL8, IL10 [4, 5, 11].

Секреція цитокіну регулюється як на транскрипційному, так і на пост-транскрипційному рівнях. Відомі декілька діалельних поліморфізмів гена *TNF- α* , що, за даними літератури, тією чи іншою мірою впливають на кількість білкового продукту: *TNF- α -308*G/A*, *TNF- α -376*G/A*, *TNF-238*G/A* та поліморфізм *TNF- α +489*G/A*, що локалізується у першому інтроні гена [3, 8, 9, 11, 15]. Більшість авторів вказує на підвищення рівня продукції цитокіну *TNF- α* при заміні гуаніну на аденін у положенні промотора -308 [8, 15].

Метою роботи було вивчення діалельного поліморфізму A/G у позиції -308 гена *TNF- α* для оцінки ролі генетичних факторів у процесі розвитку ПК шахтарів вугільних шахт України та визначення можливості використання означених алельних варіантів як біомаркерів спадкової схильності до цього захворювання.

Матеріали та методи досліджень

Упродовж виконання роботи було обстежено 112 хворих на ПК шахтарів, що працювали у вугільних шахтах Донецького та Луганського регіонів в основних професіях: гірничий робітник

очисного забою (ГРОЗ), гірничий майстер, забійник, прохідник, кріпильник, підземний електрослюсар та машиніст гірничовиймальных машин (МГВМ). Стаж їхньої праці під землею був не меншим 10 років, вік коливався у межах від 38 до 76 років (середній – 52,5 років). Хворі перебували на лікуванні у терапевтичному відділенні клініки Інституту медицини праці АМН України. Діагноз ПК встановлювали на підставі клінічного обстеження з використанням рентгенодіагностики, комп'ютерної томографії, спірографії, бодиплетизмографії, дифузійної здатності альвеоло-капілярної мембрани та загальноклінічних лабораторних методів.

Групу контролю становили 138 шахтарів, що не хворіли на ПК і не мали жодної бронхолегеневої патології, проте за стажем та умовами праці були ідентичними до шахтарів основної групи. Вік обстежених з цієї групи коливався у межах від 32 до 69 років (середній – 49,7 років). Обстеження здійснював лікар-профпатолог з використанням рентгенодіагностики, спірографії та загальноклінічних методів на базі міської лікарні № 25 м.Донецька.

Аналіз ДНК здійснювали на базі молекулярно-

генетичної лабораторії кафедри медичної генетики НМАПО ім. П.Л.Шупика. ДНК виділяли з лейкоцитів периферичної крові за допомогою комерційної тест-системи «DNA PCR test» (ООО Лаборатория Изоген, Росія) відповідно до інструкції. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали з використанням реагентів фірми Fermentas. Послідовність олігонуклеотидних праймерів та протокол ПЛР наведено у таблицях 1 та 2. Для забезпечення температурного режиму ампліфікації (табл. 3) використовували ампліфікатор Perkin-Elmer 2700.

Продукти ампліфікації обробляли ферментом – рестриктазою NcoI. Інкубація тривала 8 годин при температурі 37°C. Реакційну суміш готували за протоколом, наведеним у таблиці 4.

Залежно від наявності чи відсутності відповідних сайтів рестрикції мали різну молекулярну вагу. Їх візуалізацію здійснювали у 3% агарозному гелі (рис. 1). Рестрикційні фрагменти з молекулярною масою 107 п.н. відповідали генотипу А/А, а з молекулярною масою 87 та 20 п.н. – генотипу G/G. Молекулярна маса рестрикційних фрагментів при генотипі AG становила 107, 87 та 20 п.н.

Таблиця 1

Протокол реакційної суміші для ПЛР

Гени та локуси, що ампліфікуються	Реагенти	Кількість
<i>TNF-α-308</i>	10× Taq буфер	5 μl
	2 mM dNTP mix	5 μl
	25 mM MgCl ₂	3 μl
	Праймери (табл. 2)	25 pmol кожного
	Taq полімераза	1,5 unit
	ДНК (> 0,2 μg)	10 μl
	H ₂ O (стерильна)	Довести об'єм до 50 μl

Таблиця 2

Олігонуклеотидні праймери, що їх використовували для ПЛР

Гени та локуси, що ампліфікуються	Послідовності праймерів (5' – 3')	Розмір фрагменту, п.н.	Посилання
<i>TNF-α-308</i>	AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT TCCTCCCTGCTCCGATCCG	107	[17]

Таблиця 3

Режими ампліфікації генних локусів

Назва гена	Етап	Температура, °C	Час	Кількість циклів
<i>TNF-α-308</i>	Денатурація	95	5 хв н.	35
	Денатурація	94	1 хв.	
	Віджиг	60	1 хв.	
	Синтез	72	2 хв.	
	Пролонгація синтезу	72	5 хв.	

Таблиця 4

Протокол суміші для рестрикційного аналізу

Гени та локуси, що ампліфікуються	Реагенти	Кількість	Розмір фрагментів	Посилання
<i>TNF-α-308</i>	10× Буфер Tango	1,25 μl	Генотип AA: 107 п.н. Генотип GG: 87 та 20 п.н. Генотип AG: 107, 87 та 20 п.н.	[17]
	Фермент NcoI	1 unit		
	H ₂ O (стерильна)	Довести об'єм до 2,5 μl		
	ДНК (продукт ампліфікації)	10 μl		

Для статистичного аналізу отриманих даних використовували стандартний метод χ^2 -квадрату (χ^2) та метод Odds ratio (OR) [1].

Дане дослідження було виконане у рамках Гранта Президента України для обдарованої молоді №5 за 2005 рік.

Результати досліджень та їх обговорення

При вивченні ролі гена *TNF-α* у патогенезі ПК шахтарів вугільних шахт ми зупинилися на поліморфізмі *TNF-α-308*G/A*, що спричинений заміною гуаніну (G) на аденін (A) у промоторі гена. Незважаючи на те, що цей поліморфізм було виявлено одним з перших, вплив його на патогенез захворювання вивчено недостатньо. Хоча саме ці алельні варіанти описано у літературі як можливі чинники ризику захворювання на ПК [17].

В результаті аналізу розповсюдженості алельних поліморфізмів гена *TNF-α* виявлено частоту мутантного алеля A серед хворих на ПК шахтарів, що становила 11,6%, тоді як у шахтарів з контрольної групи тільки 8% алелів мали заміну G>A у положенні -308. (рис. 2). Частка, що припадала на алель G, становила 88,4% у групі хворих на ПК, та 92% – у контрольній групі. Величина OR (OR=1,5; CI: 0,8–2,76) вказує на те, що відносний

ризик розвитку ПК у даному дослідженні корелює з частотою виявлення алеля A.

Частотне розподілення генотипів *TNF-α* представлено на рисунку 3. У групі хворих лише одна особа мала генотип *TNF-α-308*A/A* (0,9%), 24 (21,4%) – генотип *TNF-α-308*G/A*, а 87 осіб (77,7%) були носіями *TNF-α-308*G/G* генотипу. Для контрольної групи частоти зазначених генотипів становили відповідно 0%, 16% та 84%. При обчисленні результатів за методом χ^2 не було знайдено статистично вірогідної різниці у розподілі частот для жодного з перерахованих генотипів. Проте було виявлено асоціацію між генотипом *TNF-α-308*G/A* та ризиком розвитку ПК, що підтверджує величина OR=1,4, CI: 0,8–2,7.

В результаті проведеного дослідження було знайдено асоціацію між алелем A гена *TNF-α* і генотипом *TNF-α-308*G/A*, з одного боку, та підвищенням ризику розвитку ПК – з іншого. Спираючись на дані літератури [8, 15], що свідчать про значне підвищення секреції білкового продукту внаслідок заміни гуаніну на аденін у позиції -308 промотора гена *TNF-α*, можна зазначити, що збільшення кількості цитокіну *TNF-α* у легенях провокує проліферацію фіброзної тканини. Це припущення збігається з даними багатьох закордонних авторів щодо деяких захворювань бронхо-



Рис. 1. Електрофореграма продуктів рестрикції при аналізі поліморфізму гена *TNF-α* у позиції -308.

Примітка: Зразок 2 – *TNF-α-308*A/A*, зразки 1, 3–5, 7, 9, 11, 13, 14, 16 – *TNF-α-308*G/G*, зразки 6, 10, 12, 15 – *TNF-α-308*A/G*. М. – маркер молекулярної маси.



Рис. 2. Частота розповсюдження алелів А і G гена *TNF-α* у хворих на ПК та в контрольній групі.



Рис. 3. Розподіл поліморфних варіантів гена *TNF-α* у хворих на ПК та в контрольній групі.

легеневої системи, що супроводжуються збитковим розвитком фіброзу [6, 7, 10, 14, 16–19]. R.Nadif et al. було проведено обстеження шахтарів, що піддавалися впливу кремнієвого та вугільного пилу. Дослід-

ження показало збільшення вмісту *TNF-α* у бронхо-альвеолярній лаважній рідині, що корелювало з підвищенням ступеня розвитку легеневого фіброзу [10]. Підтвердженням цьому є роботи К.А.Кім та J.M.Pocher, які встановили підвищення концентрації *TNF-α* у шахтарів вугільних шахт, хворих на ПК, особливо – на його вузлову форму [7, 12]. Хоча *TNF-α* сам по собі не є хемотаксичним до нейтрофілів та макрофагів, проте він сприяє пил-індукованому запаленню шляхом індукції експресії хемокинів [6]. Тому, на підставі наших та зарубіжних досліджень [13, 16] можна стверджувати, що *TNF-α* має вплив на розвиток фіброзу легень. Ця інформація має бути врахована при подальших дослідженнях щодо визначення біомаркерів спадкової схильності до розвитку ПК.

Висновки

У результаті аналізу частот розповсюдження алелів А і G гена *TNF-α* виявлено підвищення ризику виникнення ПК у носіїв алеля А. Встановлено, що особи з генотипом *TNF-α-308*G/A* більш схильні до розвитку ПК від впливу вугільного пилу, ніж носії інших розглянутих генотипів. Результати дослідження можуть бути застосовані для виявлення групи ризику серед робітників вугільних шахт України, що сприятиме індивідуалізованому підходу до питань трудової орієнтації і профілактики професійних захворювань.

Література

1. Бабич П.Н., Лапач С.Н., Чубенко А.В. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение второе. Применение критерия хи-квадрат // Укр. мед. часопис. – 2003. – №2. – С. 138–144.
2. Горовенко Н.Г., Басанец А.В., Жураховская Н.В. Генетические исследования в профессиональной патологии // Журн. АМН України. – 2005. – Т.11, №2. – С. 346–360.
3. Brinkman B.M., Huizinga T.W., Breedveld F.C., Verweij C.L. Allele-specific quantification of TNF transcripts in rheumatoid arthritis // Hum. Genet. – 1996. – №97. – P. 813–818.
4. D'Alfonso S., Richiardi P.M. An intragenic polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNFα) chain-encoding gene // Immunogenetics. – 1996. – №44. – P. 321–322.
5. Hamann A., Mantzoros C., Vidal-Puig A., Flier J.S. Genetic variability in the TNF-alpha promoter is not asso-

ciated with type II diabetes mellitus (NIDDM) // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1995. – №211. – P. 833–839.

6. Kim K.A., Lim Y., Kim J.H. et al. Potential biomarker of coal workers' pneumoconiosis // Toxicol. Lett. – 1999. – №108. – P. 297–302.

7. Kim K.A., Cho Y.Y., Cho J.S. et al. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism in coal workers' pneumoconiosis // Mol. Cell Biochem. – 2002. – V.234–235, №1-2. – P. 205–209.

8. Kroeger K., Carville K., Abraham L. The -308 Tumor Necrosis Factor-alpha promoter polymorphism effects transcription // Mol. Immunol. – 1997. – №34. – P. 391–399.

9. Moffatt M.F., Cookson W. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma // Hum. Mol. Gen. – 1997. – №6. – P. 551–554.

10. Nadif R., Jedlicka A., Mintz M. et al. Effect of TNF and LTA polymorphisms on biological markers of response to oxidative stimuli in coal miners: a model of gene-environment interaction. Tumour necrosis factor and lymphotoxin alpha // J. Med. Genet. – 2003. – V.40, №2. – P. 96–103.

11. Nuntayanuwat S., Dharakul T., Chaowagul W., Songsivilai S. Polymorphism in the promoter region of tumor necrosis factor-alpha gene is associated with severe meloidosis//Hum. Immunol.- 1999.- №60.- P. 979-983.

12. Porcher J.M., Oberson D., Vieux N. et al. Evaluation of tumor necrosis factor-alpha (TNF) as an exposure or risk marker in three French coal mining regions//Exp. Lung Res.- 1994.- V.20, №5.- P. 433-443.

13. Schins R.P., Borm P.J. Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors are increased in coal miners with pneumoconiosis//Eur. Respir. J.- 1995.- V.8, №10.- P. 1658-1663.

14. Vanhee D., Molet S., Gosset P. et al. Expression of leucocyte-endothelial adhesion molecules is limited to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the lung of pneumoconiotic patients: role of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)//Clin. Exp. Immunol.- 1996.- V.106, №3.- P. 541-548.

15. Wilson A.G., Symons J.A., McDowell T.L. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis

factor alpha promoter on transcriptional activation//Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1997.- №94.- P. 3195-3199.

16. Yucesoy B., Vallyathan V., Landsittel D.P. et al. Cytokine polymorphisms in silicosis and other pneumoconioses//Mol. Cell Biochem.- 2002.- V.234-235, №1-2.- P. 219-224.

17. Yucesoy B., Van Vallyathan, Douglas P. et al. Association of Tumor Necrosis Factor-alpha and Interleukin-1 Gene Polymorphisms with Silicosis//Toxicol. Appl. Pharmacol.- 2001.- №173.- P. 75-82.

18. Zhai R., Jetten M., Schins R.P.F. et al. Polymorphisms in promoter of the tumor necrosis factor gene in coal miners//Am. J. Ind. Med.- 1998.- №34.- P. 318-324.

19. Zhai R., Liu G., Ge X. et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin 6 (IL-6), and their soluble receptors in coal workers' pneumoconiosis//Respir. Med.- 2002.- V.96, №10.- P. 829-34.

Горovenko Н.Г.², Жураховская Н.В.^{1,2}, Басанец А.В.¹, Подольская С.В.²

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *TNF-α-308*G/A*, КАК БИОМАРКЕР РИСКА РАЗВИТИЯ ПНЕВМОКОНИОЗА У ШАХТЕРОВ УГОЛЬНЫХ ШАХТ

¹Институт медицины труда АМН Украины, г. Киев

²Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л.Шупика, г. Киев

Пневмокониоз (ПК) является одним из наиболее распространенных мультифакториальных заболеваний в профессиональной патологии и требует новых подходов к профилактике и изучению механизмов патогенеза. Определение биомаркеров наследственной предрасположенности к ПК позволит определить группу риска среди работающих и своевременно оказать им необходимую медицинскую помощь. Одним из возможных биомаркеров наследственной предрасположенности к развитию пневмокониоза от воздействия угольной пыли является полиморфизм гена фактора некроза опухолей *TNF-α-308*G/A*.

Аллельный полиморфизм гена *TNF-α* был изучен у 138 здоровых (контрольная группа) и 112 больных пневмокониозом шахтеров со стажем работы под землей не менее 10 лет. Наличие аллелей определялось с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов.

Частота выявления аллеля *TNF-α-308*A* в группе здоровых шахтеров составляла 8%, а в группе больных ПК – 11,6%. Величина OR=1,5 (CI: 0,8–2,76) указывала на повышение риска развития ПК у носителей аллеля А. Для аллеля G значительных отличий в частоте распределения между обследованными группами обнаружено не было. Разница между частотами генотипов по гену *TNF-α* в группе больных ПК и контрольной группе была обнаружена лишь для генотипа *TNF-α-308*G/A* (OR=1,4, CI: 0,8–2,7).

В результате проведенной работы установлено, что наличие аллеля *TNF-α-308*A* и генотипа *TNF-α-308*G/A* является фактором риска возникновения ПК у шахтеров угольных шахт Украины.

Ключевые слова: биомаркер, пневмокониоз, фактор некроза опухолей

Gorovenko N.G.², Zhurakhivska N.V.^{1,2}, Basanets A.V.¹, Podolska S.V.²

GENETIC POLYMORPHISM OF *TNF-α-308*G/A*, AS A BIOMARKER OF PNEUMOCONIOSIS RISK DEVELOPMENT IN COAL MINERS

¹Institute for Occupational Health of AMS of Ukraine, Kyiv

²National Medical Academy for Post-Graduate Education named after P.L. Shupyk of MH of Ukraine, Kyiv

Coal Workers Pneumoconiosis (CWP) is one of the most widespread multifactorial diseases in occupational pathology. It requires new approaches to prophylaxis and studying the mechanisms of pathogenesis. Determination of inherited predisposition biomarkers to CWP can allow to define a risk group among workers and to provide them with the necessary medical

care. One of possible biomarkers of inherited predisposition to CWP development is a gene tumor necrosis factor alpha (*TNF- α -308*G/A*) polymorphism.

TNF- α alleles polymorphism was studied in 138 healthy subjects (control group) and 112 CWP patients with minimum 10 years of underground work experience. The presence of alleles was analyzed by PCR method and restriction fragment-length polymorphism (RFLP).

The frequency of *TNF- α -308*A* allele in the control group was 8 %, and in the group of CWP patients – 11,6 %. The value of OR=1,5 (CI: 0,8–2,76) specified the increase of risk of CWP development for carriers of the allele A. The frequency of G allele in healthy miners was not significantly different from patients with CWP. The significant differences of frequencies in *TNF- α* genotypes in the controls and in the CWP patients groups were obtained only for *TNF- α -308*G/A* (OR =1,4, CI: 0,8–2,7).

The results indicate that the presence of the *TNF- α -308*A* allele and the *TNF- α -308*G/A* genotype can be a risk factor for development of CWP in Ukrainian coal miners.

Key words: biomarker, coal worker pneumoconiosis, tumor necrosis factor

Надійшла: 03.04.2007

Контактна особа: Журахівська Наталія Веніамінівна, м.н.с., відділ професійної патології Інституту медицини праці АМН України, кафедра медичної генетики Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, 04108 м. Київ, проспект Свободи 2-А, кв. 78, тел.: (044) 205-48-13, (044) 284-34-37, 8 (067) 405-61-94, e-mail: nvverkhola@ua