

УДК 575.1

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА TNF-A G-308A С АКТИВНОСТЬЮ ЦИТОКИНА TNFA У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА, ПРОЖИВАЮЩИХ В САМАРКАНДСКОЙ ОБЛАСТИ

Райимова Ф.С., Душанова Г.А., Кан С.В.

*Самаркандский государственный университет имени Шарофа Рашидова, Самарканд,
e-mail: gavhar_1969@mail.ru*

Целью настоящего исследования является изучение взаимосвязи полиморфизма гена TNF-A -308G/A с уровнем экспрессии цитокина TNF α у больных сахарным диабетом 1-го типа, проживающих в Самаркандской области. Методом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов с использованием аллельспецифических праймеров исследован полиморфизм гена TNF-A -308G/A во взаимосвязи с уровнем концентрации цитокина TNF α у больных сахарным диабетом 1-го типа и здоровых лиц, не имеющих в анамнезе сахарного диабета 1-го типа. При изучении особенностей распределения генотипов GG и GA выявлена достоверная разница в частоте встречаемости по сравнению с контрольной группой. Анализ сравнения генотипов полиморфизма TNF α -308G/A в различных возрастных группах показал, что частота заболеваемости сахарным диабетом 1-го типа увеличивается у лиц в возрасте старше 10 лет с генотипами GG GA. Обнаружены высокие концентрации цитокина TNF α у больных сахарным диабетом 1-го типа в исследованной группе в зависимости от половых различий. Лица женского пола имеют высокие риски развития аутоиммунного СД 1-го типа. Концентрация TNF α увеличивается у лиц с гетерозиготным генотипом GA, можно сделать предположение об изменении экспрессии с заменой однонуклеотидного полиморфизма в интронной части исследованного гена. Таким образом, ген TNF α -308G/A с показателями цитокина TNF α доказывают вовлеченность иммунных реакций в патогенез СД 1-го типа.

Ключевые слова: цитокин, TNF α , генотип, аллель, аутоиммунитет

THE RELATIONSHIP OF THE TNF-A GENE POLYMORPHISM G-308A WITH THE ACTIVITY OF THE TNFA CYTOKINE IN PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS LIVING IN THE SAMARKAND REGION

Rayimova F.S., Dushanova G.A., Kan S.V.

*Samarkand State University named after Sharof Rashidov, Samarkand,
e-mail: gavhar_1969@mail.ru*

The aim of this study is to investigate the relationship of the TNF-A gene polymorphism -308G / A with the level of expression of the cytokine TNF α in patients with type 1 diabetes mellitus living in the Samarkand region. Using the restriction fragment length polymorphism method using allele-specific primers, the TNF-A gene polymorphism -308G / A was studied in relation to the level of TNF α cytokine concentration in patients with type 1 diabetes mellitus and healthy individuals without a history of type 1 diabetes mellitus. In the study of the distribution features of the GG and GA genotypes, a reliable difference in the frequency of occurrence compared to the control group was revealed. Analysis of the comparison of the genotypes of the TNF α -308G / A polymorphism in different age groups showed that the incidence of type 1 diabetes mellitus increases in individuals over 10 years of age with the GG GA genotypes. High concentrations of cytokine TNF α were found in patients with type 1 diabetes mellitus in the studied group, depending on gender differences. Females have high risks of developing autoimmune nature of type 1 diabetes. The concentration of TNF α increases in individuals with heterozygous genotype GA, it can be assumed about a change in expression with the replacement of single nucleotide polymorphism in the intron part of the studied gene. Thus, the TNF α gene -308G / A with TNF α cytokine indicators prove the involvement of immune reactions in the pathogenesis of type 1 diabetes.

Keywords: cytokine, TNF α , genotype, allele, autoimmunity

Введение

В аутоиммунной природе сахарного диабета 1-го типа (СД1) цитокины играют важную роль в поддержании иммунных реакций, дисбаланс которых могут вызывать нарушения β -клеток островков Лангерганса. Известно, что провоспалительные цитокины участвуют в процессах восстановления, активации и пролиферации β -клеток, поддерживают жизнеспособность клеток поджелудочной железы.

Фактор некроза опухоли TNF α (*tumor necrosis factor*) участвует в воспалительных реакциях на системном и локальном уровнях, играет ключевую роль в патогенезе системных заболеваний [1].

Кроме того, TNF α при нормальных количествах поддерживает такие гомеостатические функции клеток, как клеточная пролиферация и апоптоз, запускает липидные медиаторы эпителия сосудов, тем самым вызывает инфильтрацию иммунных кле-

ток с помощью адгезии лейкоцитов. Повышение уровня в плазме TNF α , опосредуя клетками иммунной системы, играет фундаментальную роль в разрушении клеток поджелудочной железы, что может являться фактором риска в патогенезе сахарного диабета, нарушения липидного обмена, что может быть причиной ожирения и возникновения воспалительных процессов.

Актуально исследование связи полиморфизма генов, аллелей и генотипов SNV, которые могут влиять на их функциональное состояние, влияющие на экспрессию белковых молекул при различных патологических состояниях. Исследования полиморфизма генов сахарного диабета 1 и 2 типа показывают предрасположенность в генотипе статистических данных, исследования полиморфизмов TNF α 2308 AA и TNF α 2308 A у египетских пациентов выявили взаимосвязи с СД1. Также изучены полиморфизмы -308 G/A TNF α в иранских и саудовских популяциях [2, 3].

Проведенные исследования показывают высокий уровень циркулирующего TNF α – в три-четыре раза выше у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа, также в прогрессировании диабетической нефропатии имел место полиморфизм аллель С TNF α – 10 31 T/C. У больных диабетической стопой с генотипом СС по сравнению с больными с генотипом ТТ выявлено повышение уровня TNF α в сыворотке крови [4].

Изучение молекулярно-генетических особенностей функциональной области последовательностей промотора гена TNF- α G-308A в иорданской популяции показало влияние функциональной области на уровень сахара в крови у больных с сахарным диабетом 2-го типа. У лиц с генотипом -308GG с высоким уровнем TNF α , больных сахарным диабетом 2-го типа, выявлены изменения концентрации сахара в крови и резистентность к инсулину [5].

Целью настоящего исследования является изучение взаимосвязи полиморфизма гена TNF-A -308G/A с активностью цитокина TNF α у больных СД 1-го типа, проживающих в Самаркандской области.

Материалы и методы исследования

Настоящее исследование основывается на результатах наблюдения за пациентами с сахарным диабетом 1-го типа, проведенного в отделении диагностики Самаркандского областного центра эндокринологии. Контроль и непосредственную консультативную, научную и методическую помощь оказывал заведующий отделением А.Э. Кадыров.

В исследование были включены пациенты, подписавшие добровольное информиро-

ванное согласие на участие в соответствии с Хельсинкской декларацией. Были включены 64 пациента с сахарным диабетом 1-го типа, из них 41 женщина – 70% и 23 мужчины – 30%. В группу исследования были включены пациенты, зарегистрированные в эндокринологическом центре, в возрасте от 7 до 40 лет. Контрольную группу составили 198 относительно здоровых лиц, не имеющих в анамнезе СД 1-го типа.

Выделение ДНК

Для выделения ДНК был использован метод лизиса клеток крови путем двойного центрифугирования объема цельной крови в буфере RCLB (Redcelllysisbuffer – эритроцитарный лизирующий буфер) при скорости 1500 об/мин.

Проведение метода полиморфизма длины рестрикционных фрагментов – ПДРФ

Для амплификации полиморфного участка гена TNF-A -308G/A исследованной популяции использовали метод полимеразной цепной реакции с аллельспецифичными праймерами TNF-A-308G/A:

forward 5'-GACAAGCCTGTAGCCCATGT-3',
reverse 5'-GGAGGTTGACCTTGGTCTGG-3'.

Концентрацию цитокина определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов ЗАО «Вектор Бест» в диапазоне концентраций для TNF- α пг/мл.

Полученные данные обрабатывали с помощью программного пакета GraphPad-Prism 10, включая использование встроенных функций статистической обработки.

Результаты исследования и их обсуждение

Ген TNF α кодирует многофункциональный белок, который принимает участие в провоспалительных процессах. В основном секретируется макрофагами, функционирует через рецепторы TNFRSF1A/TNFR1 и TNFRSF1B/TNFR2. TNF α участвует в процессах регуляции, пролиферации и дифференцировки клеток, апоптоза, в патологиях, связанных с аутоиммунными заболеваниями. Широко изучены несколько вариантов гена, в том числе TNFA: -238G/A -308G/A, которые способствуют повышению или снижению продукции цитокина.

Исследования полиморфизма аллелей и генотипов маркеров гена TNF α -308G/A в группе больных СД 1-го типа по сравнению с контрольной группой показали высокие показатели частоты аллеля А в группе больных с СД 1-го типа по сравнению с группой контроля (табл. 1).

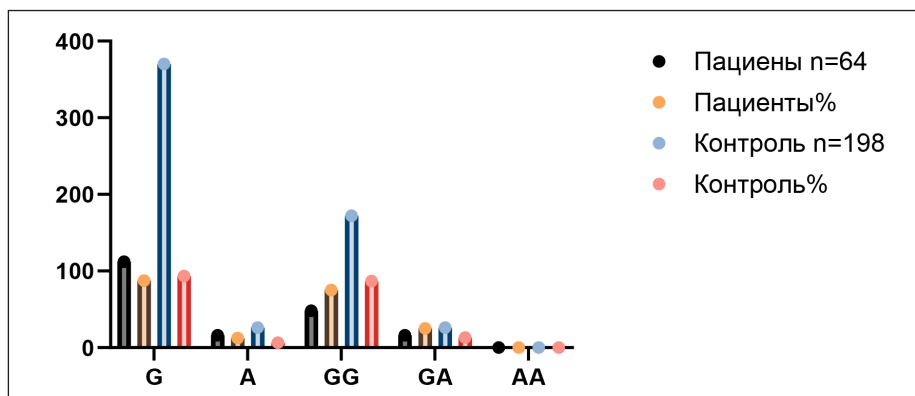


Рис. 1. Сравнительная характеристика частот аллелей и генотипов гена *TNF-A -308G/A* у больных с СД 1-го типа

Таблица 1

Взаимосвязь аллелей и генотипов гена *TNF-A -308G/A* у больных с СД 1-го типа

Генотип	χ^2	RR (95% CI)
G	$p = 0,0321$	0,53 (0,25–0,95)
A	$p = 0,0242$	2,05 (1,54–3,89)
GG	$p = 0,0211$	0,45 (0,28–0,92)
GA	$p = 0,0212$	2,21 (1,86–4,45)

Примечание: χ^2 – показатель достоверности по Пирсону; RR – относительный риск.

Исследования показателя аллеля G свидетельствуют о низких показателях по сравнению с контрольной группой (рис. 1).

При изучении особенностей распределения генотипа GG выявлена достоверная разница в исследованной группе с СД 1-го типа по сравнению с контролем (табл. 1, рис. 1). Анализ гетерозиготного генотипа GA также свидетельствует о различиях между исследованной группой с СД 1-го типа по сравнению с контрольной группой

(рис. 1), различий при анализе гомозиготного генотипа AA не было выявлено.

Таким образом, анализ распределения аллелей и частот распределения гена – 308(G/A) *TNF* у лиц с СД 1-го типа, проживающих в Самаркандской области, свидетельствует о значительном вкладе в предрасположенность к заболеванию, является существенным фактором прогноза у больных с СД 1-го типа, узбекской популяции, проживающих в г. Самарканде.

При сравнении анализа генотипов полиморфизма *TNF α -308G/A* с различными возрастными группами пациентов с СД1 (табл. 2) у больных с СД 1-го типа, имеющих генотип GG, статистически значимые различия имели лица старше 10 лет ($p \leq 0,0001$). У лиц с генотипом GG 7–10 и ≥ 15 лет в возрастных подгруппах статистически значимых различий не выявлено. Также среди лиц с генотипом GA подростки старше 10 лет имели статистически значимую разницу ($p \leq 0,0001$) по сравнению с другими возрастными подгруппами.

Таблица 2

TNF α -308G/A генотипы у детей возрастных групп

Генотипы	Частоты (%)	RR (95% CI)	P-value*
GG			
7–10 лет	6/48 (12,5%)	0,81 (0,21–2,54)	0,91
10–15 лет	8/48 (16,6%)		
≥ 10 лет	4/48 (8,33%)	0,22 (0,19–0,28)	$\leq 0,0001$
≥ 15 лет	28/48 (58,33%)		
GA			
7–10 лет	3/16 (18,75%)	0,81 (0,38–1,74)	0,81
10–15 лет	4/16 (25%)		
≥ 10 лет	2/16 (12,5%)	0,24 (0,15–0,38)	$\leq 0,0001$
≥ 15 лет	9/16 (56,25%)		

Для изучения особенностей развития СД 1-го типа были исследованы показатели TNF- α у лиц СД 1-го типа. Проведенные исследования свидетельствуют о высоком уровне (TNF- α) у лиц с СД 1-го типа по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$) (рис. 2).

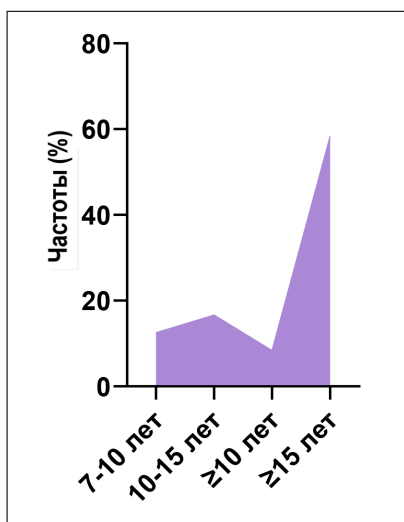


Рис. 2. Уровень провоспалительных цитокинов TNF α при СД 1-го типа

У больных с СД 1-го типа концентрация TNF- α в периферической крови составила $56,7 \pm 4,8$ пг/мл, в контрольной группе – $16,3 \pm 1,76$ пг/мл.

TNF α участвует в системном воспалении, уровни TNF α в плазме связаны с различными факторами риска диабета [6]. Он играет фундаментальную роль в разрушении бета-клеток, опосредованном иммунными клетками, потому достоверно ($p < 0,05$) высокое содержание его у больных с СД 1-го типа ($56,7 \pm 4,8$ пг/мл) говорит о преобладании в патогенезе СД 1-го типа иммуноопосредованного деструктивного процесса в бета-клетках [7, 8].

Была проведена сравнительная характеристика уровня показателей активности цитокинов TNF α у пациентов с СД 1-го типа, проживающих в Самаркандской области, с генотипами GG, GA гена TNF α -308G/A в общей популяции. Данные представлены в табл. 3. Отмечается, что уровень показателей активности цитокинов TNF α у пациентов с СД 1-го типа Самаркандской области в зависимости от полиморфизма TNF α -308G/A, с генотипом GG и GA наблюдается увеличение количества TNF α пг/мл ($55,3 \pm 5,6$, $58,1 \pm 4,4$, $16,3 \pm 1,76$, $p \leq 0,001$) высокие концентрации которых обнаружены у лиц с генотипом GA. Таким образом, гетерозиготный генотип GA вносит значительный

вклад в развитие аутоиммунного сахарного диабета 1-го типа.

По представленным в табл. 3 и на рис. 3 данным, лица общей популяции с СД 1-го типа гена TNF α -308G/A с генотипами GG $n = 27$ имели высокие концентрации TNF α пг/мл по сравнению с контрольной группой.

Анализ половых различий уровня цитокинов TNF α в зависимости от генотипов TNF α -308G/A у женщин представлен в табл. 3 и на рис. 3, где отмечается, что у женщин с генотипами гена TNF α -308G/A GG и GA наблюдалось увеличение количества цитокинов ($55,1 \pm 5,6$, $57,1 \pm 4,4$, $16,3 \pm 1,76$, $p \leq 0,001$) по сравнению с контрольной группой.

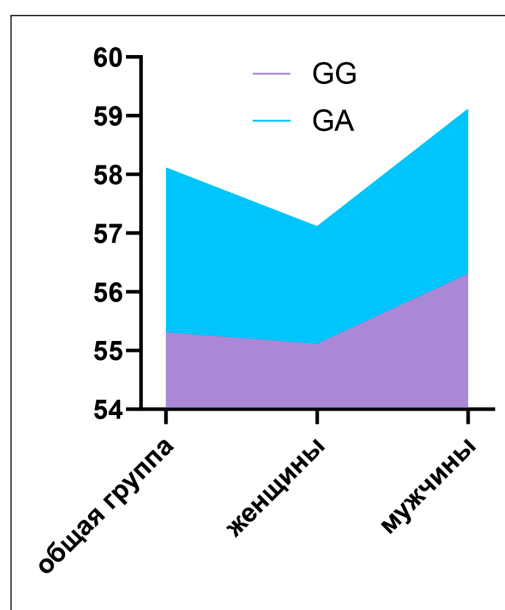


Рис. 3. Уровень TNF α в зависимости от половых различий

Анализ содержания цитокинов TNF α у мужчин с СД 1-го типа Самаркандской области полиморфизма гена TNF α -308G/A у лиц мужского пола (табл. 3) показал, что у лиц с генотипами GG и GA полиморфизма гена TNF α -308G/A отмечаются высокие показатели TNF α по сравнению с контролем ($56,3 \pm 5,6$, $59,1 \pm 4,4$, $16,3 \pm 1,76$, $p \leq 0,001$).

Исследования факторов начала заболевания в зависимости от генотипа GG, GA гена TNF α -308G/A показывают возраст начала заболевания от 7 лет, но существенно число заболевших СД1 типа увеличивается в популяции от 10 лет. Также анализ половых различий встречаемости заболевания СД 1-го типа показал, что в популяции обследованных СД 1-го типа зарегистрировано начало болезни у лиц женского пола, то есть у девочек 7 лет.

Таблица 3

Уровень показателей активности цитокинов TNF α
у женщин и мужчин СД 1-го типа Самаркандской области

Генотип	TNF α пг/мл общая группа n = 64	TNF α пг/мл Женщины n = 41	TNF α пг/мл Мужчины n = 23	Контроль n = 198
GG	55,3 \pm 5,6*** n = 48	55,1 \pm 5,6*** n = 23	56,3 \pm 5,6*** n = 11	16,3 \pm 1,76
GA	58,1 \pm 4,4*** n = 16	57,1 \pm 4,4*** n = 14	59,1 \pm 4,4*** n = 10	16,3 \pm 1,76

Примечание. Достоверность разницы между исследованной группой и контролем ($p \leq 0,001$).

Заключение

Анализ показателей взаимосвязи между изученными цитокинами показал увеличение концентрации цитокина при СД 1-го типа. Лица с генотипами GG, GA имели высокие концентрации TNF α , гетерозиготный генотип GA независимо от половых различий имели высокие концентрации данного цитокина. Данная ситуация свидетельствует об изменении концентрации в зависимости от замены аллеля A. Полная замена на гомозиготный AA генотип может свидетельствовать о развитии прогрессирующего аутоиммунного СД 1-го типа. Таким образом, ген TNF α -308G/A с показателями цитокина TNF α свидетельствует о вовлеченности иммунных реакций в патогенез СД 1-го типа. Лица женского пола имеют высокие риски развития аутоиммунного СД 1-го типа.

Список литературы

1. Buckner T., Johnson R.K., Vanderlinden L.A., Carry P.M., Romero A., Onengut-Gumuscu S., Chen W.M., Fiehn O., Frohnert B.I., Crume T., Perng W., Kechris K., Rewers M., Rewers M., And Norris J.M. An Oxylin-Related Nutrient Pattern and Risk of Type 1 Diabetes in the Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY) // *Nutrients*. 2023. Vol. 15, Is. 4. P. 2–16. DOI: 10.3390/nu15040945.
2. Jang D.I., Lee A.H., Shin H.Y., Song H.R., Park J.H., Kang T.B., Lee S.R., Yang S.H. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, Is. 5. DOI: 10.3390/ijms22052719.
3. Haber J.Fd.S., Sandra Maria Barbalho S.M., Jose Augusto Sgarbi J.A., Haber R.Sd.A., de Labio R.W., Laurindo L.F., Eduardo Chagas E.F.B., and Payao S.L.M. The Relationship between Type 1 Diabetes Mellitus, TNF- α , and IL-10 Gene Expression // *Biomedicines*. 2023. Vol. 11, Is. 4. DOI: 10.3390/biomedicines11041120.
4. Overgaard A.J., Madsen J.O.B., Pociot F., Johannesen J., Størling J. Systemic TNF α correlates with residual β -cell function in children and adolescents newly diagnosed with type 1 diabetes // *BMC Pediatric*. 2020. Vol. 20. DOI: 10.1186/s12887-020-02339-8.
5. Saeed Majeed H.M., Hassan Abbas A.A., Khudair M.S.H. The role of TNF α in type2 diabetes mellitus // *Bionatura*. Vol. 7, Is. 2/32. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.revistabionatura.com> (дата обращения: 10.07.2024). DOI: 10.21931/RB/2022.07.02.32.
6. Muthuraman N., Abraham P. Serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and lipid profile in gestational diabetes mellitus // *JOGC*. 2024. Vol. 46, Is. 8. DOI: 10.1016/j.jogc.2024.102592.
7. Emar M., El-Edel R., Fathy W.M., Aboelkhair N.T., Watany M.M., Abou-Elela D.H. Study the association of tumor necrosis factor promoter polymorphism with Type 2 diabetic nephropathy // *Mediators of Inflammation*. 2020. DOI: 10.1155/2020/1498278 eCollection 2020.
8. Райимова Ф.С., Душанова Г.А., Кан С.В., Камалов З.С., Рузубакиева М.Р. Связь полиморфизма генов VDR и TNF с развитием сахарного диабета 1 типа // *Журнал теоретической и клинической медицины*. 2023. № 4. С. 122–126.