

УДК: 616.345-002:616-078.7

РОЗПОДІЛ ТА ЧАСТОТА АЛЕЛЕЙ ГЕНА DQA1 У ХВОРИХ НА ЗАПАЛЬНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ТОВСТОЇ КИШКИ

О.І. Терпиляк, М.Р. Лозинська, Ю.С. Лозинський,
О.Р. Яремцьо

*Інститут спадкової патології АМН України (Львів)
Львівський національний медичний університет
ім.Данила Галицького*

Вступ

Не дивлячись на значний прогрес у розумінні запальних захворювань товстої кишки (ЗЗТК), при яких спостерігається ідіопатичне, пожиттєве, хронічне деструктивне запалення товстої кишки чи всього шлунково-кишкового тракту, до цього часу етіологія цих захворювань залишається невідомою, а патогенез не повністю зрозумілий [1]. Встановлена низка фактів, що свідчать про участь генетичних механізмів у їх генезі. ЗЗТК - неспецифічний виразковий коліт (НВК) і хвороба Крона (ХК) є моделлю генетичної гетерогенності. До цього часу не відомо, чи це єдина хвороба, але з різною симптоматикою, чи ні. Можливо існує декілька форм захворювань, які залежать від генетичних локусів [2]. Генетичних маркерів, які б були однозначно патогномонічними для хронічних ЗЗТК, до цих пір не виявлено.

ЗЗТК відносяться до автоімунних захворювань із важкими симптомами. Питання про контроль автоімунних реакцій на генетичному рівні є дуже важливим для вивчення патологічних процесів схильності та розвитку автоімунності, а також можливості проводити точнішу діагностику з метою коректного лікування. Поки що не виявлено конкретного гена (чи групи генів), які безпосередньо відповідають за розвиток автоімунної патології. Проте, можна говорити про асоціації певних генів із захворюванням. Зокрема, широко вивчена асоціація

Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології

автоімунних захворювань з генами головного комплексу гістосумісності (HLA). Показано, що в представників кавказької раси схильність до автоімунних захворювань асоціюється з HLA-DRB1*0301, DQA1*0501, DQB1*0201, а у азійської раси - з генами DRB1*0405, DQA1*03, DQB1*0401 [3]. Відомі конкретні алелі варіантів генів II класу HLA-системи, що свідчить про асоціативні зв'язки цих генів з автоімунними захворюваннями [4, 5, 6]. В літературі описана асоціація з автоімунними захворюваннями генів субрегіону DQ II класу HLA-системи. Субрегіон DQ генів складається з двох локусів: DQA1/DQB1 та DQA2/DQB2 [7]. Вважають, що саме локус DQA1/DQB1 бере участь в імуносупресивних шляхах та збереженні толерантності [8], а з автоімунними порушеннями пов'язаний ген DQA1. Ген DQA1 має 8 алелей: *0601, *0501, *0401, *0301, *0201, *0101, *0102, *0103. Регуляторні послідовності алелей гена (W-, X-, та Y-цисактиватори) внаслідок високого поліморфізму володіють різною здатністю приєднувати транскрипційні фактори, внаслідок чого і регулюється експресія гена. Залежно від алельних комбінацій гена DQA1 проявляється те, чи інше автоімунне захворювання. Для кожного типу автоімунного захворювання характерний свій домінуючий алельний варіант гена DQA1. При ЗЗТК встановлені асоціативні зв'язки HLA-антигенів. Вони відрізняються між конкретними нозологіями (НВК та ХК) та етнічними групами, а також можуть визначати розвиток захворювання та ускладнень, особливо позакишкову маніфестацію [9]. Так, в японській популяції ХК асоціюється з алеллю DQB1*04, а протекторну роль відіграє алель DQA1*0102 [10]. Проведено дослідження асоціативних зв'язків HLA-антигенів II-го класу з ХК та НВК серед єврейсько-ашкеназі [11]. Встановлено, що при ХК підвищеною частотою володіє алель DRB1*0103, а при НВК спостерігалася значно вища частота незвичайного для цієї популяції гаплотипу DRB1*0103-DQA1*0501-DQB1*0301 та, в дещо меншій мірі, більш характерного DRB1*0103-DQA1*0101-DQB1*0501. Отже, існують різні механізми формування патології, зокрема автоімунної, із залученням можливих імуногенетичних мар-

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики

керів. Імуноопосередковані порушення включають різноманітні пошкодження гуморального та клітинного імунітету і генералізацію підвищеної реактивності проти бактеріальних антигенів товстої кишки. Виходячи з того, що імунологічна індивідуальність організму і, відповідно, схильність до того чи іншого захворювання зумовлена головним комплексом гістосумісності, важливим є визначення ролі HLA-AG та їх позитивних чи негативних асоціацій у схильності до виникнення ЗЗТК.

Метою роботи є вивчити розподіл та частоту алелей гена DQA1 у хворих на запальні захворювання товстої кишки.

Матеріали й методи дослідження

Обстежено 20 хворих на ЗЗТК, з них у 16 діагностовано НВК (вік пацієнтів від 22 до 65 років; мужчин - 9, жінок - 7), у 4 - хворобу Крона (вік пацієнтів від 34 до 50 років; мужчин було - 2, жінок - 2) та 45 осіб контрольної групи (віком - від 22 до 49 років; мужчин - 25, жінок - 20). У всіх пацієнтів було діагностовано НВК та хворобу Крона з використанням клінічного, морфологічного та ендоскопічного методів дослідження на базі кафедри хірургічних хвороб з курсом проктології. У роботі використано також молекулярно-генетичний та статистичний методи.

Матеріалом для дослідження була ДНК, виділена з ядерних клітин периферійної крові методом висолювання. Типування алелей гена DQA1 II-го класу головного комплексу гістосумісності людини проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у ДНК, отриманій з ядерних клітин крові. Відомо вісім алелей цього гена, тобто у кожного індивіда наявні дві алелі з восьми можливих. Першим етапом типування була ампліфікація цілої ділянки гена, в результаті якої синтезується специфічний фрагмент величиною 216 п.н. Даний фрагмент є матрицею для постановки наступних ПЛР і типування алелей. Для виявлення кожної із алелей проводилася ампліфікація із праймерами, гомологічними певній алелі. Наявність тих чи інших продуктів ампліфікації відповідної величини дозволяє встановити генотип. Продукти ПЛР розділяють шляхом електрофорезу у 3% агарозному гелі та візуалізуються на УФ-

трансліюмінаторі. Використовували набори реагентів фірми "ДНК-технологія" (м. Москва, Росія).

Отримані результати та їх обговорення

Вивчено розподіл та частоту алелей гена DQA1 у групі 20 пацієнтів із запальними захворюваннями товстої кишки та 45 осіб контрольної групи. Проведено типування наступних алелей гена DQA1: *0101, *0102, *0103, *0201, *0301, *0401, *0501, *0601. Як свідчать результати, наведені в табл. 1, найбільш поширеними алелями гена DQA1 у контрольній групі є алелі *0501, *0101, *0102, *0201 та *0103. Частота цих алелей становить відповідно 28,9%, 22,2%, 17,8%, 15,6% і 10% з розрахунку на 90 алелей. Алелі *0301 та *0401 характеризуються пониженою частотою (4,4% і 1,1% відповідно), а алель *0601 взагалі відсутня в осіб контрольної групи. Виявлено, що найбільш поширеними у групі пацієнтів зі ЗЗТК є алелі *0501 (35,0%), *0101 (15,0%), *0301 (15,0%), *0102 (12,5%) та *0103 (12,5%) з розрахунку на 40 алелей. Зі значно нижчою частотою траплялися алелі *0201 (5,0%) та алель *0401 (2,5%).

Таблиця 1

Розподіл та частота алелей гена DQA1 у групі хворих на запальні захворювання товстої кишки

Алелі гена DQA1	Контрольна група (n=45, алелі=90)		Група хворих на запальні захворювання товстої кишки (n=20, алелі=40)	
	абсолютні значення	частота, %	абсолютні значення	частота, %
*0101	20	22,2	6	15
*0102	16	17,8	5	12,5
*0103	9	10	5	12,5
*0201	14	15,6	2	5
*0301	4	4,4	6	15
*0401	1	1,1	1	2,5
*0501	26	28,9	14	35
*0601	0	0	0	0

Згідно з результатами наведеними у табл. 1, найбільш поширеними алелями гена DQA1 у контрольній групі є алелі *0501, *0101, *0102, *0201 та *0103. Їх частота становить відповідно 28,9%, 22,2%, 17,8%, 15,6% і 10% з розрахунку на 90 алелей. Алелі *0301 та *0401 трапляються з низькою частотою (4,4% і 1,1% відповідно), а алель *0601 - взагалі відсутня у контрольній групі. У групі пацієнтів із ЗЗТК найбільш поширеними є алелі *0501 (35%), *0101 (15%), *0301 (15%), *0102 (12,5%) та *0103 (12,5%) із розрахунку на 40 алелей. Зі значно нижчою частотою трапляються алелі *0201 (5%), та *0401 (2,5%).

Порівнюючи результати дослідження двох груп (табл. 1) можна відзначити як подібні, так і відмінні особливості. У контрольній і дослідній групі хворих із ЗЗТК алелі *0501, *0101, *0102 та *0103 належали до найбільш поширених, хоча їхні частоти дещо відрізняються. Розподіл алелей *0201 та *0301 у цих групах є протилежним: алель *0201 належить до найбільш частих у контрольній групі (15,6%) та найменш поширених у групі хворих на ЗЗТК (5,0%), а алель *0301, характеризується високою частотою у групі хворих на ЗЗТК (15,0%) та суттєво нижчою - у контрольній групі (4,4%). Алель *0401 володіє низькою частотою як в контрольній групі (1,1%), так і в групі хворих із ЗЗТК (2,5%), а алель *0601 відсутня в обох групах.

Було вивчено асоціації виявлених DQA1-алелей та проведено порівняльне дослідження частот алелей дослідної та контрольної груп. У результаті статистичних розрахунків показано, що в групі хворих на ЗЗТК виявлено вірогідно вищу частоту алелі гена DQA1*0301 порівняно з контрольною групою ($\chi^2=4,34$, $p<0.05$). Отримані результати, які торкаються перевірки незалежності рядів алелей гена DQA1 у пацієнтів із запальними захворюваннями товстої кишки, наведені в таблиці 2.

Отже, лише алель гена DQA1*0301 характеризувалася позитивною асоціацією в групі хворих на ЗЗТК. Тому її можна віднести до групи алелей "агресорів".

Таблиця 2

Перевірка незалежності рядів алелей гена DQA1 контрольної групи та групи пацієнтів зі запальними захворюваннями товстої кишки

Алелі гена DQA1	Контрольна група, n=45, алелі=90	Група хворих, n=20, алелі=40	χ^2	P
	абс.	абс.		
*0101	20	6	0,9	>0,05
*0102	16	5	0,6	>0,05
*0103	9	5	0,2	>0,05
*0201	14	2	2,9	>0,05
*0301	4	6	4,34	<0,05
*0401	1	1	0,4	>0,05
*0501	26	14	0,5	>0,05
*0601	0	0	-	-

Силу асоціації алелі DQA1*0301 встановлено шляхом визначення показника відносного ризику (RR) та етіологічної фракції (EF). Біологічний зміст показника RR полягає у визначенні ризику розвитку захворювання у носіїв антигена порівняно з індивідами, котрі не несуть цей антиген. Значення RR=1 вказує на відсутність асоціації. Якщо RR>1, то це означає, що антиген частіше трапляється у хворих (позитивна асоціація), якщо RR<1 - це вказує на зниження частоти антигена у хворих (від'ємна асоціація). Показник RR>2 вважається значним. Етіологічна фракція (EF), виражена в частках одиниці, показує ту частину хворих, в яких захворювання пов'язане з наявністю одного HLA-антигена. Результати дослідження наведено в табл 3.

Як видно з результатів, наведених у табл. 3, значення показника відносного ризику RR підтверджує характер позитивної асоціації алелі DQA1*0301 із групою пацієнтів зі ЗЗТК та свідчить про її вагомий роль як алелі-"агресора". Цей висновок підтверджується значним показником етіологічної фракції EF.

Таблиця 3

Показник відносного ризику (RR) та етіологічної фракції (EF) для алелі-"агресора" DQA1*0301 у групі хворих на запальні захворювання товстої кишки

Алель-"агресор" гена DQA1	Величина відносного ризику (RR)	Етіологічна фракція (EF)
*0301	4,02	0,12

Висновки

1. У результаті проведеного дослідження можна стверджувати, що існує чітка позитивна асоціація між групою хворих на ЗЗТК та алеллю гена DQA1*0301 головного комплексу гістосумісності людини II-го класу.

2. Ця асоціація може свідчити про особливу роль алелі DQA1*0301 у схильності до виникнення цієї патології. Крім того, згідно з літературними повідомленнями, алель DQA1*0301 асоціюється з аутоімунними захворюваннями.

3. Отримані результати підтверджують положення, що аутоімунні порушення є вагомими складовими в патогенезі ЗЗТК.

Література

1. Screening for IBD susceptibility: Subclinical markers / J.F.Colombel, S. Joossens, P.Vandewalle [e.a.] // *Falk Symp. 122, IBD: A clinical Case Approach to Pathophysiology, Diagnosis and Treatment*, 2002. - P. 17 - 21.
2. Халиф И.Л. Воспалительные заболевания кишечника (неспецифический язвенный колит и болезнь Крона). Клиника, диагностика, лечение / И.Л.Халиф, И.Д. Лоранская. - М, 2004. - 88 с.
3. Reveille J.D. The genetic basis of autoantibody production / J.D.Reveille // *Autoimmunity Reviews*. - 2006. - Vol.5, № 6. - P. 389 - 398.
4. Assosiation of antiphosphatidylserine/protrombin autoantibodies with HLA class II genes / M.L.Bertolcini, T.Atsum, A.R.Caliz [e.a.] // *Arthritis & Rheumatism*. - 2000. - Vol.43, № 3. - P. 683 - 688.

5. Evaluation of fine mapping strategies for a multifactorial disease locus: systemic linkage and association analysis of IDDMI in the HLA region on chromosome 6p21 / M.Herr, F.Dudbridge, P.Zavattari [e.a.] // *Human Molecular Genetics*. - 2000. - Vol.9, № 9. - P. 1291 - 1301.

6. Cutting edge: persistent fetal microchimerism in T-lymphocytes is associated with DQA1*0501; implications iautoimmunity / N.S.Lambert, P.C.Evans, T.L.Hashizumi [e.a.] // *J. Immunol.* - 2000. - Vol. 164, №11. - P. 5545 - 5548.

7. Absence of in vivo DNA-protein interactions in the DQA2 and DQB2 promoter regions / P.Indovina, F.Megiorni, G.Fontemaggi [e.a.] // *Hum. Immunol.* - 2001. - Vol.62, № 5. - P. 504 - 508.

8. Cis-trans complementation of DQA1-DQB1 genes are modulated by DQ alleles: an immunogenetics analysis of DQ association with the down-regulatory function of CD8 cell in trichosanthin-induced immunosuppression / K.Y.Chou, S.L.Fu, N.L. Li [e.a.] // *Europ. J. of Immunogen.* - 1999. - Vol. 26, № 1. - P. 5 - 13.

9. Yap L. M. The contribution of HLA genes to IBD susceptibility and phenotype / L.M.Yap, T.Ahmad, D.P.Jewell // *Gastroenterol.* - 2002. - V.123, №3. - P. 714 - 718.

10. HLA-linked susceptibility and resistance genes in Crohn's disease / A.Nakajima, N.Matsushashi, T.Kodama [e.a.] // *Gastroenterol.* - 1995. - Vol.109, №5. - P.1462 - 1467.

11. HLA class II haplotype associations with inflammatory bowel disease in Jewish (Ashkenazi) and non-Jewish Caucasian populations / E.A.Trachtenberg, H.Yang, E.Hayes [e.a.] // *Hum.Immunol.* - 2000. - V.61, №3. - P.326 -333.

Резюме

Терпиляк О.І., Лозинська М.Р., Лозинський Ю.С., Яремцьо О.Р. Розподіл та частота алелей гена DQA1 у хворих на запальні захворювання товстої кишки.

Вивчено розподіл та частоту алелей гена DQA1 у 20 хворих на запальні захворювання товстої кишки та 45 осіб контрольної групи. Найбільш поширеними у групі хворих були наступні алелі гена DQA1 головного комплексу гістосумісності людини II-го класу: *0501 (35%),

*0101 (15%), *0301 (15%), *0102 (12,5%) та *0103 (12,5%), а у контрольній групі - *0501, *0101, *0102, *0201 та *0103. У хворих виявлено вірогідно вищу частоту лише по одній алелі DQA1*0301 порівняно з контрольною групою. Значення показника відносного ризику RR свідчить про вагому роль алелі DQA1*0301 у хворих на запальні захворювання товстої кишки як алелі-"агресора".

Ключові слова: запальні захворювання, товста кишка, алелі гена DQA1, показник відносного ризику RR.

Резюме

Терпыляк О.И., Лозинская М.Р., Лозинський Ю.С., Яремцьо О.Р. *Распределение и частота аллелей гена DQA1 у больных на воспалительные заболевания толстой кишки.*

Изучено распределение и частоту аллелей гена DQA1 в 20 больных с воспалительными заболеваниями толстой кишки и 45 лиц контрольной группы. Наиболее распространенными в группе больных были следующие аллели гена DQA1 главного комплекса гистосовместимости человека II-го класса: *0501 (35%), *0101 (15%), *0301 (15%), *0102 (12,5%) и *0103 (12,5%), а в лиц контрольной группы - *0501, *0101, *0102, *0201 и *0103 из расчета на 40 аллелей. В больных только по одной аллели DQA1*0301 выявлено достоверно высшую частоту по сравнению с контрольной группой. Значения показателя относительного риска свидетельствуют о важной роли аллели DQA1*0301 у больных с воспалительными заболеваниями толстой кишки как аллели-"агрессора".

Ключевые слова: воспалительные заболевания, толстая кишка, аллели гена DQA1, показатель относительного риска RR.

Summary

Terpyliak O.I., Lozynska M.R., Lozynskyy Y.S., Jaremtsi O.R. *The distribution and frequency of DQA1 gene alleles in patients with inflammatory bowel diseases.*

It was carried out the distribution and frequency of DQA1 gene alleles in 20 patients with inflammatory bowel diseases and 45 persons of control group. The most prevalent in group of illness people were following gene alleles of human lymphocyte antigene (HLA) class II genes: *0501 (35%), *0101 (15%), *0301 (15%), *0102 (12,5%) and *0103 (12,5%), in control group - *0501, *0101, *0102, *0201 and *0103 in estimation on 40 alleles. In illness persons significantly higher frequency only for one DQA1*0301 alleles in compare to control group it was determined. The value of relative risk index (RR) evidence the importance role of DQA1*0301 gene alleles in patients with inflammatory bowel diseases if an allel-"aggressor".

Key words: inflammatory diseases, large bowel, DQA1 gene alleles, relative risk RR.

Рецензент: д.біол.н., проф.Б.П.Романюк

УДК 616-008.63:575.113:612.844:575.116.4:616-001.28

ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ ЕФЕКТ В КЛІТИНАХ-СВІДКАХ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ З ЛІМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ОСІБ, ЯКІ ЗАЗНАЛИ ОПРОМІНЕННЯ IN VIVO

О.В. Шеметун

Науковий центр радіаційної медицини АМН України (Київ)

Вступ

Вивчення мутаційних змін в соматичних неопромінених клітинах, що виникають внаслідок індукції ефекту свідка навколо ушкоджених радіацією клітин, є важливим для оцінки та прогнозування віддалених наслідків опромінення людини. В клітинах-свідках відмічено посилення утворення вільних радикалів, активізацію експресії генів, індукцію мутацій, виникнення мікроядер і розвиток апоптозу [1-3]. За сучасними уявленнями існує прямий зв'язок між мутаційними змінами в геномі соматичних клітин та їх злоякісним переродженням [4, 5]. Хромосомні аберації можуть слугувати доклінічним маркером виникнення злоякісних утворень при розрахунках канцерогенного ризику. Популяційно-цитогенетичними дослідженнями скандинавських вчених показана достовірна кореляція між ризиком виникнення раку та частотою аберацій хромосом [6].

Враховуючи викладене та беручи до уваги масштабність наслідків аварії на Чорнобильській атомній станції, виконання роботи з вивчення цитогенетичних аспектів радіаційно-індукованого ефекту свідка є актуальним і буде сприяти розкриттю механізмів хромосомної нестабільності та індукції канцерогенезу після опромінення.

Метою представленої роботи було встановлення цитогенетичного ефекту в соматичних клітинах людини внаслідок радіаційно-індукованого ефекту свідка при опроміненні in vivo в малих дозах.