

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА IFN γ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Никулина Е.Л., Наследникова И.О., Уразова О.И.,
Воронкова О.В., Новицкий В.В., Некрасов Е.В.,
Филинюк О.В., Чурина Е.Г., Михеева К.О., Хасанова Р.Р.,
Серебрякова В.А., Сухаленцева Н.А.

ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства
по здравоохранению и социальному развитию», г. Томск

Резюме. С привлечением современных молекулярно-генетических и иммунологических методов исследования освещены некоторые аспекты иммунопатогенеза туберкулеза легких. Установлено, что иммуногенетическим фактором, обладающим протективным эффектом в отношении подверженности туберкулезу легких, является аллель Т и гомозиготный генотип ТТ полиморфизма +874А/Т гена IFN γ . Подверженность туберкулезной инфекции ассоциирована с аллелем А, а также с генотипами АА и АТ полиморфизма +874А/Т гена IFN γ . Течение туберкулеза легких сопровождается повышением продукции IFN γ .

Ключевые слова: туберкулез, гамма-интерферон, генный полиморфизм.

Nikulina E.L., Naslednikova I.O., Urazova O.I., Voronkova O.V., Novitsky V.V., Nekrasov E.V., Filiniuk O.V., Churina E.G., Mikheyeva K.O., Hasanova R.R., Serebryakova V.A., Sukhalentseva N.A.

ALLELIC POLYMORPHISM OF IFN γ GENE IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Abstract. In present work, some immunogenetic aspects of pulmonary tuberculosis were studied, using modern techniques from molecular genetics and immunology. It is shown that carriage of T allele and homozygous TT genotype in +874A/T IFN γ gene polymorphism comprise a immunogenetic factor which correlated with a protective effect, regarding a susceptibility to pulmonary tuberculosis. Predisposition for tuberculosis infection is associated with A allele of this gene, as well as with AA and AT genotypes of +874A/T IFN γ gene. Clinical evolution of pulmonary tuberculosis is accompanied by increase in IFN γ production. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 3, pp 259-264)

Keywords: tuberculosis, interferon- γ , gene polymorphism.

Введение

Туберкулез признан одной из самых серьезных медико-социальных проблем. Согласно последним статистическим данным, ежегодно количество больных туберкулезом увеличивается на 8-10 млн, около 3 млн из них умирают, причем 300 тыс. — дети [7]. Туберкулезная инфекция протекает достаточно длительное время и постепенно приводит к истощению пула участников иммунного ответа. Исследование цитокинового профиля имеет большое значение для оценки

состояния иммунной системы при заболеваниях различного генеза, в том числе и туберкулезе. В настоящее время в лечебной практике применяется исследование содержания цитокинов в зависимости от клинических и морфологических проявлений активности гранулематозного воспаления [2, 5].

Важнейшим провоспалительным цитокином является интерферон-гамма (IFN γ), который продуцируется активированными Т-лимфоцитами и естественными киллерами (NK). IFN γ играет ведущую роль в генезе индуцированной туберкулезным антигеном в ткани легкого гранулемы посредством экспрессии адгезивных молекул и хемокинов, необходимых для рекрутирования моноцитов/макрофагов в очаг воспаления [1]. Известно, что уровень IFN γ в плазме крови

Адрес для переписки:

Наследникова Ирина Олеговна
634057, г. Томск, ул. К. Ильмера, 8-96.
Тел.: (3822) 62-14-02.
E-mail: ira_naslednikova@mail.ru

больных в активную фазу заболевания значительно повышен по сравнению с показателями у здоровых лиц. Большинство авторов склонно считать это показателем активности специфического процесса при туберкулезе [12]. Многочисленными экспериментальными исследованиями было показано, что недостаточная продукция IFN γ ведет к неспособности организма ограничивать рост и размножение внутриклеточных микобактерий, и заболевание протекает тяжело, нередко с осложнениями и имеет неблагоприятный исход. В то же время более высокий уровень спонтанной и индуцированной продукции IFN γ предопределяет и более благоприятный исход туберкулезного процесса [9].

Тот факт, что не у каждого человека, в организм которого попадают *Mycobacterium tuberculosis*, развивается заболевание, определяет существование в человеческой популяции групп риска. Одним из возможных факторов риска развития туберкулеза является генетическая предрасположенность [4]. Современные методы исследования позволяют находить иммуногенетические маркеры, а также выявлять ассоциации между структурой определенных кластеров генов и заболеваниями. Большое внимание уделяется изучению роли полиморфизмов гена IFN γ в развитии заболеваний. По данным литературы, полиморфизм +874A/T гена IFN γ связан с восприимчивостью к атипичной пневмонии, с тяжелым острым респираторным синдромом, туберкулезом и гепатитом В [8, 10, 18]. Также данный полиморфизм является маркером проявления артрита при системной красной волчанке [19].

Таким образом, изучение роли характера распределения аллельного варианта промоторного региона +874A/T гена IFN γ , а также степени его ассоциированности с уровнем продукции соответствующего белкового продукта в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции представляется весьма актуальным.

Материалы и методы

В программу исследования вошли 152 пациента европеоидного происхождения, проживающих на территории г. Томска и Томской области, с впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких (88 мужчин и 64 женщины в возрасте от 19 до 55 лет, средний возраст — 31,5 \pm 2,5 года), находившихся на стационарном лечении в Томской областной клинической туберкулезной больнице (главный врач — к.м.н. Янова Г.В.). Диагноз заболевания устанавливали на основании клинической картины заболевания, данных рентгенографии легких, результатов микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Клиническая картина инфильтратив-

ного туберкулеза легких характеризовалась наличием синдрома воспалительной интоксикации (повышение температуры тела, ночные поты, озноб, повышенная утомляемость, слабость, снижение или отсутствие аппетита, потеря массы тела, тахикардия) и бронхолегочных симптомов (кашель более двух-трех недель, выделение мокроты, кровохарканье, одышка, боль в грудной клетке, связанная с дыханием). Бактериовыделение регистрировалось у 100% обследованных пациентов. Обследование пациентов проводили до начала специфической противотуберкулезной химиотерапии. В контрольную группу были включены 122 здоровых донора с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту, с отсутствием легочного анамнеза, патологических изменений в легких при обзорной рентгенографии, хронических инфекционных заболеваний, аллергических реакций и острых респираторных заболеваний в течение 3 месяцев, предшествующих исследованию.

Концентрацию иммуноцитоклинов определяли в культуральных жидкостях. Выделенные на градиенте плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) мононуклеарные клетки (2 \times 10⁶ клеток мл) культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 0,3 мг/мл L-глутамин, 10 мМ HEPES («Flow», Великобритания), 100 мкг/мл гентамицина и 5% CO₂ в течение 24 ч. Содержание иммуноцитоклинов в супернатантах оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией, прилагаемой производителем («Протеиновый контур», Россия). Оптическую плотность растворов регистрировали на микропланшетном фотометре Multiskan EX («ThermoLabSystems», Финляндия). Концентрацию цитокинов рассчитывали по калибровочной кривой.

Выделение ДНК из периферической крови проводили сорбентным методом согласно инструкции, прилагаемой к коммерческому набору «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия). С использованием аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) был исследован полиморфный вариант +874A/T гена IFN γ . Амплификацию осуществляли согласно инструкции, прилагаемой к коммерческому набору «АмплиСенс-200-1» («ИнтерЛабСервис», Россия), в пробирках типа «Эппендорф» путем ПЦР, используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе при использовании амплификатора «Терцик МС2» («ДНК-технология», Россия). Смесь для ПЦР содержала 0,5–2,0 мкл специфической пары праймеров с концентрацией 1 оптических единиц/мл, 1,2–1,8 мкл 10 буфера для амплификации

с концентрацией $MgCl_2$ 0,5–2,0 mM, 0,5–1,0 единиц активности Taq ДНК-полимеразы («Сибэнзим», «Медиген», Россия) и 100–200 нг геномной ДНК. Смесь помещали в пробирки, наслаивали сверху минеральное масло для предотвращения испарения и амплифицировали. Программа амплификации включала в себя предварительную денатурацию при 96° в течение 1 мин. После проведения ПЦР 10 мкл амплификата разделяли в агарозном геле, содержащем 0,5 мг/мл этидиум бромид, при напряжении 150 В в течение 30 мин для последующей визуализации в ультрафиолетовом свете, подтверждающей наличие продукта амплификации. В качестве маркера размера ДНК использовали плазмиду pUC19, расщепленную рестриктазой MspI («Сибэнзим», Россия).

Для проверки нормальности распределения показателей использовали критерий Колмогорова–Смирнова; равенство выборочных средних проверяли по U-критерию Манна–Уитни. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали критерий χ^2 Пирсона и точный тест Фишера. Обработку результатов генетических исследований осуществляли с помощью критерия отношения шансов (OR) с расчетом для него 95% доверительного интервала.

Результаты и обсуждение

Рассматривая проблему туберкулезной инфекции на молекулярном и клеточном уровнях, вероятно, нельзя четко разграничить значение биологических свойств *Mycobacterium tuberculosis* и иммунной системы макроорганизма. Благоприятный исход туберкулезной инфекции, с одной стороны, определяется патогенностью штамма возбудителя, с другой — адекватным противоинфекционным ответом со стороны системы иммунитета. Ключевым моментом, определяющим исход данной патологии, является баланс продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками [3].

При туберкулезе легких развивается вторичная иммунологическая недостаточность, которая в большей степени затрагивает клеточное звено иммунной системы. В первую очередь проникшие в организм *Mycobacterium tuberculosis* поражают макрофагальное звено иммунитета, т.к. способны к паразитированию внутри фагоцитов, снижая их функциональную активность. Невозможность элиминации антигена макрофагами приводит к привлечению в очаг воспаления большого количества иммунокомпетентных клеток, а так как патоген занимает внутрикле-

точное положение, то в ответ на него активируется Th1-звено иммунной системы [13]. Логично предположить, что в случае проникновения в макроорганизм инфекционного агента, склонного к внутриклеточному паразитированию, поляризация иммунного ответа в направлении активации гуморального звена будет неблагоприятной. Известно, что гуморальный и клеточный иммунный ответ — два альтернативных пути, баланс которых главным образом определяется взаимоотношением $CD4^+$ Т-лимфоцитов I и II типов [16].

Th1-лимфоциты, секретируя $IFN\gamma$, фактор некроза опухолей $TNF\alpha$ и интерлейкин IL-2, играют защитную роль при туберкулезной инфекции, тогда как производство Th2-лимфоцитами IL-4, IL-6, IL-10 и трансформирующего фактора роста $TGF-\beta$ способствует прогрессированию патологического процесса и его клинической манифестации. Невозможность элиминации *Mycobacterium tuberculosis* из организма может быть связана с неадекватным уровнем реагирования клеточного звена иммунитета, т.е. преимущественной реализации иммунного ответа по гуморальному типу [11].

Как показали проведенные нами исследования, у больных туберкулезом легких обнаруживается повышение спонтанной продукции $IFN\gamma$ мононуклеарами периферической крови относительно соответствующих показателей у здоровых индивидов (табл. 1). Обнаруженное увеличение продукции $IFN\gamma$ могло быть обусловлено несколькими причинами. С одной стороны, данный факт можно рассматривать как универсальную реакцию иммунной системы на подавление размножения *Mycobacterium tuberculosis*. Роль $IFN\gamma$ в противотуберкулезном иммунном ответе обусловлена его активирующим влиянием на фагоцитарную активность макрофагов, прямую цитотоксичность Т-лимфоцитов [14]. Следует заметить, что увеличение концентрации $IFN\gamma$, вероятнее всего, могли поддерживаться за счет секреторных способностей НК-клеток, количество которых в крови у больных туберкулезом легких возрастает. В условиях дефицита Т-лимфоцитов НК-клетки, активность которых под влиянием $IFN\alpha$ или IL-12 повышается в десятки раз, могут компенсировать некоторые их функции, например продукцию $IFN\gamma$ [1]. С другой стороны, наличие повышенного уровня $IFN\gamma$ может указывать на то, что он определяет интерферогенную активность самого возбудителя [9].

В промоторной зоне гена $IFN\gamma$ известен полиморфизм +874A/T, который относится к заменам SNP (single-nucleotide polymorphism) и характеризуется сменой аденинового нуклеотида на тиминный. В ходе иммуногенетического исследования было выявлено, что среди больных

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ СЕКРЕЦИИ $IFN\gamma$ (ПГ/МЛ) МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ И У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ, МЕ ($Q_{25\%}$: $Q_{75\%}$)

Регистрируемый показатель	Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких
$IFN\gamma$	31,91 (30,05:40,44)	98,2 (54,8:147,3) $p < 0,001$

Примечание. Здесь и в табл. 2-3: p – достоверность различий показателей по сравнению с их значениями у здоровых доноров.

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФИЗМА +874А/Т ГЕНА $IFN\gamma$ (% , АБС.) СРЕДИ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Регистрируемый показатель	Здоровые доноры	Больные туберкулезом	χ^2	OR (95% CI)
АА	18 (22)	26,3 (40)	1,44 $p = 0,022$	1,66 (0,67-4,12)
АТ	47,5 (58)	59,2 (90)	1,86 $p = 0,017$	1,6 (0,77-3,35)
ТТ	34,5 (42)	14,5 (22)	6,45 $p = 0,01$	0,32 (0,13-0,79)
А	41,8 (102)	56 (170)	5,4 $p = 0,02$	1,77 (1,06-2,94)
Т	58,2 (142)	44 (134)	5,4 $p = 0,02$	0,57 (0,34-0,94)

Примечание. Здесь и в табл. 3: χ^2 – стандартный критерий Пирсона для сравнения частот генотипов и аллелей генов; OR – критерий отношения шансов, отражающий относительный риск развития заболевания при определенном генотипе по сравнению со здоровыми донорами с 95% доверительным интервалом.

туберкулезом чаще встречаются гомозиготы по аллелю А и гетерозиготы АТ полиморфного участка +874А/Т гена $IFN\gamma$. Наиболее редким генотипом оказался гомозиготный по аллелю Т. В группе здоровых доноров достоверно чаще, чем среди больных, встречался гомозиготный по аллелю Т-генотип. В обеих группах преобладали индивиды с гетерозиготным генотипом АТ (табл. 2). Была показана положительная ассоциация генотипов АА (OR = 1,66) и АТ (OR = 1,6), а также аллеля А (OR = 1,77) с туберкулезом легких. Наличие этих аллельных вариантов свидетельствует

о повышенном риске развития туберкулезной инфекции.

Исходя из того, что исследуемый полиморфизм +874А/Т гена $IFN\gamma$ расположен в промоторной области, нами была предпринята попытка выяснить характер влияния данного полиморфизма на уровень продукции кодируемого цитокина. Контроль транскрипции гена $IFN\gamma$ связан с промоторной областью, где расположены сайты связывания транскрипционных факторов ISGF3, IRF1, STAT1, NF- κ B и AP1. Было установлено, что большинство сайтов связывания расположено в промоторах в районе [-1; -200] п.о.

ТАБЛИЦА 3. УРОВЕНЬ ПРОДУКЦИИ $IFN\gamma$ (ПГ/МЛ) МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ЛОКУСА +874А/Т ГЕНА $IFN\gamma$, МЕ ($Q_{25\%}$: $Q_{75\%}$)

Регистрируемый показатель	Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких
АА	44,73 (43,66:44,73) $p_{AA/AT} = 0,013$	152,4 (142,9:166,35) $p = 0,018$ $p_{AA/AT} = 0,061$
АТ	33,69 (26,6:40,44) $p_{AT/TT} = 0,905$	105,5 (98,18:129,9) $p = 0,001$ $p_{AT/TT} = 0,036$
ТТ	30,9 (29,9:31,91) $p_{AA/TT} = 0,009$	58,34 (38,57:78,17) $p = 0,039$ $p_{AA/TT} = 0,064$

Примечание. $p_{AA/AT}$, $p_{AT/TT}$, $p_{AA/TT}$ – достоверность различий показателей в зависимости от аллельного варианта локуса +874А/Т гена $IFN\gamma$.

по отношению к старту транскрипции. Тем не менее функциональные сайты встречаются и в очень удаленных 5'-энхансерах, вплоть до -5000 п.о., а также в энхансерах, расположенных в интронах, до +1500 п.о. по отношению к старту транскрипции. Поскольку взаимодействие энхансеров транскрипции происходит по типу «ключ-замок», становится понятно, что замена даже одного нуклеотида в области промотора гена ведет к изменению структуры сайтов связывания. Это в конечном итоге позволяет транскрипционным факторам приобретать большее или меньшее сродство с регуляторными участками и в дальнейшем напрямую связано с уровнем транскрипции закодированного цитокина [17]. Проведенное нами исследование показало, что максимальный уровень продукции *IFN γ* ассоциирован с гомозиготным по аллелю *A* генотипом полиморфизма +874A/T гена *IFN γ* . У носителей гомозиготного генотипа *TT* был обнаружен наиболее низкий уровень продукции *IFN γ* (табл. 3).

Таким образом, нами установлено значительное изменение соотношения аллельных вариантов промоторного +874A/T гена *IFN γ* у больных туберкулезом легких. Эти данные вскрывают новые механизмы реализации предрасположенности человека к развитию туберкулеза легких и позволяют сделать предположение о причинах избирательности развития туберкулеза среди лиц, проживающих в одинаковых социальных условиях, ведущих сходный образ жизни и при равноценном воздействии общеизвестных факторов риска.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы», Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы», а также при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации и молодых российских ученых.

Список литературы

1. Воронкова О.В., Уразова О.И., Новицкий В.В., Стрелис А.К. Иммунопатология туберкулеза легких. — Томск: Изд-во Том. ун-та, 2007. — 194 с.
2. Гунтупова Л.Д., Борисов С.Е., Купавцева Е.А. Цитокиновый профиль при гранулематозных болезнях легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2006. — № 6. — С. 10-13.
3. Еремеев В.В., Майоров К.Б. Взаимодействие макрофаг-микобактерия в процессе реакции микроорганизма на туберкулезную инфекцию // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2002. — № 3. — С. 54-57.
4. Ерохин В.В., Земскова З.С. Современные представления о туберкулезном воспалении // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2003. — № 3. — С. 11-21.
5. Кноринг Б.Е., Елькин А.В., Смирнов М.Н. Иммунокоррекция Ронколейкином при туберкулезе легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 1999. — № 5. — С. 26-36.
6. Новицкий В.В., Сеницына В.А., Воронкова О.В. Цитокинпродуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких до лечения и на фоне химиотерапии // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2005. — № 6. — С. 39-42.
7. Онищенко Г.Г. Эпидемическая ситуация в Российской Федерации и меры по ее стабилизации // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2003. — № 1. — С. 4-9.
8. Рыдловская А.В., Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм *TNF α* и патология // Цитокины и воспаление. — 2005. — Т. 4, № 3. — С. 4-9.
9. Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Продукция *IFN- γ* мононуклеарными клетками крови больных при разных типах течения туберкулезного процесса // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2004. — № 10. — С. 19-21.
10. Симбирцев А.С., Громова А.Ю. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления // Цитокины и воспаление. — 2005. — Т. 4, № 1. — С. 3-10.
11. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы. — М.: ВИНТИ РАН, 2001. — 223 с.
12. Шкарин А.В., Белоусов С.С., Аникина О.А. Уровень цитокинов в плазме крови у больных активным инфильтративным туберкулезом легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2008. — № 8. — С. 34-38.
13. Maher D., Raviglione M. Global epidemiology of tuberculosis // Clin. Chest Med. — 2005. — Vol. 26. — P. 167-169.
14. Mitchell S.A., Grove J., Scurland A. Association of the tumour necrosis factor- α - 308 but not the interleukin 10 - 627 promoter polymorphism with genetic susceptibility to primary sclerosing cholangitis // J. Gut. — 2001. — Vol. 49. — P. 288-294.
15. Moraes-Vasconcelos D., Orii N.M., Romano C.C. Characterization of the cellular immune function of patients with chronic mucocutaneous candidiasis // Clin. Exp. Immunol. — 2001. — Vol. 123. — P. 247-253.

16. Ryan A.W., Mapp J., Myna S. Levels of inter-population differentiation among different functional classes of immunologically important genes // *Genes Immun.* — 2006. — Vol. 7. — P. 179.

17. Pedroza-Gonzalez A., Garcia-Romo G.S., Aguilar-Leon D. In situ analysis of lung antigen-presenting cells during murine pulmonary infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis* // *Int. J. Exp. Pathol.* — 2004. — Vol. 85. — P. 135-145.

18. Pereira C.B., Palaci M., Leite O.H. Interferon- γ -Receptor deficiency in an infant with fatal bacille

Calmette-Guerin infection // *Microb. Infect.* — 2004. — Vol. 6. — P. 25-33.

19. Quesniaux V., Fremond C., Jacobs M. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria // *Microbes Infect.* — 2004. — Vol. 6. — P. 946-959.

поступила в редакцию — 14.08.2009

принята к печати — 12.11.2009