

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Чурина Е.Г.^{1,2}, Уразова О.И.¹, Новицкий В.В.¹, Ситникова А.В.¹,
Бармина С.Э.¹

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия

Резюме. Заболеваемость туберкулезом легких (ТБ) приобретает широкие масштабы в связи с расширением спектра резистентности *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) к противотуберкулезным средствам и высокой вирулентностью инфицирующих штаммов МБТ. Антигены МБТ способны вызывать дисфункцию рецепторного аппарата и модулировать цитокинсекреторную функцию иммунокомпетентных клеток. Полиморфизм генов провоспалительных цитокинов, которые вовлечены в механизмы защитных реакций врожденного иммунитета, определяет степень резистентности индивида к микобактериальной инфекции, а также тяжесть и продолжительность заболевания в случае его клинической манифестации. Цель работы: исследование связи аллельного полиморфизма генов *TNFA*, *IL2*, *IFNG* с изменениями *in vitro* секреции TNF α , IL-2, IFN γ мононуклеарными лейкоцитами у пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания.

Обследовано 334 больных (220 мужчин и 114 женщин) в возрасте от 23 до 50 лет с впервые выявленным инфильтративным ТБ (ИТБ) и диссеминированным ТБ (ДТБ). Группу сравнения составили 183 здоровых донора (130 мужчин и 53 женщины) аналогичного возраста. Материалом исследования являлись ДНК, экстрагированная из цельной крови, и супернатанты культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из венозной крови у здоровых добровольцев и больных ТБ. Оценку секреции цитокинов осуществляли путем измерения их концентрации в культуральных супернатантах мононуклеарных лейкоцитов методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Для исследования полиморфных участков генов цитокинов использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Анализ полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica for Windows Version 6.0 (StatSoft Inc., США).

Дисбаланс секреции провоспалительных цитокинов у больных ТБ ассоциирован с носительством полиморфных вариантов их генов. Продемонстрировано, что гипосекреция IL-2 определяется носительством аллеля *G* и генотипа *GG* (*T-330G*) гена *IL2* как в контрольной группе, так и у больных ТБ вне зависимости от клинической формы. У больных ДТБ – носителей гомозиготного генотипа *TT* (*T-330G*) гена *IL2* – установлена повышенная секреция белка. Максимальная секреция TNF α регистрировалась у лиц с генотипом *AA* (*G-308A*) гена *TNFA* в контрольной группе и у больных ИТБ, минимальная концентрация TNF α связана с носительством гомозиготного генотипа *GG* (*G-308A*) гена

Адрес для переписки:

Чурина Елена Георгиевна
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2.
Тел.: 8 (3822) 90-11-01 (доп. 1742).
E-mail: Lena1236@yandex.ru

Address for correspondence:

Churina Elena G.
Siberian State Medical University
634050, Russian Federation, Tomsk, Moskovsky Trakt, 2.
Phone: 7 (3822) 90-11-01 (add. 1742).
E-mail: Lena1236@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, А.В. Ситникова, С.Э. Бармина «Функциональный полиморфизм генов провоспалительных цитокинов при туберкулезе легких» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 149–156.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-149-156
© Чурина Е.Г. и соавт., 2019

For citation:

E.G. Churina, O.I. Urazova, V.V. Novitsky, A.V. Sitnikova, S.E. Barmina “Functional polymorphism of the pro-inflammatory cytokine genes in pulmonary tuberculosis”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 149–156.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-149-156
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-149-156

TNFA во всех обследованных группах. У больных ИТБ и ДТБ повышение секреции $IFN\gamma$ мононуклеарными лейкоцитами крови не связано с носительством полиморфизма +874A/T гена *IFNG*.

Снижение секреции IL-2 и $TNF\alpha$ у больных ТБ ассоциировано с полиморфизмами их генов – (T-330G) гена *IL2* и (G-308A) гена *TNFA* соответственно. Полиморфизм (+874A/T) гена *IFNG* не оказывает модулирующего влияния на секрецию $IFN\gamma$ при ТБ вне зависимости от клинической формы болезни.

Ключевые слова: аллельный полиморфизм генов, провоспалительные цитокины, IL-2, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, туберкулез легких, иммунный ответ

FUNCTIONAL POLYMORPHISM OF THE PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE GENES IN PULMONARY TUBERCULOSIS

Churina E.G.^{a, b}, Urazova O.I.^a, Novitsky V.V.^a, Sitnikova A.V.^a,
Barmina S.E.^a

^a Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

^b National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. In the present time, incidence of pulmonary tuberculosis (TB) becomes broader, due to spreading resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) to anti-tuberculosis drugs and infection with highly virulent strains of *M. tuberculosis*. The MBT antigens can cause dysfunction of the receptors and modulate the cytokine secreting function of immunocompetent cells. Polymorphic genes of pro-inflammatory cytokines involved in the mechanisms of defense responses of innate immunity, determine the degree of resistance to individual mycobacterial infection, as well as severity and duration of the disease in cases of clinical manifestations. The aim of the study was to investigate the connections between allelic polymorphisms of *IL2*, *IFNG* and *TNFA* genes and changes in secretion of the corresponding pro-inflammatory cytokines IL-2, $IFN\gamma$, and $TNF\alpha$ *in vitro* in patients with the newly diagnosed pulmonary tuberculosis (TB), depending on the clinical form of the disease.

A total of 334 patients (220 men and 114 women) aged 23 to 50 years with newly diagnosed infiltrative and disseminated TB were enrolled into the study. The control group consisted of 183 healthy donors (130 men and 53 women) of corresponding age. The material of the research included DNA extracted from the whole blood and supernatants of culture suspensions of mononuclear leukocytes isolated from venous blood in healthy volunteers and patients with TB. The evaluation of cytokines secretion was performed by measuring their concentration in the blood mononuclear cell culture supernatants. using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). To study polymorphic regions of cytokine genes, a polymerase chain reaction (PCR) was applied. Analysis of the obtained data was carried out by means of the program Statistica for Windows Version 6.0 (StatSoft Inc., USA).

It was found that the imbalance of secretion of pro-inflammatory cytokines in TB patients was associated with the polymorphic variants of genes of these cytokines. It was found that the hypo-secretion of IL-2 is determined by the carriage of the G allele and genotype GG (T-330G) of the *IL2* gene in both the control group and in patients with TB, regardless of the clinical form. In patients with DTB carriers of the homozygous genotype TT (T-330G) of the *IL2* gene, increased protein secretion was established. The maximum secretion of $TNF\beta$ was recorded in patients with the AA genotype (G-308A) of the *TNFA* gene in the control group and in ITB patients; the minimum concentration of $TNF\alpha$ was associated with the carrier of the homozygous GG genotype (G-308A) of the *TNFA* gene in all the examined groups. In patients with ITB and DTB, an increase in $IFN\gamma$ secretion by mononuclear blood leukocytes is not associated with the carrier of polymorphism +874A/T of the *IFNG* gene.

Reduced secretion of IL-2 and $TNF\alpha$ in TB patients is associated with polymorphisms of their genes – (T-330G) of *IL2* gene and (G-308A) of *TNFA* gene, respectively. The polymorphism (+874A/T) of the *IFNG* gene does not have a modulatory effect on the secretion of $IFN\gamma$ in patients with TB, regardless of clinical form of the disease.

Keywords: allelic gene polymorphism, proinflammatory cytokines, IL-2, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, pulmonary tuberculosis, immune response

Работа осуществлена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК №16.512.11.2046), РФФИ (Проект №11-04-98057-р_сибирь_a), Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (НШ-614.2012.7, НШ-4184.2014.7, НШ-2690.2018.7).

Введение

Заболеемость туберкулезом легких (ТБ) приобретает широкие масштабы в связи с расширением спектра резистентности микобактерий туберкулеза (МБТ) к противотуберкулезным средствам и высокой вирулентностью инфицирующих штаммов МБТ. Антигены МБТ способны вызывать дисфункцию рецепторного аппарата и модулировать цитокинсекреторную активность иммунокомпетентных клеток [2, 5]. Полиморфизм генов провоспалительных цитокинов, которые вовлечены в механизмы защитных реакций врожденного иммунитета, определяет степень резистентности индивида к микобактериальной инфекции, а также тяжесть и продолжительность заболевания в случае его клинической манифестации. ТБ относится к группе мультифакторных заболеваний, в основе которых лежит, наряду с действием болезнетворных факторов внешней среды, неблагоприятное сочетание аллельных вариантов генов, в частности генов иммунного контроля [1]. Это обусловлено полиморфностью системы цитокинов, их плеiotропным действием, а также тем, что конечный эффект воздействия на клетку формируется комплексом медиаторов. Таким образом, актуальным становится изучение взаимосвязи иммунопатогенетических факторов инфекционного заболевания с целым рядом аллельных вариантов генов цитокинов [1, 6].

В связи с изложенным **целью настоящего исследования** явилось установление взаимосвязи аллельного полиморфизма генов *TNFA*, *IL2*, *IFNG* с изменениями *in vitro* секреции соответствующих провоспалительных цитокинов TNF α , IL-2 и IFN γ мононуклеарными лейкоцитами у пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания.

Материалы и методы

Обследовано 334 пациента с впервые выявленным ТБ (220 мужчин и 114 женщин). Средний возраст обследованных лиц составил 43,10 \pm 10,46 лет. Все обследованные пациенты находились на стационарном лечении в Томском фтизиопульмонологическом медицинском центре в отделении для больных туберкулезом. Выборка была однородной как по расовой принадлежности, так и по этническому происхождению (все

пациенты были русскими и не имели между собой родства). Диагноз ТБ устанавливался на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Все больные были обследованы до назначения специфической противотуберкулезной химиотерапии. Они были разделены на две группы по клинической форме заболевания: 177 больных с инфильтративным ТБ (ИТБ) и 157 больных диссеминированным ТБ (ДТБ).

В исследование не включались больные, получавшие на момент исследования терапию противотуберкулезными, нестероидными противовоспалительными средствами и глюкокортикостероидами; больные с тяжелыми сопутствующими заболеваниями (онкологические заболевания, сахарный диабет, бронхиальная астма); больные с иммунозависимыми, в том числе аутоиммунными и аллергическими заболеваниями, инфицированными вирусами гепатита и ВИЧ; больные, которым применялась иммунотерапия. Группу сравнения составили 183 здоровых донора (130 мужчин и 53 женщины) в возрасте от 23 до 50 лет (средний возраст – 41,31 \pm 7,47 лет). У всех обследованных лиц было получено добровольное информированное согласие на проведение необходимых для исследования манипуляций.

Материалом исследования являлась ДНК и супернатанты культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из венозной крови, взятой утром натощак из локтевой вены в количестве 20 мл у больных ТБ до назначения специфической химиотерапии и у здоровых добровольцев.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из цельной крови выполняли на градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1077 \text{ кг/м}^3$) (Мед-биоспектр, Россия). Количество клеток в суспензии стандартизировали до $2,5 \times 10^6/\text{мл}$. Клетки культивировали в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640 (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ОО «БиолоТ», Россия), 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина, при 37 °С и 5% CO $_2$ в течение 24 ч. Супернатанты использовали для измерения концентрации цитокинов TNF α , IL-2 и IFN γ с помощью твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» метода (ELISA). Процедуру иммуноферментного анализа выполняли по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем (Протеиновый контур, Россия; Biosource, США). Оптическую плотность содержимого ячеек планшета регистрировали на фотометре-анализаторе Multiscan EX (Финляндия) при длине волны 450 нм.

Выделение ДНК из крови выполняли согласно инструкции, прилагаемой к набору «ДНК-сорб-В» (ИнтерЛабСервис, Россия). Исследование полиморфных участков генов цитокинов осуществлялось с использованием аллель-специфичной амплификации специфических участков генома. Были исследованы полиморфные сайты T-330G гена *IL2* (rs2069762), G-308A гена *TNFA* (rs1800629), +874A/T гена *IFNG* (rs2340561). Исследованные аллельные варианты относятся к SNP-полиморфизмам, т.е. характеризуются заменой одного нуклеотида. Для выбора полиморфизмов использовали базы данных Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, <http://www.omim.org/>) и National Center for Biotechnological Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>), для подбора праймеров – программу Primer3 v0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Амплификацию осуществляли путем полимеразной цепной реакции (ПЦР), выбирая структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе, с применением амплификатора «Терцик МС2» («ДНК-технология», Россия).

Анализ полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica for Windows

Version 6.0 (StatSoft Inc., США). Проверку соответствия наблюдаемых частот генотипов исследуемых полиморфизмов генов ожидаемым их частотам при соответствии равновесию Харди–Вайнберга проводили с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей и генотипов в группах исследования использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность или (когда число наблюдений, по крайней мере, в одной из ячеек таблиц сопряженности было менее 5) точный тест Фишера. Об ассоциации исследуемых полиморфизмов с ТБ судили по величине отношения шансов (Odds Ratio (OR)) с расчетом 95% доверительного интервала. При $OR < 1$ судили об отрицательной связи между признаками, при $OR > 1$ – о положительной их связи. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты

Ген фактора некроза опухоли альфа (*TNFA*) находится в шестой хромосоме (6p21.3) и имеет функциональный полиморфизм G-308A. Проведенные нами исследования показали, что в контрольной группе максимальная секре-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ TNF α В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУРНЫХ СУСПЕНЗИЙ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ (ИТБ) И ДИССЕМНИРОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ (ДТБ) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ЛОКУСА G-308A ГЕНА TNFA, пг/мл, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. TNF α CONTENT IN SUPERNATANTS OF MONONUCLEAR BLOOD LEUKOCYTE CULTURE SUSPENSIONS IN HEALTHY DONORS AND IN PATIENTS WITH INFILTRATIVE (ITB) AND DISSEMINATED PULMONARY TUBERCULOSIS (DTB), DEPENDING ON THE GENOTYPE OF THE TNFA OF LOCUS G-308A, pg/ml, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Генотип Genotype	Характеристика обследованных лиц Characteristics of the examined persons		
	Здоровые доноры Healthy donors	Больные туберкулезом легких Patients with pulmonary tuberculosis	
		Больные ИТБ Patients with ITB	Больные ДТБ Patients with DTB
GG	131,57 (119,60-186,50) $p_{GG/GA}^* < 0,05$	37,31 (35,87-38,76) $p_1 < 0,05$ $p_{GG/GA} < 0,05$	38,76 (35,87-60,08) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_{GG/GA} < 0,05$
GA	216,60 (193,10-221,00) $p_{GA/AA}^* < 0,05$	106,90 (90,85-119,57) $p_1 < 0,05$ $p_{GA/AA} < 0,05$	99,85 (93,99-112,85) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_{GA/AA} > 0,05$
AA	356,60 (329,50-525,40) $p_{GG/AA}^* < 0,05$	193,80 (187,8-197,7) $p_1 < 0,05$ $p_{GG/AA} < 0,05$	

Примечание. * – $p_{GG/GA}$, $p_{GA/AA}$, $p_{GG/AA}$ – достоверность различий показателей в зависимости от аллельного варианта локуса G-308A гена TNFA.

Note. *, $p_{GG/GA}$, $p_{GA/AA}$, $p_{GG/AA}$, the reliability of the differences in indices depending on the allele variant of the G-308A locus of the TNFA gene.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ IL-2 В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУРНЫХ СУСПЕНЗИЙ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ (ИТБ) И ДИССЕМИНИРОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ (ДТБ) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ЛОКУСА T-330G ГЕНА IL2, пг/мл, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. IL-2 CONTENT IN SUPERNATANTS OF MONONUCLEAR BLOOD LEUKOCYTE CULTURE SUSPENSIONS IN HEALTHY DONORS AND IN PATIENTS WITH INFILTRATIVE (ITB) AND DISSEMINATED PULMONARY TUBERCULOSIS (DTB), DEPENDING ON THE GENOTYPE OF THE IL2 OF LOCUS T-330G, pg/ml, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Генотип Genotype	Характеристика обследованных лиц Characteristics of the examined persons		
	Здоровые доноры Healthy donors	Больные туберкулезом легких Patients with pulmonary tuberculosis	
		Больные ИТБ Patients with ITB	Больные ДТБ Patients with DTB
TT	30,32 (26,70-36,50) p _{TT/TG} * < 0,05	31,31 (12,50-50,40) p ₁ > 0,05 p _{TT/TG} > 0,05	53,82 (52,10-59,04) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05 p _{TT/TG} < 0,05
TG	14,67 (13,93-17,50) p _{TG/GG} * < 0,05	17,04 (10,89-24,77) p ₁ > 0,05 p _{TG/GG} > 0,05	18,00 (12,86-32,46) p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p _{TG/GG} < 0,05
GG	12,16 (11,04-13,28) p _{TT/GG} * < 0,05	9,18 (7,86-19,21) p ₁ > 0,05 p _{TT/GG} > 0,05	7,86 (5,10-10,81) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05 p _{TT/GG} < 0,05

Примечание. * – p_{TT/GG}, p_{TG/GG}, p_{TT/TG} – достоверность различий показателей в зависимости от аллельного варианта локуса T-330G гена IL2.

Note. *, p_{TT/GG}, p_{TG/GG}, p_{TT/TG}, the reliability of the differences in indices depending on the allele variant of the T-330G locus of the IL2 gene.

ция TNFα регистрировалась у лиц с генотипом AA (G-308A) гена TNFA по сравнению с другими вариантами сочетаний аллелей исследуемого гена (p_{GA/AA} < 0,05; p_{GG/AA} < 0,05) (табл. 1).

В группе больных ДТБ лица, несущие генотип AA (G-308A) гена TNFA, отсутствовали. В группах больных ИТБ и ДТБ минимальная концентрация исследуемого цитокина регистрировалась у носителей гомозиготного генотипа GG (G-308A) гена TNFA по сравнению с лицами, несущими генотипы GA и AA (p_{GG/GA} < 0,05 и p_{GG/AA} < 0,05) (табл. 1). Следует отметить, что концентрация TNFα в супернатантах культуральных суспензий у больных ТБ в целом была значимо ниже, чем у здоровых доноров. Так, концентрация исследуемого цитокина оказалась ниже по сравнению с соответствующими показателями в группе контроля у больных с генотипом GG (G-308A) гена TNFA более чем в 3,4 раза, с генотипом GA – в 2 раза и с генотипом AA – в 1,8 раза (табл. 1).

Изменения в промоторной области влекут за собой изменение активности контролируемого гена. Поскольку известно, что полиморфизм T-330G расположен в области промотора гена IL2, то теоретически замена тимина на гуанин

в позиции -330 п.н. относительно стартовой точки транскрипции должна быть связана с уровнем экспрессии гена, а соответственно, и с уровнем синтеза и секреции кодируемого продукта. При анализе секреции IL-2 в зависимости от аллельного варианта полиморфизма T-330G гена IL2 было обнаружено, что в контрольной группе у носителей гомозиготного генотипа по аллелю T уровень секреции цитокина был максимальным, а у носителей гомозиготного генотипа по аллелю G – минимальным (табл. 2). В группе здоровых доноров у гетерозигот TG полиморфизма T-330G гена IL2 спонтанная секреция IL-2 оказалась ниже, чем у гомозигот по аллелю T (p_{TT/TG} < 0,05). Более низкий уровень спонтанной секреции IL-2 выявлялся также у гомозигот по аллелю G (p_{TT/GG} < 0,05) по сравнению с гомозиготами по аллелю T (T-330G) гена IL2 (табл. 2).

Интересным является факт, что у больных ДТБ с носительством гомозиготного генотипа TT полиморфизма T-330G гена IL2 уровень секреции IL-2 оказался значимо выше, чем в группе контроля (p₁ < 0,05), у больных ИТБ (p₂ < 0,05) (табл. 2) и у больных ДТБ с другими генотипами

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ $IFN\gamma$ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУРНЫХ СУСПЕНЗИЙ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ (ИТБ) И ДИССЕМНИРОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ (ДТБ) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ЛОКУСА +874A/T ГЕНА *IFNG*, пг/мл, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. $IFN\gamma$ CONTENT IN SUPERNATANTS OF MONONUCLEAR BLOOD LEUKOCYTE CULTURE SUSPENSIONS IN HEALTHY DONORS AND IN PATIENTS WITH INFILTRATIVE (ITB) AND DISSEMINATED PULMONARY TUBERCULOSIS (DTB), DEPENDING ON THE GENOTYPE OF THE *IFNG* OF LOCUS +874A/T, pg/ml, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Генотип Genotype	Характеристика обследованных лиц Characteristics of the examined persons		
	Здоровые доноры Healthy donors	Больные туберкулезом легких Patients with pulmonary tuberculosis	
		Больные ИТБ Patients with ITB	Больные ДТБ Patients with DTB
AA	26,31 (21,42-26,75) $p_{AA/AT}^* < 0,05$	56,35 (39,28-79,84) $p_1 < 0,05$ $p_{AA/AT} < 0,05$	
AT	31,91 (30,20-37,18) $p_{AT/TT}^* < 0,05$	113,20 (98,17-154,30) $p_1 < 0,05$ $p_{AT/TT} > 0,05$	146,60 (116,60-163,20) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_{AT/TT} < 0,05$
TT	44,73 (42,60-86,60) $p_{AA/TT}^* < 0,05$	148,80 (147,30-165,76) $p_1 < 0,05$ $p_{AA/TT} < 0,05$	325,30 (321,10-337,30) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_{AA/TT} > 0,05$

Примечание. * – $p_{AA/AT}$, $p_{AT/TT}$, $p_{AA/TT}$ – достоверность различий показателей в зависимости от аллельного варианта локуса +874A/T гена *IFNG*.

Note. *, $p_{AA/AT}$, $p_{AT/TT}$, $p_{AA/TT}$, the reliability of the differences in indices depending on the allele variant of the +874A/T locus of the *IFNG* gene.

($p_{TT/TG} < 0,05$; $p_{TT/GG} < 0,05$ и $p_{TG/GG} < 0,05$) полиморфизма *T-330G* гена *IL2* (табл. 2).

Исследование функционального полиморфизма +874A/T гена *IFNG*, находящегося в длинном плече двенадцатой хромосомы человека (12q14), показало, что максимальный уровень секреции $IFN\gamma$ сочетается с гомозиготным генотипом по аллелю T, минимальный – с гомозиготным генотипом по аллелю A ($p_{AA/AT} < 0,05$, $p_{AA/TT} < 0,05$, $p_{AT/TT} < 0,05$) (табл. 3).

В группе больных ИТБ более низкая секреция $IFN\gamma$ отмечалась у лиц, несущих генотип AA полиморфного варианта +874A/T гена *IFNG*, по сравнению с таковой у носителей альтернативных генотипов ($p_{AA/AT} < 0,05$ и $p_{AA/TT} < 0,05$) (табл. 3). В группе больных ДТБ носителей генотипа AA (+874A/T) гена *IFNG* не было выявлено, а пациенты с гетерозиготным генотипом имели более низкое содержание $IFN\gamma$ в клеточных супернатантах по сравнению с больными с генотипом TT ($p_{AT/TT} < 0,05$). В целом у больных ИТБ и ДТБ уровень секреции $IFN\gamma$, вне зависимости от генотипа полиморфизма +874A/T гена *IFNG*, был значимо выше, чем у здоровых доноров ($p_1 < 0,05$) (табл. 3).

Обсуждение

В нарушении эффекторных механизмов врожденного иммунитета при инфекционных заболеваниях снижение секреции провоспалительных цитокинов – ключевой патогенетический фактор. Функциональный полиморфизм регуляторных участков генов цитокинов влияет на количество секретируемого белка, но не изменяет его аминокислотную последовательность. Известно, что полиморфизм *G-308A* повышает транскрипционную активность гена *TNFA* и, соответственно, продукцию цитокина, как конститутивную, так и индуцированную [3]. Роль полиморфного аллеля -308A при туберкулезной инфекции неоднозначна. Ряд авторов указывают на то, что аллель -308A гена *TNFA* значительно чаще встречается среди больных ТБ по сравнению со здоровыми лицами, то есть является фактором риска возникновения и развития ТБ [3, 6]. Другие авторы указывают на протективную роль -308A на первых этапах заболевания, однако при развитии деструктивных форм ТБ наличие такого высокопродуцирующего аллеля способствует ухудшению состояния и возникновению рецидивов [11].

В ходе проведенных нами исследований выявлено, что наиболее высокий уровень секреции TNF α определяется у носителей гомозиготного AA варианта полиморфного участка G-308A гена TNFA, а наиболее низкий – у носителей гомозиготного генотипа GG (табл. 1). Можно предположить, что генотип AA полиморфизма G-308A выполняет протективную функцию при ТБ, однако в целом секреция TNF α у обследованных нами больных была ниже, чем у здоровых лиц.

IL-2 активирует миграцию макрофагов в направлении локализации МБТ, повышает ферментативную и общую бактерицидную активность макрофагов, а также активирует процессы пролиферации, дифференцировки и секреторную функцию Т-лимфоцитов. Аллельный полиморфизм T-330G промотора гена IL2 еще недостаточно изучен, ведутся исследования его ассоциаций с различными инфекционными заболеваниями, в том числе ТБ. При изучении зависимости между содержанием IL-2 в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов и вариантом полиморфного сайта T-330G соответствующего гена было показано, что у индивидов (здоровых и больных ТБ) с генотипом GG уровень секреции IL-2 *in vitro* был значимо ниже, чем у носителей с генотипами TT и TG (табл. 2). Таким образом, аллельный полиморфизм T-330G гена IL2 оказывает влияние на уровень секреции IL-2. Наличие в генотипе человека генотипа GG полиморфного участка T-330G гена IL2 ассоциировано с низким уровнем продукции соответствующего белка, что может быть фактором риска развития ТБ, учитывая важную роль IL-2 в реакциях противотуберкулезного иммунитета как основного Т-клеточного фактора роста.

Другим ключевым провоспалительным и иммунорегуляторным цитокином, характеризующим эффективность ответа на МБТ при туберкулезной инфекции, является IFN γ . Повышение содержания IFN γ в цельной крови используется как тест, альтернативный туберкулиновой пробе. Известно, что наличие аллеля +874T в гене IFNG ассоциировано с повышенной экспрессией гена и, следовательно, с активацией продукции IFN γ [4, 9]. Полиморфизм +874A/T гена IFNG (замена аденина на тимин) связан с восприим-

чивостью к ТБ [4, 6]. Поскольку полиморфный сайт +874A/T находится в интроне гена IFNG, мы исследовали зависимость секреции IFN γ от аллельных вариантов соответствующего гена, которая в среднем у больных ТБ была выше нормы (табл. 3). Показано, что наиболее низкий уровень секреции IFN γ определяется у носителей гомозиготного AA варианта (табл. 3). Очевидно, что генетически детерминированная гипосекреция IFN γ – неблагоприятный фактор, потому как опосредует ослабление эффекторной функции макрофагов и их превращение из бактерицидных клеток в «резервуар» микобактериальной инфекции [8, 10, 12]. Ввиду того, что у больных ТБ гиперсекреция IFN γ *in vitro* регистрировалась вне зависимости от генотипов полиморфизма +874A/T гена IFNG (в том числе сочеталась с носительством «низкопродуцирующего» генотипа AA), можно полагать, что она не связана с данным полиморфизмом гена IFNG. По-видимому, она является результатом высокой иммуногенности *M. tuberculosis* и активирующего действия возбудителя ТБ на клетки-продуценты IFN γ . Известно, что регуляция первичной транскрипции, экспрессии и, как следствие, функциональный полиморфизм генов цитокинов во многом связаны с явлением альтернативного сплайсинга. В результате образуются разные матричные РНК и разные белки одного первичного транскрипта с различной функциональной активностью [7].

Таким образом, функциональный полиморфизм генов провоспалительных цитокинов TNF α , IL-2 и IFN γ является существенным фактором дисрегуляции секреторной функции иммунокомпетентных клеток, в связи с чем может предрасполагать не только к развитию ТБ, но и к утяжелению и прогрессированию его течения. В то же время пока не ясно, какие мутации и каких именно генов имеют решающее значение. Вероятно, большую роль играют не столько отдельные аллели генов, сколько их сочетания. Перспективное направление иммуногенетических исследований цитокинов – изучение роли сочетаний аллелей в подверженности к инфицированию и длительному пребыванию возбудителя инфекции в организме.

Список литературы / References

1. Абрамов Д.Д., Кофиади И.А., Уткин К.В., Трофимов Д.Ю., Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Полиморфизм одиночных нуклеотидов в генах цитокинов и их рецепторов: биологический эффект и методы идентификации // Иммунология, 2011. № 5. С. 275-280. [Abramov D.D., Kofadi I.A., Utkin K.V., Trofimov D.Yu., Khaitov R.M., Alekseev L.P. Single nucleotide polymorphism in the genes of cytokines and their receptors: biological effects and methods of identification. *Immunologiya = Immunology*, 2011, no. 5, pp. 275-280. (In Russ.)]
2. Тарабаева А.С., Ракишева А.С., Абиляева А.А., Омеляненко С.М., Ли В. Роль цитокинов Т-хелперов в патогенезе туберкулеза // Цитокины и воспаление, 2016. Т. 15, № 2. С. 140-147. [Tarabayeva A.S., Rakisheva A.S., Abilbayeva A.A., Omelyanenko S.M., Li V. The role of helper T-cell cytokines in the tuberculosis pathogenesis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2016, Vol. 15, no. 2, pp. 140-147. (In Russ.)]

3. Ates O., Mussellim B., Ongen G., Topal-Sarikaya A. Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- α genes polymorphisms in tuberculosis. *J. Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 28, pp. 232-236.
4. Bream J.H., Carrington M., O'Toole S., Dean M., Gerrard B., Shin H.D., Kosack D., Modi W., Young H.A., Smith M.W. Polymorphisms of the human *IFNG* gene noncoding regions. *Immunogenetics*, 2000, Vol. 51, pp. 50-58.
5. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V. The role of Foxp3-expressing regulatory T-cells and T-helpers in immunopathogenesis of multi-drug resistant pulmonary tuberculosis. *Hindawi Publishing Corporation, Tuberculosis Research and Treatment*, 2012, Vol. 2012, 931291, p. 9. doi: 10.1155/2012/931291.
6. Henaio M.I., Montes C., Paris S.C., Garcia L.F. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis*, 2006, Vol. 86, pp. 11-19.
7. Kalsotra A., Cooper T.A. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nat. Rev. Genet.*, 2011, Vol. 12, no. 10, pp. 715-729.
8. Lerner T.R., Griffiths G., Gutierrez M.G. Lymphatic endothelial cells are a replicative niche for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Invest.*, 2017, Vol. 126, no. 3, pp. 1093-1108.
9. Mansouri F., Heydarzadeh R., Yousefi S. The association of interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-17 single-nucleotide polymorphisms with susceptibility to tuberculosis. *APMIS*, 2018, Vol. 126, no. 3, pp. 227-233.
10. Saini A., Mahajan S., Ahuja N., Bhagyaraj E., Kalra R., Janmeja A.K., Gupta P. An accord of nuclear receptor expression in *M. tuberculosis* infected macrophages and dendritic cells. *Scientific Reports*, 2018, Vol. 8, 2296. doi:10.1038/s41598-018-20769-4.
11. Wang S., Wei M., Han Y., Zhang K., He L., Yang Z., Su B., Zhang Z., Hu Y., Hui W. Roles of TNF- α gene polymorphisms in the occurrence and progress of SARS-Cov infection: A case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 2008, Vol. 8, no. 27 (2), pp. 1-10.
12. Yang R., Yang E., Shen L., Modlin R.L., Shen H., Chen Z.W. IL-12+IL-18 cosignaling in human macrophages and lung epithelial cells activates cathelicidin and autophagy, inhibiting intracellular mycobacterial growth. *J. Immunol.*, 2018, pii: ji1701073. doi: 10.4049/jimmunol.1701073.

Авторы:

Чурина Е.Г. — д.м.н., профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры органической химии, ведущий научный сотрудник лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия

Уразова О.И. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Новицкий В.В. — д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки России, профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Ситникова А.В. — аспирант кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Бармина С.Э. — к.м.н., доцент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Authors:

Churina E.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University; Professor, Department of Organic Chemistry, Leading Research Associate, Laboratory of Translational Cellular and Molecular Biomedicine, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

Urazova O.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Novitskiy V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Honored Scientist of Russia, Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Sitnikova A.V., Postgraduate Student, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Barmina S.E., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 21.03.2018

Отправлена на доработку 05.04.2018

Принята к печати 09.04.2018

Received 21.03.2018

Revision received 05.04.2018

Accepted 09.04.2018