

# АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

Сухаленцева Н.А., Наследникова И.О., Чернов А.С.,  
Решетников В.И., Уразова О.И., Новицкий В.В.,  
Урозаева М.В., Чернова Е.Н., Никулина Е.Л.,  
Воронкова О.В.

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

ГУЗ «Томский областной центр профилактики и борьбы со СПИД и другими инфекционными заболеваниями»  
Департамента Здравоохранения Администрации Томской области, г. Томск

**Резюме.** Проведена оценка характера распределения аллельных вариантов генов цитокинов у 184 пациентов с медленными вирусными инфекциями (97 пациентов с хронической герпетической инфекцией и 87 ВИЧ-инфицированных пациентов). С использованием современных иммуногенетических методов было установлено, что степень риска рецидивирующего течения и неблагоприятного исхода инфекции положительно ассоциирована с генотипом AA промоторного региона и генотипом AA промоторного региона +874A/T гена IFNG. Иммуногенетическим фактором, обладающим протективным эффектом в отношении медленных вирусных инфекций, является аллель G участка G-308A гена TNFA, а также аллель T и генотип TT промоторного региона +874A/T гена IFNG.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, полиморфизм генов цитокинов, интерлейкин-2, интерлейкин-4

*Sukhalentseva N.A., Naslednikova I.O., Chernov A.S., Reshetnikov V.I., Urazova O.I., Novitsky V.V., Urozaeva M.V., Chernova E.N., Nikulina E.L., Voronkova O.V.*

## ANALYSIS OF POLYMORPHIC VARIANTS OF CYTOKINE GENES IN PATIENTS WITH HIV INFECTION

**Abstract.** A distribution mode for allelic variants of cytokine genes was evaluated in 184 patients with slow viral infections, including 97 patients with chronic herpetic infection and 87 HIV-infected patients. Using modern methods of immunogenetics, we have found that relative risks of recurrent course and poor outcome of infection are positively associated with AA promoter region genotype and AA promoter genotype of +874 A/T polymorphism in the IFNG gene. Immunogenetic factors associated with protective effect in slow virus infections, include G allele of TNFA gene (G-308A SNP), and T allele/TT genotype of promoter region in the IFNG gene (+874 A/T SNP). (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 1, pp 79-82)

**Keywords:** HIV infection, cytokine gene polymorphism, interleukin-2, interleukin-4

## Введение

В связи с высокой заболеваемостью, широким распространением среди трудоспособного населения, недостаточной эффективностью современных методов диагностики, профилак-

### 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

ки и терапии, проблема ВИЧ-инфекции приобретает все большую актуальность в современной медицине [6]. По ряду особенностей развития ВИЧ-инфекции, изменению количественных и функциональных показателей иммунной системы различают медленно прогрессирующий (содержание CD4 выше  $400 \times 10^6/\text{л}$  в течение 6 лет и более) и быстро прогрессирующий (содержание CD4 менее  $200 \times 10^6/\text{л}$  в течение 5 лет) варианты течения [5]. Исследования последних лет доказывают, что восприимчивость к инфек-

ционным агентам является генетически детерминированной: подверженность заболеванию зависит от определенных аллельных вариантов генов, формирующих неблагоприятный наследственный фон [1, 7]. Поиск маркеров восприимчивости к ВИЧ-инфекции среди аллелей генов цитокинов — новый, перспективный раздел исследований. В связи с этим **цель настоящего исследования** — идентифицировать иммуногенетические маркеры ВИЧ-инфекции на основании анализа аллельного полиморфизма генов цитокинов.

## Материалы и методы

В программу исследования вошли 87 пациентов (53 мужчины и 34 женщины в возрасте от 18 до 50 лет) с ВИЧ-инфекцией. Верификация диагноза проводилась на основании лабораторных исследований: обнаружения специфических антител к суммарным вирусоспецифическим антигенам ВИЧ с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), с последующим подтверждением наличия антител к антигенам ВИЧ (p24, p31, p55, p64, p120) в иммуноблоте «Western Blot». Контрольную группу составили 93 практически здоровых донора с аналогичными характеристиками по полу и возрасту. В ходе серологического анализа сыворотки крови подтверждалось отсутствие специфических антител к суммарным вирусоспецифическим антигенам ВИЧ. Исследовали стабилизированную венозную кровь, взятую утром до приема пищи.

Выделение ДНК из периферической крови проводили сорбентным методом согласно инструкции, прилагаемой к коммерческому набору «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия). Исследование полиморфных участков генов цитокинов проводили с использованием аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР). Были исследованы два полиморфных варианта двух цитокинов: T-330G интерлейкина (IL) 2, C-590T IL-4, локализованных в промоторных участках соответствующих генов. 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).

После проведения ПЦР 8 мкл амплификата разделяли в 2% агарозном геле, содержащем 0,5 мг/мл этидиум бромид, при напряжении 150 В в течение нескольких мин для последую-

щей визуализации в ультрафиолетовом свете, подтверждающей наличие продукта амплификации. В качестве маркера размера ДНК использовали плазмиду pUC19, расщепленную рестриктазой MspI («Сибэнзим», Россия).

Для анализа ассоциации маркеров исследуемых генов с вирусной инфекцией сравнивали частоты аллелей и генотипов в группах больных и здоровых индивидов, используя критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность. Об ассоциации разных генотипов и аллелей с заболеванием судили по величине отношения шансов (odds ratio (OR)) с расчетом для него 95% доверительного интервала (CI), который показывает, во сколько раз выше для индивида с определенным генотипом вероятность прогрессирования и неблагоприятного исхода инфекции. При OR = 1 судили об отсутствии связи между сравниваемыми факторами, при OR < 1 — об отрицательной связи и при OR > 1 — о положительной связи признаков.

## Результаты и обсуждение

Известно, что наследственная подверженность к инфекционным заболеваниям обусловлена, с одной стороны, относительно редкими генетическими дефектами, приводящими к иммунодефицитам, с другой стороны — сочетаниями у индивида «нормальных» аллелей генов, по отдельности имеющих слабый эффект, но в совокупности приводящих к формированию особенностей иммунитета, предрасполагающих к развитию инфекционного процесса [7].

Как показали результаты проведенного иммуногенетического исследования, распределение аллелей и генотипов исследованных полиморфных участков генов цитокинов среди ВИЧ-инфицированных больных и здоровых доноров статистически значимо различалось. Анализ аллельного полиморфизма T-330G промоторного участка гена IL-2 позволил установить, что среди здоровых доноров преобладал генотип ТТ (59%), гетерозиготный вариант TG обнаруживался в 34% случаев, GG — у 7% (табл. 1). Среди пациентов с ВИЧ-инфекцией гетерозиготный генотип TG встречался в 53% случаев, гомозиготный вариант GG — 6%, а ТТ — 40%. Степень риска прогрессирования, рецидивирующего течения и неблагоприятного ВИЧ-инфекции была положительно ассоциирована с аллелем G (OR = 1,56) промоторного региона T-330G гена IL-2. Аллель Т (OR = 0,64) и гомозиготный генотип ТТ (OR = 0,47) полиморфизма T-330G гена IL-2 обуславливали протективный эффект в отношении быстрого прогрессирования ВИЧ-

**ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФИЗМА Т-330G ГЕНА IL-2 СРЕДИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ**

Регистрируемый показатель	Здоровые доноры, (% абс.)	Пациенты с ВИЧ-инфекцией, (% абс.)	$\chi^2$	OR (95% CI)
ТТ	59 (55)	40 (35)	4,88 $p < 0,05$	0,47 (0,26-0,86)
TG	34 (32)	53 (47)	3,72 $p < 0,05$	2,24 (1,24-4,13)
GG	7 (6)	6 (5)	0,08 $p > 0,05$	0,85 (0,24-2,94)
T	76 (142)	67 (117)	1,99 $p < 0,05$	0,64 (0,33-1,25)
G	24 (44)	33 (57)		1,56 (0,8-3,04)

**Примечание.** Здесь и в таблице 2:  $p$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с значениями здоровых доноров;  $\chi^2$  – стандартный критерий Пирсона; OR – критерий отношения шансов с 95% доверительным интервалом.

инфекции (табл. 1). Известно, что Т-лимфоциты с генотипом ТТ по полиморфизму Т-330G гена IL-2 в условиях *in vitro* способны к повышенной продукции IL-2 [3]. Многие ученые указывают на снижение продукции IL-2 при прогрессировании медленных вирусных инфекций, что вызывает смещение баланса в пользу Th2 и является частью стратегии выживания вируса [3, 4, 8].

В ходе дальнейшего иммуногенетического исследования распределения аллелей и генотипов полиморфизма С-590Т гена IL-4 среди здоровых лиц было выявлено преобладание гетерозиготного генотипа СТ (70%) над гомозиготными вариантами СС (26%) и ТТ (4%) (табл. 2). Среди пациентов с ВИЧ-инфекцией генотип СТ промоторного региона С-590Т гена IL-4 встречался у 37% обследованных, вариант ТТ – у 6%, преобладающим оказался гомозиготный генотип СС (57%). Зарегистрированное у пациентов с ВИЧ-инфекцией увеличение частоты генотипа СС промоторного

региона С-590Т гена IL-4, по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых лиц, указывало на его положительную ассоциацию (OR = 3,77) с риском быстрого прогрессирования заболевания (табл. 2). В настоящее время доказано, что полиморфизм С-590Т в промоторном регионе определяет уровень продукции IL-4, промотор с заменой -590Т является более активным, менее прочно связывается с транскрипционными факторами, а ген IL-4 чаще подвергается транскрипции. В конечном итоге гуморальный иммунный ответ становится преобладающим в реализации специфической реакции на антиген [2]. Противовоспалительный IL-4, являясь продуктом CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов с фенотипом Th2, выступает в качестве антагониста Т-активирующих цитокинов, способствуя тем самым поляризации иммунного ответа в направлении гуморального типа реагирования [2, 4, 7].

**ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФИЗМА С-590Т ГЕНА IL-4 СРЕДИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ**

Регистрируемый показатель	Здоровые доноры, (% абс.)	Пациенты с ВИЧ-инфекцией, (% абс.)	$\chi^2$	OR (95% CI)
СС	26 (24)	57 (50)	5,84 $p < 0,05$	3,77 (1,99-7,18)
СТ	70 (66)	37 (32)	4,96 $p < 0,05$	0,25 (0,13-0,47)
ТТ	4 (3)	6 (5)	0,42 $p > 0,05$	1,53 (0,37-6,71)
С	61 (114)	76 (132)	5,21 $p > 0,05$	2,02 (1,05-3,90)
Т	39 (72)	24 (42)		0,49 (0,26-0,95)

Наличие индивидов, подверженных и неподверженных развитию определенного заболевания, является основой формирования феномена резистентности/предрасположенности к быстрому прогрессированию ВИЧ-инфекции при контакте индивида с ее возбудителем, важную роль в котором играют генетические факторы. Генетическая детерминированность функционирования иммунной системы и отдельных ее звеньев в ответ на вирусные антигены определяется аллельными вариантами генов цитокинов.

Таким образом, нами показано, что распределение аллельных вариантов генов цитокинов среди пациентов с ВИЧ-инфекцией характеризуется доминированием генотипа TG полиморфизма T-330G гена IL-2 и генотипа CC полиморфного участка C-590T гена IL-4. Иммуногенетическим фактором, обладающим протективным эффектом в отношении подверженности к прогрессивному течению ВИЧ-инфекции, является аллель T и гомозиготный генотип TT полиморфизма T-330G гена IL-2. Степень риска быстрого прогрессирования и неблагоприятного исхода ВИЧ-инфекции положительно ассоциирована с аллелем G промоторного региона T-330G ген IL-2, а также с гомозиготным генотипом CC промоторного региона C-590T гена IL-4.

Исследование выполнено в рамках 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. Альтернативный сплайсинг в формировании структуры системы цитокинов // Система цитокинов: Теоретические и клинические аспекты / Под. ред. В.А. Козлова, С.В. Сенникова. — Новосибирск: Наука, 2004. — С. 7-23.
2. Коненков В.И., Смольникова М.В. Полиморфизм промоторных регионов генов IL4 и 10 и фактора некроза опухолей  $\alpha$  у ВИЧ-инфицированных // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2002. — № 4. — С. 449-451.
3. Соколова Ю.В., Сизякина Л.П. Особенности секреции цитокинов и их рецепции в динамике ВИЧ-инфекции // Иммунология. — 2007. — № 6. — С. 324-327.
4. Shrestha S., Strathdee S.A., Galai N. Behavioral Risk Exposure and Host Genetics of Susceptibility to HIV-1 Infection // The Journal of Infectious Diseases. — 2006. — N 193. — P. 16-26.
5. Blackwell J.M. Genetics and genomics of infectious disease susceptibility // Trends in Mol. Med. — 2001. — Vol. 7, N 11. — P. 521-526.
6. Fauci A.S. HIV and AIDS: 20 years of science // Nature Medicine. — 2003. — Vol. 9. — P. 839-843.
7. Ollier W.E. Cytokine genes and disease susceptibility // Cytokine. — 2004. — Vol. 4-5. — P. 174-178.
8. Mogensen T.H., Paludan S.R. Molecular Pathways in Virus-Induced Cytokine Production // Microbiol. and Biol. Rev. — 2001. — Vol. 65, N 1. — P. 131-150.

поступила в редакцию 31.05.2010

отправлена на доработку 16.06.2010

принята к печати 23.06.2010