

АНАЛИЗ АССОЦИИРОВАННОСТИ АЛЛЕЛЕЙ ПРОМОТОРНЫХ РЕГИОНОВ ГЕНОВ TNFA, IL2, IL4 И IL10 С ПАРАМЕТРАМИ СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Смольникова М.В., Кожевников В.С., Коненков В.И.

Государственное учреждение Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск

Резюме. В процессе изучения ассоциированности аллельного полиморфизма генов с уровнем продукции цитокинов происходит определение основывающихся процессов на генетическом уровне, приводящих к различиям в иммунном ответе путем определения взаимосвязи между индивидуальными полиморфными аллелями, а также гаплотипами генов цитокинов и продукцией белкового продукта *in vitro*. Проанализирован характер ассоциированности основных показателей гуморального и клеточного иммунитета, а также уровня провоспалительных (*TNFA* и *IL2*) и противовоспалительных (*IL4* и *IL10*) цитокинов с аллельными вариантами промоторных регионов генов указанных цитокинов у ВИЧ-инфицированных лиц в сравнении со здоровыми жителями России европеоидного происхождения. В работе были проведены генотипирование и исследование показателей гуморального и клеточного иммунитета у 127 ВИЧ-инфицированных пациентов и 52 доноров в качестве контроля. Для изучения спонтанной и ConA-стимулированной продукции цитокинов в кондиционных средах от мононуклеарных клеток ряда обследованных лиц применяли метод иммуноферментного анализа. Суммируя полученные в ходе проведенной работы данные, можно заключить, что аллели -308A *TNFA*, -330T *IL2*, -592A *IL10* более характерны для ВИЧ-инфицированных пациентов с выраженным снижением клеточного провоспалительного компонента иммунитета и повышенной активностью В-клеточного звена по сравнению с лицами, несущими альтернативные генные варианты. В целом надо отметить, что указанные генные варианты обуславливают общую подверженность более тяжелому течению заболевания, оказывая плейотропное влияние на уровень ряда патогенетически важных для ВИЧ показателей.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, продукция цитокинов, иммунный статус, полиморфизм генов, темп прогрессии.

Smolnikova M.V., Kozhevnikov V.S., Konenkov V.I.

ANALYSIS OF ASSOCIATIONS BETWEEN PROMOTER ALLELES OF TNFA, IL2, IL4 AND IL10, AND PARAMETERS OF IMMUNE SYSTEM IN HIV-INFECTED PATIENTS

Abstract. Establishment of basic processes leading to differences in immune response at genetic level occurs in the course of studying associations between certain polymorphic alleles, as well as evaluation of correlations between the haplotypes of cytokine genes, and specific protein production *in vitro*. The features of association between main parameters of humoral and cellular immunity, as well as levels of pro-inflammatory (*TNFA* и *IL2*) and anti-inflammatory (*IL4* и *IL10*) cytokines with allelic variants of promoter regions of the mentioned genes were analyzed in HIV-infected patients, as compared with healthy Russian population of Caucasoid origin. In present work, we have performed genotyping, along with evaluation of humoral and cellular immunity, in 127 HIV-infected patients, and 52 donors served as a control group. To determine spontaneous and ConA-stimulated cytokine production in some patients, ELISA technique was used for assays with conditioned media from mononuclear cells. From the data obtained one may be

Адрес для переписки:

Коненков Владимир Иосифович,
630117, г. Новосибирск, ул. акад. Тимакова, д.2
ГУ НИИ Клинической и Экспериментальной
Лимфологии СО РАМН.
Тел.: (383) 332-31-83, факс (383)332-95-31.
E-mail: konenkov@soramn.ru

inferred, that 308A *TNFA*, -330T *IL2*, -592A *IL10* alleles are more characteristic to the HIV-infected patients with decreased cellular pro-inflammatory component of immunity, and increased activity of B-cell immunity, in comparison with persons carrying other gene variants. In general, it should be stressed that the mentioned genes variants may determine general susceptibility for more severe course of disease, exerting some pleiotropic action upon some pathogenetically important parameters of HIV. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 5-6, pp 659-666)

Введение

Основным фактором, приводящим к развитию СПИД у ВИЧ-инфицированных людей, является нарушение нормального функционирования иммунной системы человека. К настоящему времени не получены четкие данные о степени вовлеченности провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, уровня их продукции и содержания в тканях в процессе угнетения работы основных функций иммунной системы при прогрессировании ВИЧ, а также влияние на этот процесс полиморфных генов этих иммуномодуляторов.

Цитокины человека (интерлейкины, факторы роста, интерфероны, хемокины и другие иммуноактивные факторы) составляют сеть, характеризующуюся сложными взаимодействиями друг с другом, а также с другими активными молекулами на разных уровнях организации организма человека. Тем самым усложняется анализ функций отдельных цитокинов в качестве моделей для исследования влияния их генов, а также непосредственно белкового продукта этих генов на формирование иммунной реакции на внешние или аутологичные воздействия [12, 14, 18]. Существуют значительные индивидуальные и этнические различия в продукции цитокинов [4]. Различия между максимальным и минимальным уровнями продукции некоторых цитокинов часто достигают десятикратных величин, и эти показатели постоянны в разные промежутки времени [10].

В процессе изучения ассоциированности аллельного полиморфизма генов с уровнем продукции цитокинов происходит определение взаимосвязи между индивидуальными полиморфными аллелями, а также гаплотипами генов цитокинов и продукцией белкового продукта *in vitro* [6, 17]. Важная роль иммуномодуляторов в патогенезе ВИЧ-инфекции проявляется в регуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток у инфицированных пациентов, играющего основную роль в формировании иммуносупрессии, причиной чего является гиперпродукция $TNF\alpha$, IL-4, IL-6, IL-10, стимулирующих запрограммированную клеточную смерть, и низкое содержание IL-2, IL-12, TGF β , оказывающих протективное действие на клетки [5]. Кроме этого, цитокины оказывают влияние на репликацию ВИЧ в организме, а дисбаланс продуцируемых Th1 и Th2 лимфоцитами цитокинов оказывает влияние на силу ответа иммунной системы на антигены вируса.

Целью данной работы было изучение различий в иммунной реакции организма человека на ВИЧ-инфекцию, и ассоциации этих различий с полиморфизмом генов цитокинов человека. Нами проанализирован характер ассоциированности основных показателей гуморального и клеточного иммунитета, а также уровня провоспалительных (*TNFA* и *IL2*) и противовоспалительных (*IL4* и *IL10*) цитокинов с аллельными вариантами промоторных регионов генов указанных цитокинов у ВИЧ-инфицированных лиц. Для сравнения полученных данных с нормативными показателями иммунного статуса и распределения аллельных вариантов генов цитокинов было проведено сравнительное обследование здоровых жителей России европеоидного происхождения.

Материалы и методы

Группы

В ходе работы было обследовано 127 ВИЧ-инфицированных пациентов на разных стадиях заболевания. Клиническая диагностика, определение стадий ВИЧ-инфекции у пациентов проводились по классификации Покровского В.И. (1989). Количество пациентов, находящихся на 2-й стадии заболевания было 67 человек, из них в стадии 2А - 5 человек (3,9%), в стадии 2Б - 28 (22,1%), в стадии 2В - 34 (26,8%); на 3-й стадии находилось 60 человек, из них в стадии 3А - 33 (26%), в стадии 3Б - 20 (15,7%), в стадии 3В - 7 (5,5%). Критерием отбора пациентов для исследования служило наличие у них антител к ВИЧ-1, обнаруженных в сыворотке крови с помощью тест-систем "Serodia" ("Fujirebio Inc.", Japan) и "Vironostica HIV-1 AG/AB" ("Organon-Technica", France). Контрольную группу составили 52 здоровых индивида, у которых антитела к ВИЧ обнаружены не были. Изучаемые группы были подобраны с учетом соответствия по полу, возрасту и этническому происхождению. В состав групп входили пациенты и здоровые лица мужского и женского пола европеоидного происхождения (в трех поколениях), на момент исследования в возрасте от 20 до 50 лет.

Генотипирование цитокинов

Все ВИЧ-инфицированные (n=127) и здоровые лица (n=52) были прогенотипированы на четыре однонуклеотидных замены (SNP) в промоторных регионах генов: *TNFA* (G-308A), *IL2* (T-330G), *IL4*

(С-590Т), *IL10* (С-597А). Генотипирование аллельных вариантов осуществляли методом рестриктивного анализа продуктов амплификации специфических участков генома по описанным ранее методикам [3, 21].

Определение уровня продукции цитокинов

Для изучения продукции цитокинов в кондиционных средах от клеток пациентов, мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из гепаринизированной венозной крови путем ее центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина. Клетки культивировали в конечной концентрации 1×10^6 кл/мл в 24 луночных планшетах в течение 48 часов в полной среде RPMI-1640 и 10% FCS (телячья эмбриональная сыворотка) при температуре 37°C и при концентрации CO_2 5%, как описано ранее [19]. Клетки стимулировали *ConA*, добавленным в конечной концентрации 10 мкг/мл. Супернатанты от клеточных культур хранили при -70°C до момента анализа.

Измерение спонтанной и стимулированной *ConA* продукции цитокинов в супернатантах было осуществлено у части ВИЧ-инфицированных ($n=30$) и здоровых лиц ($n=15$) с помощью иммуноферментного метода. В ходе работы использовались тест-системы "ProCon TNF α " K050 с чувствительностью от 10 до 2000 пкг/мл, "ProCon IL-2" K100 с чувствительностью от 0,3 до 20 МЕ/мл («Протеиновый контур», С.-Петербург) и "CYTELISATM Human IL-4"; "CYTELISATM Human IL-10" с чувствительностью от 8 до 500 пкг/мл ("Cytimmune Sciences Inc.", USA). Процедуры определения проводили в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Учет результатов проводили на автоматическом спектрофотометре "Multiscan MS" (Labsystem) при длине волны 450 и 490 нм для российских и американских тест-систем соответственно. Полученные результаты считали с использованием программы "MultiCalc" (USA).

Оценка иммунного статуса

Для характеристики состояния иммунитета у всех ВИЧ-инфицированных ($n=127$) пациентов и здоровых лиц ($n=52$) была осуществлена оценка основных параметров иммунного статуса, включающая исследования гуморального и клеточного иммунитета, а также неспецифическую резистентность организма.

Количественные методы оценки Т-, В-клеточных звеньев иммунной системы и NK-клеток включали определение субпопуляций CD3, CD4, CD8, CD16 и CD20-позитивных лимфоцитов методом непрямой проточной цитометрии с помощью цито-

метра "FACSCalibur" (Becton Dickinson, USA) в программе CellQuest SoftwareTM ("Becton Dickinson", USA). Кроме этого, у инфицированных лиц определяли CD95 - маркер поздней активации клеток и готовности их к апоптозу. У ВИЧ-инфицированных оценивали функциональную активность Т-лимфоцитов в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) по методу Strong et al (1973), Woody et al (1975). Функциональное состояние В-лимфоцитов оценивалось по содержанию иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG) в сыворотке крови методом радиальной иммунодиффузии по Манчини с использованием тест-систем "Диагностикум" (Институт иммунологии МЗ РФ, Москва). Определение количества циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови проводили турбодиметрическим методом [8]. Для оценки состояния фагоцитарного звена у ВИЧ-инфицированных изучали интенсивность окислительно-восстановительных процессов МНК в НСТ-тесте (Т.В. Михеенко с соавт., 1991). В дополнение к этому у ВИЧ-инфицированных анализировали специфические тесты: титр ВИЧ-антител для оценки гуморального звена иммунитета; уровень провирусной нагрузки мононуклеаров периферической крови (PVL) и показатель аффинности (RHAV), который характеризует активность Fab-фрагмента (аффинность анти-ВИЧ - антител) [13].

Статистическая обработка данных

Все расчеты проводили с помощью программ «STATISTICA for Windows 5,0» и «Microsoft Excel 97».

Результаты

Было показано, что у здоровых индивидов МНК с генотипом G/G промоторного участка G-308A гена *TNFA* в среднем спонтанно продуцировали $18,4 \pm 7,9$ pg/ml фактора некроза опухоли альфа. Уровень прироста индуцированной *ConA* продукции достигал $1175,9 \pm 112,2$ pg/ml TNF α , что достоверно значительно выше исходного уровня ($p=0,000007$) (табл.1). У ВИЧ-инфицированных пациентов, имеющих генотип G/A, исходный уровень TNF α был несколько ниже, чем у пациентов с гомозиготным вариантом. Показан более низкий ответ на стимуляцию митогеном у инфицированных лиц с генотипом G/A по сравнению с носителями G/G, и степень индукции *ConA* клеток этих индивидов была снижена. Мононуклеарные клетки ВИЧ-инфицированных пациентов с G/G генотипом спонтанно продуцировали более высокий уровень TNF α , чем здоровые лица, имеющие этот вариант гена ($p<0,05$). Однако уровень их ответа на индукцию митогеном был на порядок ниже по сравнению со здоровыми лицами ($p=0,0064$).

В результате анализа супернатантов культур клеток здоровых и инфицированных лиц нами было установлено, что МНК ВИЧ-инфицированных лиц продуцировали меньшие количества как спонтанного, так и *ConA* стимулированного уровня IL-2 по сравнению с донорами независимо от носительства того или иного генотипа T-330G *IL2*. Уровень стимулированной *ConA* продукции IL-2 у здоровых лиц, носителей генотипа T/G ($40,9 \pm 4,3$ МЕ/ml), двукратно превышал исходный уровень белка у носителей этого генотипа ($21,4 \pm 3,7$ МЕ/ml) в отличие от величины митогенстимулированного фактора у носителей T/T гомозиготного варианта ($p=0,0841$). У ВИЧ-инфицированных лиц, имеющих генотип T/T, стимуляция МНК митогеном приводила к трехкратному статистически значимому повышению уровня IL-2 по отношению к исходному ($p=0,0013$). У ВИЧ-инфицированных лиц уровень спонтанной продукции IL-2 был значимо ниже, чем у доноров, носителей варианта T/T ($p=0,0092$), а у пациентов с гетерозиготным генотипом наблюдалось двукратное снижение IL-2 по сравнению с донорами ($p<0,05$). Клетки инфицированных лиц в ответ на стимуляцию *ConA* продуцировали количества IL-2, сходные по уровню со спонтанной продукцией клеток здоровых лиц в случае носительства обоих генотипов. Стимуляция МНК инфицированных лиц приводила к статистически значимо более низкой продукции IL-2 по сравнению с донорами, имеющими T/T ($p=0,0215$) и T/G ($p=0,0404$) варианты полиморфного участка T-330G гена (табл.1).

Здоровые носители C/C и C/T генотипов промоторного локуса C-590T гена *IL4* имели сходный уровень спонтанной продукции IL-4 в супернатантах МНК периферической крови, однако стимуляция *ConA* приводила к 2,5-кратному возрастанию продукции IL-4 только клетками с генотипом C/C ($p=0,0023$), тогда как у лиц с генотипом C/T индукция прироста продукции белкового продукта МНК не происходила, степень стимуляции у них была минимальна. У ВИЧ-инфицированных пациентов уровень спонтанной продукции IL-4 у носителей разных генотипов полиморфного локуса C-590T не отличался друг от друга. Прирост уровня IL-4 на стимуляцию *ConA* был статистически значим у носителей C/C и C/T по отношению к исходному ($p=0,0008$ и $p=0,0015$ соответственно). Исходная и стимулированная продукция интерлейкина МНК инфицированных носителей генотипа C/T была несколько ниже, чем у носителей C/C генотипа гена *IL4*. У ВИЧ-инфицированных лиц, имеющих как C/C, так и C/T генотип *IL4*, уровень спонтанной продукции IL-4 не отличался от уровня, наблюдающегося у здоровых лиц, но закономерность прироста продукции IL-4 при стимуляции у них была менее выражена (табл. 1).

Мононуклеарные клетки здоровых носителей генотипа C/A локуса C-592A гена *IL10* спонтанно продуцировали в 5 раз больше IL-10 по сравнению с клетками лиц, имеющих генотип C/C ($p=0,0676$). Стимуляция митогеном приводила к статистически значимо высокому приросту уровня продукции фактора у носителей обоих генотипов. Однако у до-

Табл.1. УРОВЕНЬ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ В СРАВНЕНИИ СО ЗДОРОВЫМИ ЛИЦАМИ ЕВРОПЕОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Продукция цитокина, генотип	ВИЧ-инфицированные (n=30)	Здоровые лица (n=15)
TNF α -308 G/G, спонт (pg/ml)	67,9 \pm 37,9	18,4 \pm 7,9
TNF α -308 G/G, стимулир (pg/ml)	537,5 \pm 106,4**	1175,9 \pm 112,2
IL-2 -330 T/T, спонт (МЕ/ml)	8,2 \pm 2,1**	30,8 \pm 4,2
IL-2 -330 T/T, стимулир. (МЕ/ml)	26,7 \pm 4,3*	42,7 \pm 5,6
IL-2 -330 T/G, спонт (МЕ/ml)	11,4 \pm 3,6	21,4 \pm 3,7
IL-2 -330 T/G, стимулир (МЕ/ml)	22,4 \pm 5,3*	40,9 \pm 4,3
IL-10 -592 C/C, спонт (pg/ml)	78,7 \pm 14,6***	11,6 \pm 2,4
IL-10 -592 C/C, стимулир. (pg/ml)	194,6 \pm 25,9**	433,7 \pm 57,1
IL-10 -592 C/A, спонт (pg/ml)	76,6 \pm 26,5	63,5 \pm 30,8
IL-10 -592 C/A, стимулир (pg/ml)	188,6 \pm 39,7*	450,7 \pm 62,5

норов с генотипом С/С прирост продукции соответственно был в пять раз более выражен, чем у носителей альтернативного варианта. Мононуклеарные клетки ВИЧ-инфицированных лиц, носителей двух вариантов гена *IL10*, спонтанно продуцировали схожий уровень белкового продукта. Стимуляция митогеном приводила более чем к двукратному статистически значимому приросту продукции у лиц с С/С ($p=0,0002$) и С/А ($p=0,0249$) (табл.1). Клетки инфицированных пациентов с С/С генотипом гена *IL10* спонтанно продуцировали значительно более высокое количество белкового продукта по сравнению со здоровыми лицами, имеющими этот же вариант гена ($p=0,00004$). Однако уровень ответа на индукцию митогеном у ВИЧ-инфицированных пациентов, носителей генотипов С/С и С/А, был в 2 раза ниже по сравнению со здоровыми лицами ($p=0,0023$ и $p=0,019$ соответственно) и достигал только двукратного повышения по сравнению со спонтанной продукцией ИЛ-10.

При анализе средних значений показателей иммунного статуса в группе доноров нами показано, что у носителей разных генотипов полиморфных локусов генов *TNFA*, *IL2* и *IL4* эти величины параметров статистически значимо не отличались. У носителей разных генотипов полиморфного локуса гена *IL10* показано статистически значимое превышение среднего значения IgM у носителей генотипа С/С (1,9 г/л) по сравнению с носителями генотипа С/А (1,4 г/л), кроме этого, у носителей

генотипа С/А был отмечен более высокий уровень среднего значения IgA по сравнению с носителями генотипа С/С ($p=0,0537$) (данные не показаны).

Результаты анализа взаимосвязи аллельного полиморфизма генов исследуемых цитокинов с количественными показателями иммунного статуса в группе ВИЧ-инфицированных пациентов демонстрировали наличие ассоциации аллельных вариантов гена *TNFA* с некоторыми показателями как клеточного и гуморального, так и фагоцитарного звена иммунитета (табл. 2). Причем, носителей генотипа G/G отличало статистически значимое повышение абсолютного количества CD3⁺ и CD4⁺ клеток ($p=0,0047$ и $p=0,0038$ соответственно); повышение количества фагоцитирующих нейтрофилов в НСТ-тесте ($p=0,0208$) по сравнению с носителями G/A генотипа. Также было отмечено повышение количества иммуноглобулинов класса G ($p=0,0307$), которые имели тенденцию к увеличению на разных стадиях ВИЧ-инфицирования.

Анализ взаимосвязи аллельного полиморфизма гена *IL2* показал статистически значимое повышение у носителей генотипа T/G полиморфизма T-330G гена *IL2* показателей клеточного звена иммунитета (абсолютного количества CD3⁺, РБТЛ с ФГА, индекса РБТЛ) по сравнению с носителями генотипа T/T. Тогда как носители генотипа T/T отличались повышенной спонтанной интенсивностью кислородзависимого метаболизма нейтрофилов

Табл.2. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИЦ С РАЗНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ

Параметр	Генотип					
	TNFA G/G (n=58)	TNFA G/A (n=22)	IL2 T/T (n=43)	IL2 T/G (n=37)	IL10 C/C (n=47)	IL10 C/A (n=30)
CD3, 10 ⁹ /л	1,2±0,06	0,9±0,07**	0,9±0,06	1,2±0,07*	0,9±0,05	1,2±0,08*
CD4, 10 ⁹ /л	0,5±0,03	0,3±0,04**	0,3±0,03	0,4±0,04	25,0±1,6	23,6±1,5
CD8, 10 ⁹ /л	0,6±0,04	0,5±0,05	0,5±0,04	0,6±0,05	0,5±0,04	0,7±0,05*
IgG, г/л	12,9±0,3	11,9±0,3*	12,6±0,3	12,6±0,4	12,5±0,3	12,8±0,3
НСТ спонт	127,1±3,0	112,6±5,3*	127,0±4,1	119,2±3,3*	122,9±4,1	121,1±3,2
РБТЛ стимул	8993,5±940,3	7751,1±1840,8	6881,3±923,5	9890,0±1190,9*	8364,4±968,9	9468,0±1657,2
РБТЛ	37,9±3,0	27,6±4,3	30,4±3,2	40,6±4,0*	35,0±3,0	37,4±4,7

Примечание: средние значения указаны с ошибкой ($\bar{X} \pm S.E.$).

(НСТ спонт), оценивающей состояние фагоцитарного звена ($p=0,0358$).

Было отмечено статистически значимое повышение показателей абсолютного количества субпопуляций $CD3^+$ и $CD8^+$ у носителей С/А генотипа полиморфного локуса -597 гена *IL10* по сравнению с генотипом С/С ($1,2 \times 10^9$ / и $0,7 \times 10^9$ /л, соответственно) (табл. 2). Таким образом, патогенетически важный для ВИЧ-инфекции индекс отношения $CD4^+/CD8^+$ у лиц с генотипом С/А был несколько ниже, чем у носителей генотипа С/С.

Обсуждение

В результате исследований, проведенных в данной работе, нами были получены новые данные об ассоциированности аллельных вариантов генов провоспалительных (TNF α , IL-2) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов с основными параметрами оценки иммунной системы ВИЧ-инфицированных пациентов в сравнении с относительно здоровыми представителями европеоидного происхождения. В число исследованных показателей иммунного статуса входил уровень спонтанной и митогенстимулированной (ConA) продукции перечисленных цитокинов в культуральных жидкостях.

Отмеченный нами факт повышенной спонтанной продукции TNF α клетками инфицированных лиц по сравнению с МНК здоровых лиц может иметь важное значение в прогрессии заболевания, так как TNF α обладает способностью усиливать репликацию ВИЧ, находящегося в «дремлющем» состоянии в зараженных клетках и распространению инфекции в организме [7]. В исследованной группе ВИЧ-инфицированных наблюдалось снижение уровня TNF α в ответ на стимуляцию митогеном по сравнению с ответом стимулированных клеток здоровых лиц, причем более низкий ответ клеток носителей генотипа G/A (-308A - аллель, ассоциированный с повышением экспрессии гена [16]) может говорить о более деструктивном характере поражения их клеток под влиянием вируса и более глубокой иммуносупрессии.

Известно, что ВИЧ подавляет продукцию IL-2, встраиваясь в геном хозяина рядом с регуляторными последовательностями гена *IL2*, тем самым снижая его активность, кроме этого, продукт гена ВИЧ взаимодействует со структурой, в норме регулирующей экспрессию рецептора IL-2, и препятствует нормальному функционированию иммунорегулятора [2]. Нами показано, что у ВИЧ-инфицированных пациентов уровень IL-2 ниже, чем у доноров, причем наиболее низкая концентрация установлена у носителей T/T варианта. Учитывая, что этот аллельный вариант -330T имеет тенденцию к ассоциации с ВИЧ-инфекцией [21], можно предположить, что эта форма гена обладает более низкой по сравнению

с вариантом -330G способностью к экспрессии и обуславливает пониженную продукцию IL-2 у инфицированных лиц.

Резюмируя полученные ранее и описанные в литературе данные, можно было бы ожидать увеличения уровня продукции цитокина у носителей аллеля -590T [9, 15]. Тем более что наши результаты по распределению аллельных вариантов гена *IL4* показали повышенную частоту генотипа T/T среди инфицированных лиц и тенденцию к ассоциации аллеля -590T с ВИЧ-инфекцией [21].

В наших экспериментах показано увеличение спонтанного количества IL-10 у ВИЧ-инфицированных пациентов с С/С генотипом *IL10* по сравнению с донорами, имеющими этот же генотип, тогда как спонтанная продукция IL-2 клетками ВИЧ-инфицированных носителей T/T генотипа *IL2* ниже, чем у здоровых.

Известно, что происходящее при ВИЧ-инфекции угнетение функционирования иммунной системы человека, является следствием проникновения вируса в организм при непосредственной гибели (некроз и апоптоз) клеток крови, на которых экспрессируется рецептор CD4 в результате прямого разрушающего действия вируса при образовании и отпочковывании вирионов [11]. Как один из подтверждающих фактов этого заключения можно представить изученное нами статистически значимое снижение параметров клеточного звена (содержание CD3, CD4-позитивных клеток) у носителей генотипа G/A промотора гена *TNFA*, наиболее часто встречающегося у инфицированных лиц и, как отмечено выше, ассоциированного с инфекцией. Такой взаимосвязи следовало ожидать, учитывая характерное для ВИЧ снижение пролиферации $CD4^+$ лимфоцитов, приводящее к выраженной иммуносупрессии. В то же время этот генный вариант ассоциирован с несколько сниженным уровнем сывороточного IgG по сравнению с носителями генотипа G/G. Показано, что гипергаммаглобулинемия наблюдается по мере нарастания прогрессии инфекции в хронической фазе заболевания, причем 95% иммуноглобулинов является неспецифическими [1]. Это указывает на негативное значение генотипа G/A гена *TNFA* в характере течения ВИЧ-инфекции.

Очевидно, что в результате ВИЧ-инфекции T-лимфоциты носителей T/T генотипа, ассоциированного с заболеванием [21], более выражено утрачивают способность эффективно пролиферировать, тем более что у этих лиц нами показан более сниженный уровень продукции IL-2, чем у носителей варианта T/G гена *IL2*. Однако фагоциты инфицированных лиц с вариантом T/T гена *IL2* не утратили способность фагоцитировать клетки в НСТ-тесте по сравнению с лицами – носителями T/G варианта, что, по-видимому, можно связать со снижен-

ным количеством инфицированных субпопуляций лимфоцитов у этих пациентов.

Как нами показано, у носителей генотипа С/А полиморфного локуса -592 гена *IL10* происходит статистически значимое увеличение абсолютного числа CD3⁺ клеток по сравнению с гомозиготным вариантом С/С, вероятнее всего, за счет субпопуляции CD8⁺ лимфоцитов. В литературе указывается на сниженное количество CD4 позитивных клеток параллельно наблюдаемому низкому количеству IL-10 в клетках периферической крови ВИЧ-инфицированных лиц [20]. Среди группы обследованных нами пациентов с генотипом С/А *IL10* происходило характерное для неблагоприятного прогноза заболевания снижение индекса отношения хелперной и супрессорной субпопуляций лимфоцитов CD4⁺/CD8⁺ по сравнению с лицами, имеющими генотип С/С.

Суммируя полученные в ходе представленной работы данные, можно заключить, что аллели -308А *TNFA*, -330Т *IL2*, -592А *IL10* более характерны для ВИЧ-инфицированных пациентов с выраженным снижением клеточного провоспалительного компонента иммунитета и повышенной активностью В-клеточного звена по сравнению с лицами, несущими альтернативные генные варианты. В целом надо отметить, что указанные генные варианты обуславливают общую подверженность более тяжелому течению заболевания, оказывая плейотропное влияние на уровень ряда патогенетически важных для ВИЧ показателей.

Благодарности

Работа проведена частично за счет РФФИ (грант 02-04-48145).

Список литературы

1. Иммунодефицитные состояния / под ред. проф. Смирнова В.С., Фрейдли И.С. - СПб: Фолиант, 2000. - С.411-447.
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. - СПб: Гиппократ, 1992.- 256 с.
3. Смольникова М.В., Прокофьев В.Ф., Сизякина Л.П., Шемшур А.Б., Ольховский И.А., Коненков В.И. Аллельные варианты генов IL-4, IL-10 и TNF α при ВИЧ инфекции // Цитокины и воспаление. - 2002. - Т.1. - N1. - С.35-39.
4. Ярилин А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии // Иммунология. - 1997. - N5. - С. 7-14.
5. Ameisen J.C., Capron A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis // Immunol. Today.- 1991.- V.12(4).- P.102-105.
6. Bidwell J., Keen L., Gallageher G., Kimberly R., Huizinga T., McDermott M.F., Oksenberg J., McNi-

choll J., Pociot F., Hardt C., D'Alfonso S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases // Genes Immun. - 1999. - V.1. - P. 3-19.

7. Butera S.T. Cytokine involvement in viral permissiveness and the progression of HIV disease // J. Cell Biochem. - 1994. - N53. - P. 336-342.

8. Digeon M., Laver M., Riza J., Bach J.F. Detection of circulating immune complexes in human sera by simplified assays with polyethylene glycol // J. Immunol. Methods. - 1977. - V.16. - P. 165-183.

9. Foli A., Saville M.W., Baseler M.W., Yarchoan R. Effects of the Th1 and Th2 stimulatory cytokines interleukin-12 and interleukin-4 on human immunodeficiency virus replication // Blood. -1995. - V.85(8). - P.2114-2123.

10. Gandhi R., Chen B., Straus S., Dale J.K., Lenardo M.J., Baltimore D. HIV-1 directly kills CD4 T cells by a Fas-independent mechanism // J. Exp. Med.- 1998. - V.187(7). - P.1113-1122.

11. Hutchinson I.V., Pravica V., Hajeer A., Sinnott P.J. Identification of high and low responders to allografts // Rev Immunogenetics. -1999.-V.1.-P.323-333.

12. Koss K., Satsangi J., Fanning G.C., Welsh K.I., Jewell D.P. Cytokine (TNF α , LT- α and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies // Gen. Immun. - 2000. - V.1. - P. 185-190.

13. Luxton R.W., Thompson E.J. Affinity distributions of antigen-specific IgG in patients with multiple sclerosis and in patients with viral encephalitis // J. Immunol. Methods. - 1990. - V.131(2). - P. 277-282.

14. Marsh D.G., Neely J.D., Breazeale D.R., Ghosh B., Freidhoff L.R., Ehrlich-Kautzky E., Schou C., Krishnaswamy G., Beaty T.H. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentration // Science. - 1994. - V. 264. - P. 1152-1156.

15. Naif H., Ho-Shon M., Chang J., Cunningham A.L. Molecular mechanisms of IL-4 effect on HIV expression in promonocytic cell lines and primary human monocytes // J. Leukoc. Biol. - 1994. - V.56(3) - P.335-339.

16. Pociot F., Wilson A.G., Nerup J., Duff G.W. No independent association between a TNF- α promoter region polymorphism and insulin-dependent diabetes mellitus // Eur. J. Immunol. - 1993. - V.23. - P. 3043-3049.

17. Pravica V., Asderakis A., Perrey C., Hajeer A., Sinnott P.J., Hutchinson I.V. In vitro production of IFN- γ correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- γ gene // Eur. J. of Immunogenetics. - 1999. - V.26. - P.1-3.

18. Reynard M.P., Turner D., Navarrete C.V. Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor- α , interleukin-10, interferon- γ and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK // Eur. J. Immunogenetics. - 2000. - V.27. - P. 241-249.

19. Sennikov S.V., Krysov S.V., Injelevskaya T.V., Silkov A.N., Grishina L.V., Kozlov V.A. Quantitative analysis of human immunoregulatory cytokines by electrochemiluminescence method // J. Immunol. Methods. – 2003. – V.275(1-2). – P.81-88.

20. Shin H.D., Winkler C., Stephens J.C., Bream J., Young H., Goedert J.J., O'Brien T.R., Vlahov D., Buchbinder S., Giorgi J., Rinaldo C., Donfield S., Wil-

loughby A., O'Brien S.J., Smith M.W. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10 // PNAS. - 2000. - V.97(26). - P. 14467-14472.

21. Smolnikova M.V., Konenkov V.I. Association of IL2, TNFA, IL4 and IL10 promoter gene polymorphisms with rate of the HIV-infection progression // Russian. J. Immunology. - 2002. - V. 7(4). - P. 349-356.

поступила в редакцию 04.10.2006

принята к печати 20.10.2006