

М.М.Юнусбаева¹, А.С.Карунас¹, А.Р.Бикмаева¹, З.Р.Гарифуллин², Э.К.Хуснутдинова¹

Исследование полиморфных локусов ряда генов цитокинов (TNFA, IL1B, IL1RA) и генов детоксикации ксенобиотиков (CYP1A1, CYP2E1, GSTM1) у больных инфильтративным туберкулезом легких

1 – Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа;

2 – Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

M.M. Yunusbaeva, A.S. Karunas, A.R. Bikmaeva, Z.R. Garifullin, E.K. Khusnutdinova

Genetic analysis of polymorphic loci of cytokine genes (TNFA, IL1B, IL1RA) and genes of detoxification (CYP1A1, CYP2E1, GSTM1) in patients with infiltrative pulmonary tuberculosis

Summary

We assessed contribution of genetic factors to the infiltrative pulmonary tuberculosis development using the association analysis. Analysis of polymorphisms in TNFA (-308G>A) ($p < 0.01$), CYP1A1 (Ile462Val) ($p < 0.05$), and GSTM1 (deletion) ($p < 0.00001$) genes revealed statistically significant differences between patients with infiltrative pulmonary tuberculosis and control subjects. This information could be used to form the high-risk group for the pulmonary tuberculosis development and to predict its occurrence.

Резюме

В результате проведенного анализа ассоциаций установлен вклад генетических факторов в развитие инфильтративного туберкулеза легких в Башкортостане. Обнаружены статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов 3 полиморфных локусов -308G>A гена TNFA ($p < 0,01$), CYP1A1(Ile462Val) ($p < 0,05$) и GSTM1 (делеция) ($p < 0,00001$) между больными инфильтративным туберкулезом легких и здоровыми донорами. Определены генетические маркеры предрасположенности к развитию туберкулеза легких, что может быть использовано для выявления групп повышенного риска заболевания, а также для его прогнозирования.

Туберкулез легких (ТЛ) относится к числу наиболее распространенных, трудно поддающихся лечению заболеваний. Ежегодно во всем мире регистрируются 8–9 млн новых случаев заражения ТЛ и около 3 млн смертей. Тенденция роста заболеваемости и смертности объясняет широкий интерес ученых к исследованиям, касающимся основ формирования и развития заболевания.

ТЛ является комплексным (многофакторным) заболеванием с наследственной предрасположенностью, что подтверждается целым рядом исследований среди членов одной семьи и близнецов [1, 2, 3], а также работ по поиску ассоциаций ТЛ с генами, белковые продукты которых тем или иным образом участвуют в развитии заболевания [1, 4, 5].

Данная работа посвящена анализу ассоциаций с ТЛ следующих полиморфных вариантов генов цитокинов: фактора некроза опухолей α (-308G>A TNFA), интерлейкина-1 β (-511C>T, 3953C>T IL1B) и его рецепторного антагониста (VNTR IL1RA), а также генов детоксикации ксенобиотиков: цитохромов P450 (Ile462Val CYP1A1, Ins96 CYP2E1) и глутатион-S-трансферазы M1 (делеция GSTM1). Суть анализа ассоциаций заключается в установлении статистической связи между выбранным генетичес-

ким фактором (геном, полиморфным маркером) и признаком (заболеванием). При отсутствии ассоциации изучаемого полиморфного локуса с ТЛ следует ожидать, что распределение частот аллелей и генотипов генетических маркеров в группе больных будет соответствовать таковому в группе здоровых доноров. При наличии же генетического контроля над заболеванием может иметь место ассоциация последнего с генетическими маркерами, причем возможные механизмы таких ассоциаций – это плеiotропное влияние маркерных генов на заболевание или неравновесие по сцеплению этих генов с генами ТЛ. При выборе генетических маркеров нами учитывались данные литературы о роли определенных генов в патогенезе заболевания, сведения о значении иммунной системы в защите организма от туберкулезной инфекции и влиянии экзогенных факторов среды.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК больных инфильтративным туберкулезом легких (ИТЛ), находящихся на стационарном лечении в противотуберкулезном диспансере г. Уфы. В группу

больных (148 человек) вошли пациенты, не являющиеся родственниками, в возрасте от 17 до 79 лет (средний возраст – $41,73 \pm 2,13$ года). Диагноз был поставлен на основании данных клинического обследования, анализа микроскопии мазков мокроты и проведения флюорографического исследования. Контрольная группа была сформирована из здоровых жителей Республики Башкортостан, не являющихся родственниками, не состоящих на учете в тубдиспансере и соответствующих выборке больных по возрасту, полу и этнической принадлежности (150 человек). Выделение ДНК проводилось стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [6]. Полиморфные локусы генов TNFA (-308G>A), IL1B (-511C>T, 3953C>T), IL1RA (VNTR), CYP1A1 (Ile462Val), CYP2E1 (Ins96), GSTM1 (делеция) идентифицировали с помощью полимеразной цепной реакции с собственными модификациями и праймера-

ми, описанными ранее [7–13]. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ *Statistic for Windows 5.0 (StatSoft)*, программного обеспечения *Microsoft Excel 2003* и компьютерной программы *RxC (Rows x Columns)* [14]. Для оценки риска развития заболевания была использована таблица сопряженности 2×2 с вычислением статистик связи (с поправкой Йейтса).

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлено распределение частот аллелей и генотипов изученных полиморфных локусов у больных ИТЛ и здоровых доноров.

В ходе анализа распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса -308G>A гена TNFA выявлены статистически достоверные различия

Таблица 1
Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов TNFA (-308G>A), IL1B (-511C>T, 3953C>T), IL1RA (VNTR), CYP1A1 (Ile462Val), CYP2E1 (Ins96), GSTM1 (делеция) у больных ИТЛ и здоровых доноров

Полиморфизм	Генотип, аллель	Частота, % (абс. кол-во)		$\chi^2; p$
		больные ИТЛ	группа контроля	
TNFA (-308G>A)	*G/*G	61,9 (91)	79,7 (110)	11,32; 0,002
	*G/*A	36,7 (54)	18,8 (26)	
	*A/*A	1,4 (2)	1,4 (2)	
	*G	80,3 (236)	89,1 (246)	8,56; 0,005
	*A	19,7 (58)	10,9 (30)	
IL1B (-511C>T)	*C/*C	41,3 (57)	35,6 (48)	2,15; 0,332
	*C/*T	48,6 (67)	48,9 (66)	
	*T/*T	10,1 (14)	15,6 (21)	
	*C	65,6 (181)	60,0 (162)	1,82; 0,179
	*T	34,4 (95)	40,0 (108)	
IL1B (3953C>T)	*C/*C	49,7 (71)	62,2 (92)	4,78; 0,081
	*C/*T	44,8 (64)	34,5 (51)	
	*T/*T	5,6 (8)	3,4 (5)	
	*C	72 (206)	79,4 (235)	4,30; 0,046
	*T	28 (80)	20,6 (61)	
IL1RA (VNTR)	*I/*I	67,4 (97)	60,7 (91)	6,35; 0,163
	*I/*II	25,7 (37)	31,3 (47)	
	*I/*III	2,8 (4)	0,7 (1)	
	*II/*II	4,2 (6)	5,3 (8)	
	*III/*III	0	2,0 (3)	
	*I	81,6 (235)	76,7 (230)	2,38; 0,313
	*II	17,0 (49)	21,0 (63)	
	*III	1,4 (4)	2,3 (7)	
	CYP1A1 (Ile462Val)	*I/*I	91,4 (128)	81,3 (117)
*I/*V		7,9 (11)	18,1 (26)	
*V/*V		0,7 (1)	0,7 (1)	
*I		95,4 (267)	90,3 (260)	5,47; 0,023
*V		4,6 (13)	9,7 (28)	
CYP2E1 (инсерция)	Ins96*(-/-)	86,6 (123)	89,9 (133)	0,74; 0,466
	Ins96*(-/+)	13,4 (19)	10,1 (15)	
	Ins96*(-)	93,3 (265)	94,9 (281)	0,69; 0,492
	Ins96*(+)	6,7 (19)	5,1 (15)	
GSTM1 (делеция)	*+/*+	41,5 (61)	66 (97)	17,73; 0,0002
	*0/*0	58,5 (86)	34 (50)	

между анализируемыми выборками больных ИТЛ и группой контроля ($p < 0,01$). При статистическом сравнении распределения частот аллелей и генотипов данного локуса выявлено достоверное увеличение частоты гетерозиготного генотипа TNFA*G/*A и аллеля TNFA*A у больных ИТЛ (36,7 и 19,7 % соответственно) по сравнению с группой контроля (18,8 и 10,9 % соответственно). Относительный риск развития ИТЛ у индивидов с генотипом TNFA*G/*A составил 2,5 ($p < 0,01$; 95%-ный ДИ 1,41–4,47), аллеля TNFA*A – 2,02 ($p < 0,01$; 95%-ный ДИ 1,22–3,34). Ранее в работе *A.G. Wilson et al.* было показано, что аллель TNFA*A полиморфного локуса -308G>A гена TNFA повышает транскрипционную активность гена более чем в 2 раза и способствует избыточной секреции белкового продукта – TNF- α [7]. Данное предположение было подтверждено нами ранее в исследовании с участием больных ИТЛ [15]. Таким образом, можно утверждать, что при чрезмерно высокой концентрации TNF- α действительно повышается чувствительность клеток к повреждающему действию микобактерий туберкулеза и усиливаются цитотоксические реакции Т-киллеров, а, следовательно, заболевание прогрессирует [4, 15]. Другим возможным объяснением выявленной ассоциации может быть неравновесное сцепление маркерного гена TNFA с другими генами иммунного ответа, расположенными рядом, в частности, с антигенами HLA-комплекса.

Интерлейкин-1 (IL-1), как и TNF- α , играет важную роль в липополисахарид-индуцированном воспалении легких [16]. Синтез IL-1 начинается в ответ на внедрение микроорганизмов, например микобактерий туберкулеза, либо повреждение тканей и необходим для развития воспаления и осуществления всего комплекса защитных реакций, именуемых острофазовым ответом [8, 9, 16]. Ранее сообщалось, что у больных легочными формами туберкулеза в мокроте и бронхоальвеолярном лаваже отмечена высокая концентрация IL-1, что подтверждает участие этого цитокина как в местном, так и в системном воспалении при ТЛ [4, 16].

Проведенная нами оценка распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов – 511C>T, 3953C>T гена IL1B и VNTR гена IL1RA не выявила статистически значимых различий между сравниваемыми группами больных ИТЛ и контроля ($p > 0,05$) (табл. 1). Анализ -511C>T полиморфизма гена IL1B показал, что в обеих группах преобладали гетерозиготный генотип IL1B*C/*T (48,6 % у больных ИТЛ и 48,9 % в контроле), следующим по частоте был генотип IL1B*C/*C (41,3 и 35,6 % соответственно). Распределение частот аллелей IL1B*C и IL1B*T между исследуемыми выборками существенно не отличалось. Частота аллеля IL1B*C составляла 60,0 % в группе контроля и 65,6 % у больных ИТЛ.

Оценка распределения частот генотипов и аллелей 3953C>T полиморфизма гена IL1B продемонстрировала, что в обеих анализируемых группах преобладающим был генотип IL1B*C/*C, частота которого в группе пациентов с ИТЛ составляла

49,7 %, а в контрольной группе – 62,2 % (табл. 1). Частота гетерозиготного генотипа IL1B*C/*T у больных ИТЛ составляла 44,8 %, в группе контроля – 34,5 %. Частота аллеля IL1B*C в выборке больных ИТЛ составляла 72 %, а у здоровых доноров – 79,4 %.

При сравнении частот аллелей и генотипов VNTR полиморфизма гена IL1RA между больными ИТЛ и группой контроля в целом достоверные различия также не обнаружены ($\chi^2 = 2,38$; $p = 0,31$ и $\chi^2 = 6,35$; $p = 0,16$ соответственно). Частота генотипа IL1RA*I/*I в общей выборке больных составляла 67,4 %, а в группе контроля – 61,1 %. Генотип IL1RA*I/*II встречался с частотой 31,5 % у здоровых доноров и 25,7 % в группе больных, остальные генотипы определялись с достаточно низкой частотой. Частоты аллелей в выборке здоровых индивидов составляли: IL1RA*I – 77,2 %, IL1RA*II – 21,1 %, IL1RA*III – 1,7 %, а у больных – 81,6, 17,0 и 1,4 % соответственно (табл. 1).

Таким образом, данные проведенного исследования свидетельствуют об отсутствии ассоциации полиморфных локусов генов IL1B и IL1RA с риском развития ИТЛ в Республике Башкортостан.

Несмотря на отсутствие ассоциации исследованных полиморфизмов генов IL1B и IL1RA с ТЛ, нами был проведен анализ сочетаний генотипов данных локусов с заболеванием, поскольку известно, что белковые продукты этих генов являются естественными антагонистами, конкурируют за связывание с одними клеточными рецепторами и их соотношение может оказывать влияние на течение и исход заболевания [13]. В табл. 2 представлены выявленные в нашей работе комбинации генотипов (VNTR-3953C>T-511C>T) у больных ИТЛ и здоровых доноров. Сравнение выборок больных ИТЛ и контрольной группы в целом по распределению частот комбинаций полиморфных локусов генов IL1RA (VNTR) и IL1B (-511C>T, 3953C>T) продемонстрировало статистически значимые различия между анализируемыми группами ($p < 0,0001$). В группе больных ИТЛ существенно преобладали сочетания генотипов I/I-C/T-C/T (19,5 %) и I/II-C/C-C/T (7,5 %) по сравнению с выборкой контроля (3,82 и 1,53 % соответственно). Риск развития ИТЛ у носителей данных комбинаций генотипов составил 6,12 (95%-ный ДИ – 2,14–18,88; $p < 0,001$) и 5,24 (95%-ный ДИ – 1,05–35,37; $p < 0,05$) соответственно, тогда как комбинация генотипов I/II-C/T-C/C, напротив, чаще наблюдалась у здоровых доноров (11,45 % по сравнению с 1,5 %; $p < 0,01$; отношение шансов (ОШ) = 0,12; 95%-ный ДИ – 0,02–0,56). Различия в частотах других сочетаний генотипов между исследуемыми группами оказались статистически недостоверными ($p > 0,05$), как показано в табл. 2.

Полученные результаты анализа сочетаний генотипов (VNTR-3953C>T-511C>T) достаточно сложно интерпретировать, поскольку тенденции в выявленных ассоциациях прослеживаются нечетко и невозможно как-либо обобщить данные с учетом функциональной значимости изученных локусов. Чтобы с уверенностью говорить об ассоциации данных

Таблица 2
Распределение частот комбинаций генотипов по VNTR – локусу гена IL1RA и полиморфизмам 3953C>T и -511C>T гена IL1B у больных ИТЛ и здоровых доноров

Комбинация	Частота, % (абс. кол-во)	
	больные ИТЛ	группа контроля
VNTR-3953C>T-511C>T		
I/I-C/C-C/C	15,0 (20)	12,98 (17)
I/I-C/C-C/T	10,5 (14)	12,21 (16)
I/I-C/C-T/T	3,8 (5)	3,05 (4)
I/I-C/T-C/C	12,8 (17)	19,08 (25)
I/I-C/T-C/T	19,5 (26)	3,82 (5)
I/I-C/T-T/T	0,75 (1)	0
I/I-T/T-C/C	3,0 (4)	4,58 (6)
I/I-T/T-C/T	0,75 (1)	1,53 (2)
I/II-C/C-C/C	3,0 (4)	3,05 (4)
I/II-C/C-C/T	7,5 (10)	1,53 (2)
I/II-C/C-T/T	3,8 (5)	0,76 (1)
I/II-C/T-C/C	1,5 (2)	11,45 (15)
I/II-C/T-C/T	7,5 (10)	11,45 (15)
I/II-C/T-T/T	0,75 (1)	0
I/II-T/T-C/C	0,75 (1)	3,82 (5)
I/II-T/T-C/T	1,5 (2)	2,29 (3)
II/II-C/C-C/C	1,5 (2)	0
II/II-C/C-C/T	0,75 (1)	0
II/II-C/C-T/T	0,75 (1)	0
II/II-C/T-C/C	1,5 (2)	1,53 (2)
II/II-C/T-C/T	0	0,76 (1)
II/II-T/T-C/C	0	3,82 (5)
I/III-C/C-C/C	1,5 (2)	0,76 (1)
I/III-C/C-C/T	0,75 (1)	0
I/III-C/T-C/C	0,75 (1)	0
III/III-C/T-C/C	0	1,53 (2)
N	133	131
$\chi^2 (p)$	55,1 (0,0000)	

Примечание: представлены только встретившиеся комбинации генотипов.

сочетаний с риском развития ИТЛ (или, напротив, отсутствием риска), необходимы исследования более обширных выборок, а также анализ схожих работ с участием групп больных и контроля, отвечающих выбранным нами критериям (форма ТЛ, возраст, пол, этническая принадлежность и т. д.).

При сравнении выборки больных ИТЛ с контрольной группой в целом обнаружены статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного локуса Ile462Val гена CYP1A1 ($p < 0,05$), представленные в табл. 1. Анализ распределения частот аллелей и генотипов данного полиморфного локуса показал, что частота аллеля CYP1A1*V (4,6 %) и гетерозиготного генотипа CYP1A1*I/*V у больных ИТЛ (7,9 %) приблизительно 2 раза ниже, чем в группе здоровых доноров (9,7 и

18,1 % соответственно). Риск развития ИТЛ у индивидов с генотипом CYP1A1*I/*V составил 0,39 (95%-ный ДИ – 0,17–0,86; $p < 0,05$), аллелем CYP1A1*V – 0,45 (95%-ный ДИ – 0,22–0,93; $p < 0,05$). Согласно данным литературы, генотипы CYP1A1*V/*V и CYP1A1*I/*V полиморфного локуса Ile462Val гена CYP1A1 ассоциированы с такими тяжелыми патологиями, как муковисцидоз, хроническая обструктивная болезнь легких и различные виды онкологических заболеваний [12, 17], однако работы, указывающие на влияние данного полиморфного локуса на развитие ТЛ, нами не обнаружены.

В ходе анализа инсерционного полиморфизма гена CYP2E1 не обнаружены различия в частоте аллелей и генотипов данного локуса между больными ИТЛ и здоровыми донорами ($p > 0,05$) (табл. 1).

Сопоставление распределения частот генотипов гена GSTM1 продемонстрировало достоверное увеличение частоты генотипа GSTM1*0/*0 у больных ИТЛ (58,5 %) по сравнению с группой контроля (34 %). Риск развития ИТЛ у носителей нулевого генотипа составил 2,74 ($p < 0,001$; 95%-ный ДИ – 1,66–4,52). Поскольку наличие нулевого генотипа гена GSTM1 приводит к полному отсутствию белкового продукта (глутатион-S-трансферазы), это может способствовать накоплению в клетке токсичных промежуточных метаболитов без их дальнейшего обезвреживания [10]. Такое скопление реактивных веществ в клетке может вызвать оксидативный стресс, способствовать деструкции и развитию апоптоза, что, несомненно, оказывает негативное воздействие на инфицированный микобактериями организм.

Таким образом, разнообразие и сложность генетической регуляции патологического процесса, возникающего при туберкулезном инфицировании, обуславливают необходимость дальнейшего расширения представлений о наследственной предрасположенности к ТЛ. Новые сведения в этой области позволят приблизиться к решению вопросов профилактики и ранней диагностики ТЛ.

Заключение

1. Установлена ассоциация полиморфного локуса -308G>A гена TNFA с ИТЛ. Гетерозиготный генотип TNFA*G/*A является маркером повышенного риска развития ИТЛ (ОШ = 2,5; 95%-ный ДИ – 1,41–4,47).
2. Полиморфные локусы (-511C/T, 3953C>T, VNTR) генов цитокинов IL1B и IL1RA, а также инсерционный полиморфизм гена CYP2E1 не ассоциированы с развитием ИТЛ.
3. Генотип CYP1A1*I/*V полиморфного локуса Ile462Val гена CYP1A1 является маркером пониженного риска развития ИТЛ (ОШ = 0,39; 95%-ный ДИ – 0,17–0,86), тогда как нулевой генотип GSTM1*0/*0 гена GSTM1 является фактором, предрасполагающим к развитию ИТЛ (ОШ = 2,74; 95%-ный ДИ – 1,66–4,52).

Литература

1. Хоменко А.Г. (ред.). Туберкулез: Руководство для врачей. М.: Медицина; 1996.
2. Чуканова В.П., Сергеев А.С., Мороз А.М. и др. Роль наследственных факторов при туберкулезе. Пробл. туб. 1981; 11: 46–50.
3. Comstock G. W. Tuberculosis in twins: a reanalysis of the Proffit survey. Am. Rev. Respir. Dis 1978; 117: 621–624.
4. Блум Барри Р. (ред.). Туберкулез: Патогенез, защита, контроль: Пер. с англ. М.: Медицина; 2002.
5. Delgado J. C., Baena A., Thim S. et al. Ethnic – specific genetic associations with pulmonary tuberculosis. J. Infect. Dis. 2002; 186: 1463–1468.
6. Mathew C. C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA. In: Walker J.M., ed. Methods in molecular biology. New York: Humana Press; 1984; vol. 2: 31–34.
7. Wilson A.G., Symon J.A., McDowel T.L. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94: 3195–3199.
8. de Giovine F.S., Takhs E., Blakemore A. J. et al. Single base polymorphism at -511 in human interleukin-1 β gene. Hum. Mol. Genet. 1992; 1: 450–457.
9. Dominici R., Malferrari G., Mariani C. et al. The Interleukin 1- β exonic (+3953) polymorphism does not alter in vitro protein secretion. Exp. Mol. Pathol. 2002; 73: 139–141.
10. Fritsche E., Pittman G.S., Bell D.A. Localization, sequence analysis, and ethnic distribution of a 96-bp insertion in the promoter of the human CYP2E1 gene. Mut. Res. Genom. 2000; 432: 1–5.
11. Gronau S., Koenig-Greger D., Jerg M. et al. GSTM1 enzyme concentration and enzyme activity in correlation to the genotype of detoxification enzymes in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Oral Dis. 2003; 9: 62–67.
12. Marchand L., Guo C., Benhamou S. et al. Pooled analysis of the CYP1A1 exon 7 polymorphism and lung cancer (United States). Cancer. Caus. Control. 2003; 14: 339–346.
13. Santtila S., Savinainen K., Hurme M. et al. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL-1RN*2) is associated with enhanced IL-1 β production in vitro. Scand. J. Immunol. 1998; 47: 195–198.
14. Roff D.A., Bentzen P. The statistical analysis of mitochondrial DNA: χ^2 and problem of small samples. Mol. Biol. Evolut. 1989; 6: 539–545.
15. Бикмаева А.Р., Сибиряк С.В., Валиахметова Д.Х., Хуснутдинова Э.К. Полиморфизм гена TNFA у больных инфильтративным туберкулезом легких и в популяциях Волго-Уральского региона. Молекул. биол. 2002; 36 (5): 631–633.
16. Wilkinson R.J., Patel P., Llewelyn M. et al. Influence of polymorphism in the genes of interleukin -1 receptor antagonist and IL-1 β on tuberculosis. J. Exp. Med. 1999; 189: 1863–1873.
17. Кoryтина Г.Ф., Янбаева Д.Г., Викторова Т.В. Роль полиморфных вариантов генов цитохромов P450 (CYP1A1, CYP2E1) и микросомальной эпоксидгидролазы (mEPHX) в патогенезе муковисцидоза и хронических заболеваний дыхательной системы. Молекул. биол. 2003; 37 (5): 784–792.

Поступила 15.09.06
 © Коллектив авторов, 2008
 УДК 616.24-002.5-092