

**ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИИ ГЕНОВ *IL10* (RS1800872) И *TNF α* (RS2239704) С РАЗВИТИЕМ
ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ**

Д.Е. Гомбоева, И.Ж. Жалсанова

Научный руководитель: к.б.н., Е.Ю. Брагина
Сибирский Государственный Медицинский Университет,
Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050
НИИ медицинской генетики ТНИМЦ,
Россия, г. Томск, Набережная реки Ушайки, 10, 634050
E- mail: gombo-d@mail.ru

**ASSOCIATION STUDY OF GENES *IL10* (rs1800872) AND *TNF α* (rs2239704) IN DEVELOPMENT OF
PULMONARY TUBERCULOSIS**

D.Ye. Gomboeva, I.Z. Zhalsanova

Scientific Supervisor: PhD. Bio. Sc., E. Yu. Bragina
Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, 2 Moskovsky trakt, 634055
Research Institute of Medical Genetics, Russia, Tomsk, Nab. Ushaiki, 10, 634050
E-mail: gombo-d@mail.ru

Abstract. Tuberculosis (TB) is the most dangerous widespread infectious disease in the world caused by *Mycobacteria tuberculosis*. Genetic factors are important in the development of TB. Defense against TB infection is provided through T- cell host immunity. Resistance to *Mycobacteria tuberculosis* is determined by T helper type 1 (Th1) cells and their cytokines. Cytokine spectrum of Th-1 is represented by proinflammatory cytokines: interferon gamma (IFN γ), interleukin-12, interleukin-2 and tumor necrosis factor alpha (TNF α). On the other hand Th-2 response characterized by the secretion of cytokines (interleukin-4 and interleukin-10) is associated with the lack of protection in TB. Thus Th-1/Th-2 balance is very important for definition the outcome of infection disease. In this study we take into account of genetic polymorphisms *IL10* (rs1800872) and *TNF α* (rs2239704) in TB patients and healthy individuals. Results of genotyping and statistical comparison have shown a strong significance association of *IL10* and *TNF α* with susceptibility to pulmonary TB in Tomsk population.

Актуальность. Туберкулез (ТБ) – хроническое инфекционное заболевание, возбудителем которого является *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ). По данным Всемирной организации здравоохранения туберкулезом инфицировано 1/3 населения планеты [1], каждый год инфицируется около 9 млн человек и умирают 2 млн человек [2]. Несмотря на повсеместное распространение МБТ, заболевают ТБ 10% всех инфицированных людей [3]. ТБ является мультифакторным заболеванием, в развитии которого принимают участие генетические и средовые факторы. Вклад генетической компоненты был доказан, прежде всего, результатами близнецовых исследований: так, уровень конкордантности у монозиготных близнецов в 2 раза выше, чем у дизиготных [4]. Известно, что частота заболевания ТБ у родственников пробанда выше даже в случаях, когда родственники не находятся в семейном контакте с пробандом. Кроме этого существуют данные о накоплении числа случаев

заболевания ТБ в семьях с близкородственными браками. В настоящее время для изучения генетической предрасположенности к ТБ наряду с другими активно используется ассоциативный анализ [5], который предполагает поиск генов – кандидатов, вовлеченных в процесс иммунного ответа на МТБ и формирование начальной воспалительной реакции на патоген. К их числу можно отнести гены, кодирующие главный комплекс гистосовместимости (МНС), цитокины, хемокины [6]. На сегодняшний день по данным электронной базы HuGe Navigator (<https://www.cdc.gov/genomics/hugenet/hugenavigator.htm>) известно 412 генов-кандидатов развития ТБ.

Защита организма против МБТ реализуется посредством клеточного иммунитета. Решающая роль в этом принадлежит регуляторным и цитотоксическим лимфоцитам. Причем, протективный иммунитет к МТБ формируется за счет функционирования Т-хелперов 1-го типа (Th-1), к спектру которых в основном относятся провоспалительные цитокины: интерферон гамма (IFN γ), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-2 (IL-2), фактор некроза опухоли альфа (ФНО α , или TNF α - tumor necrosis factor) [7]. С другой стороны у пациентов с туберкулезом наблюдаются выраженные отличия в содержании цитокинов Т-хелперов 2-го типа, включая интерлейкин-10 (IL-10) и интерлейкин-4 (IL-4) [8]. Таким образом, большое значение имеет тонкая регуляция Th-1/Th-2 баланса, определяющего исход туберкулезной инфекции.

Цель исследования: изучить ассоциацию полиморфных вариантов генов *IL10* (rs1800872) и *TNF α* (rs2239704) с развитием туберкулеза в популяции г.Томска.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования были образцы геномной ДНК больных ТБ (n=230) и здоровых индивидов (n=216) в качестве группы сравнения из банка данных НИИ медицинской генетики. Средний возраст в группе больных ТБ составил 48,06 \pm 1,06 лет, а в группе здоровых – 45,56 \pm 1,29 лет. ДНК экстрагирована из лейкоцитов периферической крови по стандартной неэнзиматической методике. Генотипирование полиморфного варианта гена *IL10* (rs1800872) производилось методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ), включающего в себя амплификацию на термоциклере Терцик («ДНК-Технология», Россия) и рестрикцию эндонуклеазой рестрикции Rsa I («СибЭнзим», Россия). Разделение рестрицированных фрагментов проводили с помощью электрофореза в 3% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Детекцию результатов производили в УФ-камере E-Box VX2 («Vilmer Lourmat», Франция). Генотипирование полиморфного варианта гена *TNF α* (rs2239704) проводили методом ПЦР в реальном времени на приборе CFX96 Touch («BioRad Laboratories», США) с применением реактива TaqMan SNP («Applied Biosystems», США). Статистическую обработку данных производили с применением программы Excel MS. Для анализа ассоциаций полиморфных вариантов генов с ТБ использовали критерий χ^2 , различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. Наблюдаемое распределение генотипов в контрольной группе соответствовало ожидаемым при равновесии Харди-Вайнберга для полиморфизма rs1800872 гена *IL10* ($\chi^2=0,034$; $p=0,854$). В то же время для полиморфизма rs2239704 гена *TNF α* наблюдаемое распределение генотипов отличалось от ожидаемого ($\chi^2=5,07$; $p=0,024$). Ген *IL-10* локализован на длинном плече 1 хромосомы в регионе 31-32 и состоит 5 экзонов и 4 интрона [9]. В промоторной области гена было обнаружено 3 однонуклеотидные замены (-1082, -819, -592), для которых доказана корреляция с уровнем продукции IL-10 [10]. Полиморфный вариант гена *IL-10* (rs1800872) представляет собой однонуклеотидную замену

T/C, расположенную в регуляторной области гена, с частотой минорного аллеля до 24% у европеоидов (по данным базы данных Ensembl). В группе больных ТБ по *IL10* (rs1800872) частота генотипа СС составила 56,52%, генотипа АС - 36,52%, генотипа АА - 6,96%. Сравнение частот генотипов у больных ТБ с контрольной группой выявило статистически значимые различия ($\chi^2=5,45$; $p=0,020$).

TNF имеет значение в формировании гранулем, индукции активности макрофагов, ограничении распространения и размножения МБТ [11]. Ген *TNF α* расположен на коротком плече 6 хромосомы, регионе 21 и содержит 4 экзона [12]. По данным базы данных Ensembl в гене идентифицированы 260 однонуклеотидных полиморфизмов. Полиморфизм rs2239704 представляет собой однонуклеотидную замену А/С с частотой минорного аллеля до 41% в европейских популяциях. Частота генотипа СС для изученного варианта гена *TNF α* (rs2239704) в группе больных ТБ составила 30,95%, генотипа АА – 25%, генотипа АС- 44,05%. Сравнение частот генотипов по *TNF α* между группами больных и здоровых индивидов также выявило статистически значимые различия ($\chi^2=5,95$; $p=0,015$).

Выводы. Таким образом, полиморфные варианты генов *IL10* (rs1800872) и *TNF α* (rs2239704) ассоциированы с предрасположенностью к ТБ легких в популяции г.Томска.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raviglione, M., Snider, D., Kochi, A. (1995) Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *Journal of the American Medical Association*, no. 273, pp. 220–226.
2. WHO. Global tuberculosis report 2013. Geneva: WHO Press: 2013.
3. Sudre, P., ten Dam, G., Kochi, A. (1992) Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bulletin of the World Health Organisation*, no. 70, pp. 149–59.
4. Kallman, F. J., Reisner, D. (1943) Twin studies on the significance of genetic factors in tuberculosis. *American review of tuberculosis*, no. 47, pp. 549 – 574.
5. Рудко А. А., Фрейдин М. Б., Пузырев В. П. Наследственная предрасположенность туберкулезу // Молекулярная медицина. – 2011. - №3. – С. 3 – 10.
6. Громова А. Ю., Симбирцев А. С. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека// Цитокины и воспаление. – 2005. – Т.4. – №2. – С.1 – 12.
7. Pai, M., Zwerling, A., Menzies, D. (2008) Systematic Review: T-Cell – Based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. *Annals of Internal Medicine*, vol. 149, no. 3, pp. 177 – 184.
8. Bai, X., Wilson, S. E., Chmura, K., et al. (2004) Morphometric analysis of Th(1) and Th(2) cytokine expression in human pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, vol. 84, no. 6, pp. 375-385
9. Spits, H., de Waal, Malefyt R. (1992) Functional characterization of human IL-10. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, vol. 99, pp. 8–15.
10. Lyer, S. S., Cheng, G. (2012) Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, vol. 32, pp. 23 – 63.
11. Crevel, R., Ottenhoff, N. M., Meer, W. M. (2002) Innate immunity to mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology Review*, vol. 15, no. 2, pp. 294–309.
12. Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Chan, J., et al. (1995) Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity*, vol. 2, pp. 561–572.