

Роль полиморфизма генов эотаксина (–384) и *CCR3* (–51) в формировании эозинофилии крови при туберкулезе легких

Михеева К.О.¹, Колобовникова Ю.В.¹, Уразова О.И.¹, Новицкий В.В.¹, Филинюк О.В.², Гончаров М.Д.¹, Наследникова И.О.¹

The role of polymorphism of genes eotaxin (–384) and *CCR3* (–51) in formation of blood eosinophilia under pulmonary tuberculosis

Miheeva K.O., Kolobovnikova Yu.V., Urazova O.I., Novitsky V.V., Filinyuk O.V., Goncharov M.D., Naslednikova I.O.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Михеева К.О., Колобовникова Ю.В., Уразова О.И. и др.

С привлечением современных молекулярно-генетических и иммунологических методов исследования установлено, что формирование эозинофильной реакции крови при туберкулезе легких обусловлено гиперсекрецией эотаксина. Подверженность к возникновению эозинофильной реакции крови при туберкулезной инфекции ассоциирована с аллелем G и гомозиготным генотипом GG полиморфного участка A-384G гена эотаксина, а также с аллелем C и генотипом CC полиморфизма T-51C гена рецептора эотаксина *CCR3*.

Ключевые слова: эозинофилия, цитокины, рецепторы, эотаксин, полиморфизм генов.

With attracting contemporary molecular-genetic and immunological research methods, it has been established that blood eosinophilia under pulmonary tuberculosis is mediated by hypersecretion eotaxin. Susceptibility to the emergence of eosinophilic blood reaction under tubercular infection is associated with the allele G and homozygous genotype GG of the polymorphic region A-384G of the gene eotaxin as well as with allele C and homozygous genotype CC polymorphism T-51C of the gene *CCR3*.

Key words: eosinophilia, cytokines, receptors, eotaxin, gene polymorphism.

УДК 616.24-002.5-06:616.155.35]:575.174.015.3

Эозинофильная реакция крови при туберкулезе легких (ТЛ) в большинстве случаев является следствием проводимой противотуберкулезной химиотерапии (чаще при назначении резервных противотуберкулезных препаратов). Однако регистрируются случаи эозинофилии крови при деструктивных формах множественно лекарственно-устойчивого ТЛ до лечения [5].

Формирование эозинофилии крови при патологии связывают с гиперпродукцией медиаторов, регулирующих гомеостаз эозинофильных гранулоцитов, одним из которых является эотаксин, реализующий свои эффекты посредством связывания со специфическим рецептором *CCR3* (C-C Chemokine Receptor type 3), экспрессируемым на клетках, в том числе на эозинофилах [4, 6].

Доминирующим фактором, обуславливающим функциональную активность цитокинов и их рецепторов у отдельного индивида, является аллельный полиморфизм генов. В локусе гена эотаксина обнаруже-

но шесть полиморфных сайтов в промоторной области, однако функционально значимый полиморфизм гена эотаксина регистрируется в положении –384, который ассоциирован с концентрацией данного медиатора и уровнем общего IgE в сыворотке крови [7]. В гене *CCR3* обнаружено 10 полиморфизмов, для некоторых (–22557G>A, –174C>T и T-51C) показана ассоциация с повышением количества эозинофилов в крови у пациентов с бронхиальной астмой [3].

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования явилась оценка ассоциативных связей полиморфных вариантов A-384G гена эотаксина и T-51C гена *CCR3* с количеством эозинофилов в периферической крови у больных ТЛ.

В исследование вошли 186 пациентов европеоидного происхождения в возрасте от 18 до 55 лет, проживающих на территории г. Томска и Томской области, с впервые выявленным распространенным деструктивным инфильтративным и диссеминированным

ТЛ, находившихся на стационарном лечении в отделении терапии легочного туберкулеза № 1 Томской областной туберкулезной клинической больницы.

В зависимости от абсолютного и относительного количества эозинофилов в периферической крови были сформированы две основные группы исследования: первую группу составили 86 пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией (абсолютное число эозинофилов составило $(0,79 \pm 0,01)$ г/л, относительное — $(8,98 \pm 0,46)\%$), во вторую группу вошли 100 больных ТЛ без эозинофилии (абсолютное число эозинофилов — $(0,23 \pm 0,01)$ г/л, относительное — $(2,80 \pm 0,20)\%$). Забор материала для исследования у больных ТЛ во всех случаях проводили до начала специфической противотуберкулезной терапии.

В контрольную группу были включены 120 здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту (абсолютное число эозинофилов не превышало $(0,06 \pm 0,01)$ г/л, относительное — $(1,19 \pm 0,20)\%$).

Материалом для исследования служила венозная кровь. Концентрацию эотаксина в сыворотке периферической крови оценивали с применением твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» метода в соответствии с инструкцией, прилагаемой производителем тест-систем (Biosource, США). Выделенные на градиенте плотности Percoll ($\rho = 1,133$ г/л) (Sigma Life Science, США) эозинофильные лейкоциты ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл) использовали для определения экспрессии поверхностных рецепторов к эотаксину методом лазерной проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, меченных флуоресцентной меткой FITC. Пробоподготовку проводили согласно протоколу фирмы-производителя (Becton Dickinson, США).

Выделение ДНК из периферической крови проводили сорбентным методом согласно инструкции, прилагаемой к коммерческому набору «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия). Полиморфные участки генов цитокинов исследовали с использованием рестриционного анализа продуктов амплификации специфических участков генома (ПДРФ-анализ).

Основным медиатором, модулирующим функциональную активность эозинофильных гранулоцитов (наряду с интерлейкином-5), является эотаксин — представитель СС-семейства хемокинов, основная роль которого заключается в потенцировании процессов рекрутирования эозинофилов из кровотока в ткани

и наоборот. Вместе с тем эотаксин обладает способностью усиливать мобилизацию эозинофилов из костного мозга, обуславливая избыток эозинофильных лейкоцитов в периферической крови [4].

В ходе проведенного исследования было установлено достоверное повышение уровня эотаксина в сыворотке крови у больных инфильтративным и диссеминированным ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, а также у пациентов с диссеминированным вариантом туберкулезной инфекции без эозинофилии.

Анализируя причины высокого содержания эотаксина в крови у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, необходимо учитывать, что уровень медиаторов, выделяемых клетками, генетически детерминирован. В современной литературе представлены многочисленные данные о наличии ассоциативных связей аллельных вариантов генов цитокинов с характером продукции соответствующих белковых продуктов и предрасположенностью к той или иной патологии [1].

По результатам иммуногенетического исследования было установлено, что у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, достоверно чаще встречались аллель G ($\chi^2 = 21,17$; $p_2 < 0,001$) и гомозиготный по аллелю G генотип ($\chi^2 = 17,34$; $p_2 < 0,001$) гена эотаксина (A-384G) по сравнению с группой больных ТЛ без эозинофилии. В свою очередь среди больных ТЛ, не сопровождающимся эозинофильной реакцией крови, достоверно чаще по сравнению с группой здоровых лиц встречался гомозиготный по аллелю A генотип полиморфизма A-384G гена эотаксина. Была показана положительная ассоциация генотипа GG (OR = 2,75), а также аллеля G (OR = 2,81) гена эотаксина с эозинофилией крови при ТЛ.

Известно, что эотаксин действует через специфический рецептор (CCR3), экспрессированный на эозинофильных гранулоцитах. В отличие от других СС-хемокинов эотаксин имеет высокую селективность по отношению к своему рецептору, активация которого *in vitro* опосредует хемотаксис и дегрануляцию эозинофилов [4].

При оценке содержания CCR3-положительных клеток в интактной культуре эозинофильных лейкоцитов было зарегистрировано увеличение относительного и абсолютного их количества только у больных ТЛ без эозинофилии по сравнению с таковым в контрольной группе. В свою очередь, при ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, число эозинофилов, экс-

прессирующих CCR3, варьировало в пределах нормы. Повышенная экспрессия CCR3 на эозинофильных гранулоцитах при ТЛ без эозинофилии, по-видимому, индуцирует усиление адгезии эозинофилов к сосудистому эндотелию с последующей миграцией основной массы клеток в очаг гранулематозного воспаления.

В промоторном регионе гена рецептора эотаксина локализовано значительное число полиморфных сайтов, многие из которых ассоциированы с бронхиальной астмой, атопией и атопическим дерматитом [2]. При этом установлено, что сочетания аллелей А полиморфизма -22557 G>A, G полиморфизма -520 T>G, а также аллелей Т полиморфизмов -174C>T и +51 T>C ассоциированы с низким содержанием эозинофилов в периферической крови у больных бронхиальной астмой [6].

Как показали результаты проведенного исследования, в группе больных ТЛ, сопровождающимся эозинофильной реакцией крови, достоверно чаще, чем у здоровых лиц и пациентов с ТЛ без эозинофилии, встречался генотип СС полиморфизма Т-51С гена CCR3 ($\chi^2 = 60,30$; $p_1 < 0,001$ и $\chi^2 = 46,86$; $p_2 < 0,001$ соответственно). Анализ распределения аллелей выявил, что аллель С полиморфного участка +51 T>C гена CCR3 достоверно чаще ($\chi^2 = 64,35$; $p_2 < 0,001$) встречался у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, по сравнению с таковым у пациентов без эозинофильной реакции крови. С этими же аллелем (OR = 6,58) и генотипом (OR = 13,21) была установлена достоверная ассоциация эозинофильной реакции крови при ТЛ.

Таким образом, формирование эозинофильной реакции крови при ТЛ обусловлено гиперсекрецией эотаксина — ключевого эозинофилактивирующего медиатора. Повышенное содержание эотаксина в сыворотке крови у больных ТЛ без эозинофилии можно объяснить двойственностью свойств данного хемокина: с одной стороны, эотаксин опосредует пролонгированное пребывание эозинофилов в кровотоке, а с другой — потенцирует процессы рекрутирования эозинофилов из

кровотока в ткани. Подверженность к возникновению эозинофильной реакции крови при туберкулезной инфекции ассоциирована с аллелем G и гомозиготным генотипом GG полиморфного участка A-384G гена эотаксина, а также с аллелем C и генотипом CC полиморфизма T-51C гена CCR3. Полученные результаты свидетельствуют о генетической предрасположенности к развитию эозинофильной реакции крови при ТЛ до проведения специфической противотуберкулезной терапии.

Исследование выполнено в рамках реализации Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 годы (соглашения № 14.A18.21.0206 и № 14.A18.21.0174).

Литература

1. Коненков В.И., Смольникова М.В. Структурные основы и функциональная значимость аллельного полиморфизма генов цитокинов человека и их рецепторов // Мед. иммунология. 2003. Т. 5, № 1—2. С. 11—28.
2. Al-Abdulhadi S.A., Al-Rabia M.W.O. Linkage and haplotype analysis for chemokine receptors clustered on chromosome 3p21.3 and transmitted in family pedigrees with asthma and atopy // Ann. Saudi Med. 2010. V. 30 (2). P. 115—122.
3. Fukunaga K., Asano K., Mao X-Q. et al. Genetic polymorphisms of CC chemokine receptor 3 in Japanese and British asthmatics // Eur. Respir. J. 2001. V. 17. P. 59—63.
4. Garcia-Zepeda E.A., Rothenberg M.E., Ownbey R.T. et al. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia // Nat. Med. 1996. V. 2. P. 449—456.
5. Kirman J., Zakaria Z., McCoy K. Role of eosinophils in the pathogenesis of *Mycobacterium bovis* BCG infection in gamma interferon receptor-deficient mice // Infect. Immun. 2009. V. 68 (5). P. 2976—2978.
6. Lee J.-H., Chang H.S., Kim G.H. et al. Genetic effect of CCR3 and IL5RA gene polymorphisms on eosinophilia in asthmatic patients // J. Allergy Clin. Immunol. 2007. V. 120 (5). P. 1110—1117.
7. Wang T.-N., Chiang W., Tseng H.-I. et al. The polymorphisms of Eotaxin 1 and CCR3 genes influence on serum IgE, Eotaxin levels and mild asthmatic children in Taiwan // Allergy. 2007. V. 62. P. 1125—1130.

Поступила в редакцию 02.03.2012 г.
Утверждена к печати 05.03.2012 г.

Сведения об авторах

К.О. Михеева — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Ю.В. Колобовникова — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

О.И. Уразова — д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

В.В. Новицкий — д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

О.В. Филинюк — д-р мед. наук, зав. кафедрой фтизиатрии и пульмонологии СибГМУ (г. Томск).

М.Д. Гончаров — студент 6-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

И.О. Наследникова — д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Михеева К.О., Колобовникова Ю.В., Уразова О.И. и др.

Роль полиморфизма генов эотаксина (-384) и CCR3 (-51)...

Колобовникова Юлия Владимировна, тел.: 8 (382-2) 55-36-13, 8-952-803-1359; e-mail: kolobovnikova.julia@mail.ru