

На правах рукописи

НИКУЛИНА
ЕВГЕНИЯ ЛЕОНИДОВНА

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ И СЕКРЕЦИЯ *IN VITRO* ПРО- И
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

ТОМСК-2011

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Уразова Ольга Ивановна

доктор медицинских наук

Наследникова Ирина Олеговна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Федорова Татьяна Сергеевна

доктор медицинских наук, профессор

Солонский Анатолий Владимирович

Ведущая организация:

ФГУ Новосибирский НИИ туберкулеза Минздравсоцразвития России, г. Новосибирск, ул. Охотская, 81а

Защита состоится: « ___ » _____ 2011 г. на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск, проспект Ленина, 107)

Автореферат разослан « ___ » _____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Петрова И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Несмотря на существенные достижения отечественной и зарубежной медицины и фармакологии, туберкулез, ежегодно уносящий жизни около 2 млн. человек во всем мире, остается одной из ведущих проблем современной медико-биологической науки [Kumar V. et al., 2007; Шкарин А.В., 2008; Филиппова Т.П. и соавт., 2009]. В иммунопатогенезе туберкулеза принципиальны два основных фактора: генетическая организация инфицирующего штамма *Mycobacterium tuberculosis* и характер иммунного ответа макроорганизма [Henaо M.I., 2006; Ates O., 2008].

Решающий момент специфического иммунного ответа при туберкулезной инфекции – ответ $CD4^+$ Th0-клеток на распознавание антигена. На данном этапе определяется форма иммунного ответа: с преобладанием антител или клеточных реакций, что зависит от множества факторов: качества и дозы антигена, цитокинового фона микроокружения, наличия или отсутствия цитокинсвязывающих рецепторов и других мембранных молекул на иммунокомпетентных клетках. Показано, что Th1- и Th2-лимфоциты отличаются не только фенотипически, но и по спектру продуцируемых ими цитокинов, однако общей чертой этих двух альтернативных субпопуляций является высокая чувствительность к стимулирующему пролиферацию действию интерлейкинов (IL)-2 и IL-4 [Фрейдлин И.С., 1998; Henaо M.I., 2006; Шкарин А.В., 2008; Каралян М.А., 2010; Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2010; Сахно Л.В. и соавт., 2010].

IL-2 играет ключевую роль в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции, что связано с его способностью оказывать аутокринное (на Th1) и паракринное (на Th2) воздействие, вызывать смещение баланса Th1/Th2 в направлении T-клеточных реакций, регулировать рост и активность T- и B-лимфоцитов, натуральных киллеров, моноцитов/макрофагов, определять интенсивность реакций гиперчувствительности замедленного типа [Хайтов Р.М., 2006; Сахно Л.В. и соавт., 2010].

В структуре цитокинов, секретлируемых регуляторными T-клетками, IL-10 и трансформирующий фактор роста (TGF)- β проявляют иммуносупрессорное действие [Henaо M.I., 2006; Kumar V. et al., 2007; Корженевская К.В. и соавт., 2010]. Противовоспалительный IL-4, являясь продуктом $CD4^+$ T-лимфоцитов/хелперов с фенотипом Th2, выступает в качестве антагониста Th1-ассоциированных цитокинов, способствуя тем самым поляризации иммунного ответа в направлении гуморального типа реагирования [Хайтов Р.М., 2001; Кучер А.Н. и соавт., 2009; Коненков В.И. и соавт., 2010]. Основная функция IL-4 – контроль пролиферации, дифференцировки B-лимфоцитов в плазматические клетки и антителогенеза, в том числе за счет угнетения продукции провоспалительных цитокинов: IL-1, IL-6, IL-8, фактора некроза опухолей (TNF)- α [Фрейдлин И.С., 1998; Сахно Л.В. и соавт., 2010].

Характер течения воспалительного ответа, направленность противоинфекционного иммунитета при туберкулезной инфекции в значительной мере определяются особенностями межклеточной кооперации иммуноцитов, как модулируемыми в ответ

на воздействие *M. tuberculosis*, так и генетически детерминированными. Это влияние может быть опосредовано через изменение продукции и связывания иммунорегуляторных цитокинов иммунокомпетентными клетками [Сенников С.В. и соавт., 2002, 2005; Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2010]. В настоящее время высказывается предположение о связи генетически детерминированной гипер- или гипопродукции цитокинов с качеством иммунного ответа, ассоциативности аллельных вариантов генов цитокинов с тяжестью и продолжительностью инфекционных заболеваний [Рудко А.А., 2004; Коненков В.И. и соавт., 2009, 2010; Шевченко А.В. и соавт., 2010].

Структурные особенности белковых продуктов полиморфных генов цитокинов обуславливают дифференциацию иммунного ответа организма на бактериальную агрессию, определяющую течение и исход инфекционных заболеваний [Сенников С.В. и соавт., 2002; Гончарова И.А. и соавт., 2006]. Гены цитокинов имеют аллельные варианты, характеризующиеся большей или меньшей активностью белка либо различным уровнем его экспрессии. Показано, что полиморфные сайты *T-330G* гена *IL2*, *C-590T* гена *IL4*, *C-592A* гена *IL10*, *G-308A* гена *TNFA*, *+874A/T* гена *IFNG*, *C-509T* гена *TGFB* ассоциированы с уровнем продукции соответствующих цитокинов [Симбирцев А.С., 1998; Tso H.W. et al., 2005; Авдошина В.В. и соавт., 2006; Гончарова И.А. и соавт., 2006; Henaо M.I., 2006; Ates O., 2008; Осташкин А.С. и соавт., 2008].

В свете вышеизложенного представляется весьма актуальным изучение секреции *in vitro* про- и противовоспалительных цитокинов в ассоциации с анализом полиморфизма их генов при туберкулезной инфекции, что в свою очередь может быть положено в основу разработки новых подходов к прогнозированию ее клинического течения, а также патогенетически оправданных способов профилактики и иммунокоррекции при данной патологии.

Цель исследования. Оценить модулирующее влияние аллельного полиморфизма иммунорегуляторных генов на секрецию про- и противовоспалительных цитокинов *in vitro* у больных туберкулезом легких.

Задачи исследования:

1. Изучить распространенность полиморфных сайтов *T-330G* гена *IL2*, *C-590T* гена *IL4*, *C-592A* гена *IL10*, *G-308A* гена *TNFA*, *+874A/T* гена *IFNG*, *C-509T* гена *TGFB* среди больных туберкулезом легких г. Томска и Томской области.

2. Оценить особенности CD-субпопуляционного состава лимфоцитов крови и секреции *in vitro* про- и противовоспалительных цитокинов в ассоциации с аллельным полиморфизмом иммунорегуляторных генов у больных туберкулезом легких г. Томска и Томской области.

3. Изучить связь аллельных вариантов *T-330G* гена *IL2*, *C-590T* гена *IL4*, *C-592A* гена *IL10*, *G-308A* гена *TNFA*, *+874A/T* гена *IFNG*, *C-509T* гена *TGFB* с клиническими формами (инфильтративная и диссеминированная) туберкулеза легких.

Научная новизна. С привлечением современных молекулярно-генетических и иммунологических методов исследования охарактеризована секреция *in vitro* про- и противовоспалительных цитокинов и оценена роль аллельного полиморфизма их генов (*IL2*, *TNFA*, *IFNG*, *IL4*, *IL10*, *TGFB*) при отдельных клинических формах туберкулезного процесса. Показано, что частота встречаемости аллеля *G* и генотипа *GG* (*T-330G*) гена *IL2*, генотипа *TT* (*C-590T*) гена *IL4* и генотипа *AA* (*G-308A*) гена *TNFA* значимо выше при диссеминированном, чем при инфильтративном туберкулезе легких. Риск развития туберкулеза легких ассоциирован с генотипами *GG* (*T-330G*) гена *IL2*; *CT* и *TT* (*C-590T*) гена *IL4*, *AA* (*C-592A*) гена *IL10*; *GA* и *AA* (*G-308A*) гена *TNFA*; *TT* (*C-509T*) гена *TGFB* и *AA* (*+874A/T*) гена *IFNG*.

Выделены ключевые генетические факторы, опосредующие изменения секреции основных цитокинов иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis* и связанный с ними дисбаланс CD-субпопуляционного состава лимфоцитов крови при туберкулезе легких. Установлено, что Т-клеточный дефицит у больных туберкулезом легких сочетается с гипосекрецией IL-2 и увеличением продукции IL-10 *in vitro*, которые в свою очередь связаны с носительством аллеля *G* и генотипа *GG* (*T-330G*) гена *IL2* и аллеля *A* и генотипа *AA* (*C-592A*) гена *IL10*. При этом повышенное содержание CD20⁺ В-лимфоцитов в крови сопряжено с гиперсекрецией IL-4 *in vitro* в связи с носительством «патологического» аллеля *T* и генотипа *CT* (*C-590T*) гена *IL4*.

Практическое и теоретическое значение работы. Полученные данные фундаментального характера раскрывают новые молекулярно-генетические аспекты развития туберкулеза легких. Результаты исследования CD-субпопуляционного состава лимфоцитов крови и секреции *in vitro* про- и противовоспалительных цитокинов в ассоциации с аллельным полиморфизмом иммунорегуляторных генов (*IL2*, *IL4*, *IL10*, *TNFA*, *IFNG* и *TGFB*) представляются важными для формирования знаний о взаимосвязи особенностей генофондных параметров популяции с закономерностями развития туберкулезной инфекции, позволяют глубже проникнуть в молекулярные механизмы данной патологии. Положения исследования могут служить базисом не только для дальнейшего изучения патогенетических механизмов туберкулезного процесса, но и для разработки новых подходов к прогнозированию клинического течения и исхода туберкулеза легких.

Положения, выносимые на защиту:

1. Среди аллельных вариантов генов цитокинов у больных туберкулезом легких чаще, чем у здоровых доноров обнаруживаются аллель *G* и генотип *GG* (*T-330G*) гена *IL2*, аллель *T* и генотип *CT* (*C-590T*) гена *IL4*, аллель *A* и генотип *AA* (*C-592A*) гена *IL10*, аллель *A* и генотипы *GA* и *AA* (*G-308A*) гена *TNFA*, аллель *T* и генотип *TT* (*C-509T*) гена *TGFB* и аллель *A* и генотип *AA* (*+874A/T*) гена *IFNG*. У пациентов с инфильтративной формой туберкулеза легких также преобладают генотипы *CT* (*C-590T*) гена *IL4* и *GA* (*G-308A*) гена *TNFA*, а у больных диссеминированным туберкулезом легких – *TT* (*C-590T*) гена *IL4* и генотип *AA* (*G-308A*) гена *TNFA*.

2. Гипосекреция IL-2 и гиперсекреция IL-4, IL-10 *in vitro* и связанный с ними Т-клеточный дефицит у больных туберкулезом легких сопряжены с аллельным полиморфизмом генов *IL2 (T-330G)*, *IL4 (C-590T)*, *IL10 (C-592A)*.
3. Генотипы *GG (T-330G)* гена *IL2*, *CT* и *TT (C-590T)* гена *IL4*, *AA (C-592A)* гена *IL10*, *GA* и *AA (G-308A)* гена *TNFA*, *TT (C-590T)* гена *TGFB* и *AA (+874A/T)* гена *IFNG* ассоциированы с риском заболевания туберкулезом легких. К развитию диссеминированной формы туберкулеза легких предрасполагает носительство «патологических» генотипов *GG (T-330G)* гена *IL2*, *TT (C-590T)* гена *IL4* и *AA (G-308A)* гена *TNFA*.

Реализация и апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии» (Томск, 2009), научной конференции с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных органов и систем в норме и при патологии» (Томск, 2009), Всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии» (Новосибирск, 2010), XV и XVI межгородских конференциях молодых учёных «Актуальные вопросы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2009, 2010), VIII Российско-германской научно-практической конференция «Инновации в медицине. Социально значимые инфекции» (Новосибирск, 2009), X и XI международных конгрессах молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2009, 2010), научных семинарах кафедры патофизиологии ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (Томск, 2008-2011).

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по образованию РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (государственный контракт П718 «Поиск факторов риска и прогнозирования течения и исходов социально значимых заболеваний на основе полиморфных ДНК-маркеров») и Министерства образования и науки РФ по ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (государственный контракт №16.512.11.2046 «Разработка комплекса молекулярно-генетических маркеров дисрегуляции иммунного ответа на *Mycobacterium tuberculosis* для оптимизации диагностики и коррекции вторичной иммунологической недостаточности при туберкулезе легких»).

Результаты работы внедрены в учебный процесс на кафедре патофизиологии (разделы «Патофизиология клетки», «Патофизиология иммунитета», «Воспаление») ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России.

Публикации. По теме диссертации опубликована 21 работа, из них 10 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 164 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов, списка

литературы. Работа иллюстрирована 4 рисунками и 32 таблицами. Библиографический указатель включает 250 источников, из них 149 отечественных и 101 зарубежных авторов.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации. Соискателем лично были выполнены анализ данных литературы по теме диссертации, планирование исследования, постановка цели и задач исследования, пробоподготовка, CD-типирование, иммуноферментный анализ, выделение ДНК, аллель-специфическая полимеразная цепная реакция, статистический анализ результатов, написание и оформление диссертации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе приведены результаты комплексного клинико-лабораторного обследования 160 больных (114 мужчин и 46 женщин) с впервые выявленным туберкулёзом лёгких (ТЛ) в возрасте от 18 до 55 лет (средний возраст $43,32 \pm 13,62$ лет). Пациенты находились на стационарном лечении в Томской областной клинической туберкулёзной больнице (гл. врач – канд. мед. наук Г.В. Янова) во фтизиатерпевтических отделениях № 1 (зав. отд. – О.И. Новосельцева), № 2 (зав. отд. – Т.З. Малиновская).

Диагноз ТЛ устанавливался на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Клиническая форма заболевания определялась на основании данных рентгенологического исследования легких. У всех обследованных пациентов отмечался распространенный деструктивный характер поражения легочной ткани.

Инфильтративный туберкулез легких (ИТЛ) был диагностирован у 110 (68,75%) пациентов и характеризовался на рентгенограмме наличием одной или нескольких неоднородных теней туберкулезного инфильтрата диаметром от 5 до 7 см с очагами распада и обсеменения. Диссеминированный туберкулез легких (ДТЛ) был выявлен у 40 (25%) больных, его рентгенологическим признаком являлось наличие в одном или обоих легких мелких и среднеочаговых изменений неоднородной структуры за счет инфильтрации и распада. Диагноз фиброзно-кавернозного туберкулеза легких был выставлен 7 (4,375%) больным и характеризовался на рентгенограмме наличием нескольких кольцевидных теней более 2 см в диаметре, а также выраженным пневмофиброзом. Двум (1,25%) пациентам был поставлен диагноз туберкулемы и одному (0,625%) больному – казеозная пневмония.

В большинстве случаев просматривался сочетанный характер фаз специфического процесса. Бактериовыделение регистрировалось в 100% случаев болезни. Возбудитель туберкулеза выявляли методом прямой световой микроскопии мазка мокроты, окрашенного по Цилю-Нильсену, а также методом люминесцентной микроскопии с использованием флуорохрома (аурамина). Исследования проводились в

бактериологических лабораториях Томской областной туберкулезной клинической больницы (гл. врач – канд. мед. наук Г.В. Янова) и Томского областного противотуберкулезного диспансера (гл. врач – С.П. Мишустин). В исследование не включались пациенты моложе 18 и старше 55 лет, инфицированные вирусами иммунодефицита человека и гепатита В и С, страдающие аллергическими, иммунологическими и другими инфекционными заболеваниями в стадии обострения.

Группу сравнения составили 102 здоровых донора с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту, не имеющие в анамнезе хронических инфекционных заболеваний, аллергических реакций, заболеваемость острыми респираторными вирусными и бактериальными инфекциями которых составляла не чаще 3-4 раз в год.

Определение общего количества лейкоцитов в периферической крови проводили общепринятыми гематологическими методами.

Имунофенотипирование лимфоцитов периферической крови осуществляли с помощью моноклональных антител: к CD3 (общий маркер Т-лимфоцитов), CD4 (маркер Т-хелперов/индукторов и регуляторных Т-клеток), CD8 (маркер цитотоксических Т-лимфоцитов), CD16 (маркер натуральных киллеров), CD20 (маркер В-лимфоцитов).

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из цельной крови выполняли на градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1077 \text{ кг/м}^3$) («Медбиоспектр», Россия).

Определение содержания IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ и TGF- β в супернатантах культуральных суспензий проводили с помощью твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» метода. Процедуру анализа выполняли по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Протеиновый контур», Россия; «Biosource», США).

Выделение ДНК из периферической крови проводили сорбентным методом согласно инструкции, прилагаемой к набору «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия).

Для исследования полиморфных участков генов цитокинов использовали аллель-специфическую амплификацию специфических участков генома [Кофиади И.А., 2006]. Амплификацию осуществляли согласно инструкции, прилагаемой к набору «АмплиСенс-200-1» («ИнтерЛабСервис», Россия), в пробирках типа «Эппендорф» путём полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе, с применением амплификатора «Терцик МС2» («ДНК-технология», Россия). Было исследовано шесть полиморфных сайтов генов шести цитокинов: T-330G гена IL2 (rs2069762), C-590T гена IL4 (rs2243250), C-592A гена IL10 (rs1800872), G-308A гена TNFA (rs1800629), +874A/T гена IFNG (rs2340561), C-509T гена TGF β (rs1800469). В качестве маркера размера ДНК использовали плазмиду pUC19, расщепленную рестриктазой MspI («Сибэнзим», Россия).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием стандартного пакета программ SPSS v.11.0. Для всех имеющихся выборок данных проверяли гипотезу нормальности распределения по критерию Колмогорова-Смирнова. Для каждой выборки вычисляли медиану, 25-й и 75-й процентиля. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся нормальному распределению, использовали U-критерий Манна-Уитни (для независимых выборок) и критерий Вилкоксона (для зависимых выборок). Для исследования взаимосвязи признаков использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия считались достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$. Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса. Обработка результатов генетических исследований осуществлялась с использованием критерия отношения шансов OR с расчетом для него 95% доверительного интервала [Флейс Дж., 1989].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одна из важных особенностей T-лимфоцитов – способность синтезировать цитокины, которые осуществляют регуляцию иммунных процессов в организме [Фрейдлин И.С., 2001]. Макрофаги посредством секретируемых в ответ на микобактериальную инфекцию IL-1, IL-12, TNF- α способствуют дифференцировке и клональной экспансии Th1 и, соответственно, формированию Th1-иммунного ответа. Th1-лимфоциты, продуцирующие IL-2 и IFN- γ , выполняют основную защитную роль против *Mycobacterium tuberculosis*, тогда как производство Th2-ассоциированных цитокинов и медиаторов с иммуносупрессорной активностью (в частности IL-4, IL-10 и TGF- β), согласно парадигме Th1/Th2, способствует реализации иммунного ответа по гуморальному типу с одновременным подавлением T-клеточных реакций, что приводит к клинической манифестации туберкулезной инфекции [Power С.А., 1998; Хаитов Р.М. и соавт., 2011].

В настоящее время не вызывает сомнения то, что генетические факторы в значительной мере определяют восприимчивость организма к различным заболеваниям, в том числе и инфекционной природы. Так, у большинства людей, инфицированных *M. tuberculosis*, развивается протективный иммунитет, и лишь у 5-10% людей иммунный ответ оказывается неэффективным, в результате чего происходит реактивация латентно протекающей инфекции и развитие активных форм туберкулеза [Игмангулова М.М., 2005]. Это может быть обусловлено тем, что генетический контроль за функционированием иммунной системы вариабелен и может повышать риск заболевания ТЛ. В связи с тем, что экзонные последовательности генов цитокинов очень консервативны, а экспрессия соответствующего участка генома непосредственно контролируется его промотором, в настоящей работе был исследован

функциональный полиморфизм генов иммунорегуляторных цитокинов. В силу особенностей иммунопатогенеза ТЛ актуальным было изучение влияния аллельного полиморфизма генов *IL2*, *IL4*, *IL10*, *TNFA*, *IFNG*, *TGFB* на уровень спонтанной и BCG-индуцированной продукции соответствующих цитокинов *in vitro*.

При сравнении частот аллелей и генотипов у больных ТЛ и здоровых доноров была установлена связь полиморфизма генов про- и противовоспалительных цитокинов с развитием ТЛ. Аллели *330G* гена *IL2*, *308A* гена *TNFA*, *874A* гена *IFNG*, *590T* гена *IL4*, *592A* гена *IL10*, *509T* гена *TGFB* значимо чаще регистрировались в группе больных ТЛ, чем в группе здоровых доноров (табл. 1).

Таблица 1

Распределение генотипов и аллелей полиморфизмов генов цитокинов
(%, абс.) среди здоровых доноров и больных туберкулезом легких

| Поли- морфизм | Генотипы и аллели | Характеристика обследованных лиц | | χ^2 | OR (95% CI) |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|------------------|
| | | Здоровые доноры | Больные туберкулезом легких | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| <i>T-330G</i> гена <i>IL2</i> | <i>TT</i> | 46,08 (47) | 21,25 (34) | 21,98 ($p_1 < 0,05$) | 0,32 (0,18-0,54) |
| | <i>TG</i> | 46,08 (47) | 55,63 (89) | | 1,47 (0,89-2,42) |
| | <i>GG</i> | 7,84 (8) | 23,12 (37) | | 3,53 (1,57-7,95) |
| | <i>G</i> | 30,88 (63) | 50,94 (163) | 19,62 ($p_1 < 0,05$) | 2,32 (1,61-3,36) |
| <i>G-308A</i> гена <i>TNFA</i> | <i>GG</i> | 50,00 (51) | 29,37 (47) | 11,77 ($p_1 < 0,05$) | 0,42 (0,25-0,70) |
| | <i>GA</i> | 42,15 (43) | 56,25 (90) | | 1,76 (1,07-2,91) |
| | <i>AA</i> | 7,85 (8) | 14,38 (23) | | 1,97 (0,85-4,60) |
| | <i>A</i> | 29,04 (59) | 42,52 (136) | 9,83 ($p_1 < 0,05$) | 1,82 (1,25-2,64) |
| <i>+874 A/T</i> гена <i>IFNG</i> | <i>AA</i> | 17,65 (18) | 36,25 (58) | 12,80 ($p_1 < 0,05$) | 2,64 (1,45-4,85) |
| | <i>AT</i> | 53,92 (55) | 48,13 (77) | | 0,79 (0,48-1,30) |
| | <i>TT</i> | 28,43 (29) | 15,62 (25) | | 0,47 (0,25-0,85) |
| | <i>T</i> | 55,43 (113) | 39,61 (127) | 12,38 ($p_1 < 0,05$) | 0,53 (0,37-0,76) |
| <i>C-590T</i> гена <i>IL4</i> | <i>CC</i> | 69,61 (71) | 48,75 (78) | 9,39 ($p_1 < 0,05$) | 0,42 (0,25-0,70) |
| | <i>CT</i> | 26,47 (27) | 45 (72) | | 2,33 (1,33-3,90) |
| | <i>TT</i> | 3,92 (4) | 6,25 (10) | | 1,63 (0,50-5,35) |
| | <i>T</i> | 17,16 (35) | 28,75 (92) | 9,12 ($p_1 < 0,05$) | 1,95 (1,26-3,02) |
| <i>C-592A</i> гена <i>IL10</i> | <i>CC</i> | 48,04 (49) | 30,62 (49) | 9,46 ($p_1 < 0,05$) | 0,48 (0,29-0,80) |
| | <i>CA</i> | 44,12 (45) | 53,13 (85) | | 1,44 (0,87-2,36) |
| | <i>AA</i> | 7,84 (8) | 16,25 (26) | | 2,28 (1,01-5,26) |
| | <i>A</i> | 29,91 (61) | 42,82 (137) | 8,83 ($p_1 < 0,05$) | 1,75 (1,21-2,55) |

Продолжение табл. 1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------------------------|-----------|------------|-------------|---------------------------|------------------|
| <i>C-509T</i> гена <i>TGFB</i> | <i>CC</i> | 43,14 (44) | 21,87 (35) | 14,38 ($p_1 < 0,05$) | 0,37 (0,21-0,63) |
| | <i>CT</i> | 42,16 (43) | 51,88 (83) | | 1,48 (0,90-2,44) |
| | <i>TT</i> | 14,70 (15) | 26,25 (42) | | 2,06 (1,08-3,96) |
| | <i>T</i> | 35,81 (73) | 52,22 (167) | 13,50 ($p_1 < 0,05$) | 1,96 (1,37-2,81) |

Примечание. Здесь и в последующих таблицах 2 и 3: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров; χ^2 – стандартный критерий Пирсона для сравнения частот генотипов и аллелей генов; OR – критерий отношения шансов, отражающий относительный риск развития заболевания при определенном генотипе по сравнению со здоровыми донорами с 95% доверительным интервалом.

Относительный риск для носителей генотипов *GG* (*T-330G*) гена *IL2*, *GA* (*G-308A*) гена *TNFA*, *AA* (+874*A/T*) гена *IFNG*, *CT* (*C-590T*) гена *IL4*, *AA* (*C-592A*) гена *IL10* и *TT* (*C-509T*) гена *TGFB* был достоверно выше единицы, что позволило сделать вывод о предрасполагающем к заболеванию эффекте этих генотипов. Кроме этого, выявлена протективная роль в отношении ТЛ генотипов *TT* (*T-330G*) гена *IL2*, *GG* (*G-308A*) гена *TNFA*, *TT* (+874*A/T*) гена *IFNG*, *CC* (*C-590T*) гена *IL4*, *CC* (*C-592A*) гена *IL10* и *CC* (*C-509T*) гена *TGFB* (табл. 1).

У больных с инфильтративной и диссеминированной формами ТЛ распределение частот аллелей и генотипов исследуемых генов цитокинов было сходным. Однако в группе больных ДТЛ значимо чаще регистрировался аллель *330G* гена *IL2*, нежели в группе больных ИТЛ. Ассоциацию с развитием ИТЛ проявляли генотипы *GA* (*G-308A*) гена *TNFA* и *CT* (*C-590T*) гена *IL4*, а с развитием ДТЛ – генотипы *AA* (*G-308A*) гена *TNFA* и *CT* и *TT* (*C-590T*) гена *IL4* (табл. 2).

Исследования ассоциаций аллельных вариантов генов цитокинов с заболеваниями связаны с попытками установить иммуногенетические маркеры, предрасполагающие к их развитию. ТЛ относится к группе мультифакторных заболеваний, в основе которых лежит, наряду с действием болезнетворных факторов внешней среды, неблагоприятное сочетание аллельных вариантов генов, в частности генов иммунного контроля [Гончарова И.А. и соавт., 2006]. Это обусловлено полиморфностью системы цитокинов, их плеiotропным действием, а также тем, что конечный эффект воздействия на клетку формируется комплексом медиаторов. В связи с этим приоритетным на сегодня является изучение взаимосвязи того или иного заболевания с целым рядом аллельных вариантов генов цитокинов [Сенников С.В., 2002].

В ходе проведенного исследования было показано, что наибольший риск развития ТЛ ассоциирован с одновременным носительством гомозиготных генотипов *GG* (*T-330G*) гена *IL2* и *AA* (+874*A/T*) гена *IFNG* (OR=7,97). Протективный эффект в отношении ТЛ опосредован сочетанием генотипов *TT* (*T-330G*) гена *IL2* и *CC* (*C-592A*) гена *IL10* (OR=0,14).

Таблица 2

Распределение генотипов и аллелей полиморфизмов генов цитокинов (% , абс.) среди здоровых доноров и больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания

| Поли-морфизм | Генотипы и аллели | Здоровые доноры | Больные ИТЛ | χ^2 | OR (95% CI) | Больные ДТЛ | χ^2 | OR (95% CI) |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------|-------------|------------------------|------------------|-------------|------------------------|-----------------------|
| <i>T-330G</i> гена <i>IL2</i> | <i>TT</i> | 46,08 (47) | 24,55 (27) | 12,21 ($p_1 < 0,05$) | 0,38 (0,21-0,68) | 12,5 (5) | 19,62 ($p_1 < 0,05$) | 0,17 (0,06-0,46) |
| | <i>TG</i> | 46,08 (47) | 58,18 (64) | | 1,63 (0,95-2,80) | 57,5 (23) | | 4,30 ($p_2 < 0,05$) |
| | <i>GG</i> | 7,84 (8) | 17,27 (19) | | 2,36 (1,01-6,32) | 30,00 (12) | | 5,04 (1,87-13,54) |
| | <i>G</i> | 30,88 (63) | 46,36 (102) | 10,67 ($p_1 < 0,05$) | 1,93 (1,30-2,88) | 58,75 (47) | 18,81 ($p_1 < 0,05$) | 3,19 (1,87-5,44) |
| <i>G-308A</i> гена <i>TNFA</i> | <i>GG</i> | 50,00 (51) | 31,81 (35) | 7,60 ($p_1 < 0,05$) | 0,47 (0,27-0,82) | 25,00 (10) | 10,02 ($p_1 < 0,05$) | 0,33 (0,15-0,75) |
| | <i>GA</i> | 42,15 (43) | 60,00 (66) | | 2,06 (1,19-3,56) | 52,50 (21) | | 3,38 ($p_2 < 0,05$) |
| | <i>AA</i> | 7,85 (8) | 8,19 (9) | | 1,05 (0,39-2,83) | 22,50 (9) | | 3,41 (1,21-9,61) |
| | <i>A</i> | 29,04 (59) | 38,24 (84) | 4,06 ($p_1 < 0,05$) | 1,52 (1,01-2,28) | 48,67 (39) | 10,00 ($p_1 < 0,05$) | 2,34 (1,37-3,98) |
| +874 <i>A/T</i> гена <i>IFNG</i> | <i>AA</i> | 17,65 (18) | 34,55 (38) | 10,62 ($p_1 < 0,05$) | 2,46 (1,29-4,69) | 45 (18) | 11,54 ($p_1 < 0,05$) | 3,82 (1,71-8,54) |
| | <i>AT</i> | 53,92 (55) | 50,91 (56) | | 0,89 (0,52-1,52) | 40 (16) | | 0,45 ($p_2 > 0,05$) |
| | <i>TT</i> | 28,43 (29) | 14,54 (16) | | 0,43 (0,22-0,85) | 15 (6) | | 0,44 (0,17-1,17) |
| | <i>T</i> | 55,43 (113) | 40,00 (88) | 10,06 ($p_1 < 0,05$) | 0,54 (0,36-0,79) | 35,00 (28) | 9,56 ($p_1 < 0,05$) | 0,43 (0,25-0,74) |
| <i>C-590T</i> гена <i>IL4</i> | <i>CC</i> | 69,61 (71) | 51,82 (57) | 7,61 ($p_1 < 0,05$) | 0,47 (0,27-0,83) | 42,50 (17) | 9,89 ($p_1 < 0,05$) | 0,32 (0,15-0,69) |
| | <i>CT</i> | 26,47 (27) | 44,55 (49) | | 2,23 (1,25-3,89) | 45,00 (18) | | 4,36 ($p_2 < 0,05$) |
| | <i>TT</i> | 3,92 (4) | 3,63 (4) | | 0,92 (0,23-3,80) | 12,50 (5) | | 3,50 (1,01-13,78) |
| | <i>T</i> | 17,16 (35) | 25,91 (57) | 4,77 ($p_1 < 0,05$) | 1,69 (1,05-2,71) | 35,00 (28) | 10,67 ($p_1 < 0,05$) | 2,60 (1,45-4,67) |
| <i>C-592A</i> гена <i>IL10</i> | <i>CC</i> | 48,04 (49) | 29,09 (32) | 9,65 ($p_1 < 0,05$) | 0,44 (0,25-0,78) | 35 (14) | 2,81 ($p_1 > 0,05$) | 0,58 (0,27-1,24) |
| | <i>CA</i> | 44,12 (45) | 53,64 (59) | | 1,47 (0,85-2,52) | 50 (20) | | 0,50 ($p_2 > 0,05$) |
| | <i>AA</i> | 7,84 (8) | 17,27 (19) | | 2,45 (1,02-5,88) | 15 (6) | | 2,07 (0,67-6,41) |
| | <i>A</i> | 29,91 (61) | 44,12 (97) | 9,12 ($p_1 < 0,05$) | 1,85 (1,24-2,76) | 40,09 (32) | 2,66 ($p_1 > 0,05$) | 1,56 (0,91-2,68) |
| <i>C-509T</i> гена <i>TGFB</i> | <i>CC</i> | 43,14 (44) | 21,81 (24) | 11,54 ($p_1 < 0,05$) | 0,37 (0,20-0,67) | 25 (10) | 6,07 ($p_1 < 0,05$) | 0,44 (0,19-0,99) |
| | <i>CT</i> | 42,16 (43) | 53,63 (59) | | 1,59 (0,92-2,73) | 45 (18) | | 0,89 ($p_2 > 0,05$) |
| | <i>TT</i> | 14,70 (15) | 24,56 (27) | | 1,89 (1,94-3,80) | 30 (12) | | 2,49 (1,04-5,94) |
| | <i>T</i> | 35,81 (73) | 51,41 (113) | 10,43 ($p_1 < 0,05$) | 1,90 (1,28-2,80) | 52,51 (42) | 6,66 ($p_1 < 0,05$) | 1,98 (1,17-3,35) |

Примечание. Здесь и в таблице 3: p_2 – уровень статистической значимости различий по сравнению с соответствующими показателями у больных ИТЛ

Известно, что перечисленные полиморфизмы генов *IL2*, *TNFA*, *IL4*, *IL10* и *TGFB* расположены в области промотора, а полиморфизм гена *IFNG* находится в первом интроне, следовательно, замена одного нуклеотида на другой в полиморфном сайте может влиять на уровень экспрессии гена, а соответственно, и на уровень синтеза кодируемого им продукта [Симбирцев А.С., 1998; Кетлинский С.А., 2008].

Продукция провоспалительных цитокинов IL-2, TNF- α и IFN- γ , обеспечивающих развитие протективного Th1-иммунного ответа на микобактериальную инфекцию зависит от количества клеток-продуцентов этих иммунорегуляторных молекул – моноцитов/макрофагов и Т-лимфоцитов, и кроме этого, оказывает модулирующее влияние на соотношение отдельных CD-субпопуляций Т-клеток (CD3⁺ общих, CD4⁺ хелперов/индукторов и Т-регуляторных, CD8⁺ цитотоксических) и количество CD16⁺ НК в крови [Симбирцев А.С., 2004].

В ходе проведенных исследований было показано, что у больных ТЛ дефицит CD3⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови сопряжен со снижением продукции TNF- α (как спонтанной, так и BCG-индуцированной) и BCG-индуцированной секреции IL-2 *in vitro*.

Недостаточность продукции IL-2 при ТЛ может быть как причиной, так и следствием дефицита Т-лимфоцитов или их анергии (что подтверждалось результатами корреляционного анализа в отношении CD3⁺ Т-клеток: $r=0,436$, $p<0,05$) [Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2004; Кноринг Б.Е., 2006]. В пользу последнего свидетельствует, в частности, незначительное повышение (относительно контрольных значений) секреции IL-2 *in vitro* при индукции клеток вакцинным штаммом BCG у больных ИТЛ и, напротив, ее уменьшение при ДТЛ (табл. 3).

Таблица 3

Содержание цитокинов в супернатантах культуральных суспензий (пг/мл) у здоровых доноров и больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы заболевания, Me (Q_{25%}:Q_{75%})

| Секреция цитокина | | Группы обследованных лиц | | |
|-------------------|------------------|--|--|--|
| | | Здоровые доноры | Больные туберкулезом легких | |
| | | | Больные ИТЛ | Больные ДТЛ |
| 1 | | 2 | 3 | 4 |
| IL-2 | Спонтанная | 18,36 (14,26-31,65) | 17,67 (10,81-28,03) $p_1>0,05$ | 21,75 (10,81-33,76) $p_1>0,05$ $p_2>0,05$ |
| | При индукции BCG | 115,20 (20,04-157,30) $p_3<0,05$ | 21,35 (13,19-32,80) $p_1<0,05$ $p_3>0,05$ | 16,58 (11,41-26,78) $p_1<0,05$ $p_2>0,05$ $p_3>0,05$ |

Продолжение табл. 3

| 1 | | 2 | 3 | 4 |
|---------------|------------------------|---|---|--|
| IL-4 | Спонтанная | 32,23 (21,14-45,04) | 36,78 (21,40-51,50) $p_1 > 0,05$ | 54,79 (38,64-70,45) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ |
| | При индукции BCG | 58,74 (32,18-62,12) $p_3 > 0,05$ | 36,36 (17,05-52,22) $p_1 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ | 61,36 (43,18-75,00) $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ |
| IL-10 | Спонтанная | 16,24 (8,11-33,36) | 38,12 (23,21-66,80) $p_1 < 0,05$ | 25,24 (17,80-52,14) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ |
| | При индукции BCG | 20,22 (20,22-35,11) $p_3 > 0,05$ | 43,64 (25,79-92,13) $p_1 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ | 33,36 (22,21-81,19) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ |
| TNF- α | Спонтанная | 216,60 (186,50-329,50) | 106,20 (73,01-119,57) $p_1 < 0,05$ | 91,09 (38,76-102,80) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ |
| | При индукции BCG | 144,64 (119,60-246,10) $p_3 > 0,05$ | 95,63 (71,71-119,55) $p_1 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ | 106,20 (71,71-140,50) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ |
| IFN- γ | Спонтанная | 31,91 (28,51-42,60) | 120,86 (73,07-154,30) $p_1 < 0,05$ | 154,90 (131,60-244,25) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ |
| | При индукции BCG | 58,90 (53,55-64,10) $p_3 < 0,05$ | 185,60 (146,60-239,00) $p_1 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ | 123,40 (73,41-154,90) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ |
| TGF- β | Спонтанная | 967,10 (913,23-1487,23) | 989,12 (864,72-1250,23) $p_1 > 0,05$ | 928,95 (671,03-1959,13) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ |
| | При индукции BCG | 1048,40 (764,14-1186,44) $p_3 > 0,05$ | 1250,40 (838,20-1483,00) $p_1 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ | 770,73 (654,90-1105,30) $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ |

Примечание: p_3 – уровень статистической значимости различий BCG-индуцированной и спонтанной продукции цитокина.

При изучении взаимосвязи между содержанием IL-2 в супернатантах культуральных суспензий с добавлением BCG и вариантом аллельного полиморфизма *T-330G* соответствующего гена было показано, что у больных ТЛ с генотипом *GG* уровень секреции IL-2 *in vitro* был ниже (7,86 (5,92-9,99) пг/мл), чем у пациентов с генотипами *TG* (25,59 (15,60-37,87) пг/мл) и *TT* (31,88 (21,75-53,82) пг/мл). Таким образом, показана ассоциация генотипа *GG* гена *IL2* с низкой продукцией соответствующего цитокина при индукции антигеном (BCG).

Обнаруженный у обследованных больных ТЛ дефицит спонтанной и (при ИТЛ) BCG-индуцированной продукции TNF- α *in vitro* (табл. 3), с учетом данных литературы, может быть обусловлен нарушением секреторирующей активности моноцитов/макрофагов в результате токсического действия *M. tuberculosis* на процессы биосинтеза ДНК и белка или наличием антител к TNF- α [Наследникова И.О. и соавт., 2009]. Гипопродукция TNF- α при ТЛ ведет к глубокой дисрегуляции иммунного ответа, нарушению процесса гранулемообразования и неспособности контролировать рост *M. tuberculosis*, вследствие чего развиваются тяжелые, остро прогрессирующие формы туберкулеза легких.

В то же время установлено, что у больных ТЛ на фоне повышения (относительно соответствующих показателей в группе здоровых доноров) содержания NK-клеток и сопоставимого с контролем количества CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов в крови спонтанная и BCG-индуцированная продукция IFN- γ была выше нормы (табл. 3).

Обнаруженное увеличение продукции IFN- γ *in vitro* у больных ТЛ могло быть обусловлено несколькими причинами. Возрастание синтеза IFN- γ можно рассматривать как универсальную реакцию иммунной системы в ответ на заражение *M. tuberculosis*. Роль IFN- γ в иммунном ответе против *M. tuberculosis* обусловлена его активирующим влиянием на фагоцитарную активность макрофагов и прямую цитотоксичность Т-лимфоцитов и NK-клеток [Mitchell S.A., 2001]. Следует заметить, что высокая концентрация IFN- γ , вероятнее всего, могла поддерживаться за счет секреторных способностей NK-клеток, количество которых в крови у больных ТЛ значительно повышалось. Действительно, в литературе описан один из механизмов компенсации, когда в условиях дефицита Т-лимфоцитов некоторые их функции, например, продукцию IFN- γ , могут брать на себя NK-клетки, количество которых повышается, а активность возрастает в несколько десятков раз под влиянием IFN- α или IL-12 [Воронкова О.В., 2007]. С другой стороны, повышенный уровень образования IFN- γ указывает на интерферогенную активность самого возбудителя [Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2004]. На фоне высокого уровня спонтанной продукции IFN- γ выявлялся также высокий BCG-индуцированный уровень образования цитокина, что может свидетельствовать о повышенной реактивности NK-клеток.

При изучении продукции TNF- α и IFN- γ в зависимости от полиморфного

варианта соответствующего гена было показано, что в группе больных ТЛ максимальный уровень продукции TNF- α *in vitro* обнаруживается у лиц с генотипом AA (G-308A) (193,80 (187,8-197,7) пг/мл), а минимальный – у носителей генотипа GG (38,76(35,87-38,76)пг/мл) гена *TNFA*. Также в группе больных ТЛ у гомозигот TT (157,28 (147,30-175,20) пг/мл) и гетерозигот AT (120,86 (105,55-154,30) пг/мл) по полиморфизму +874A/T гена *IFNG* уровень продукции IFN- γ *in vitro* был статистически значимо выше, чем у гомозигот AA (56,35 (39,28-79,84) пг/мл).

Поскольку носительство «низкопродукцирующего» генотипа AA (+874A/T) гена *IFNG* и «высокопродукцирующего» генотипа AA (G-308A) гена *TNFA* у больных ТЛ сочеталось с гиперпродукцией IFN- γ и снижением секреции TNF- α *in vitro* можно полагать, что такого рода изменения цитокинопродукции не связаны с исследованными полиморфизмами генов цитокинов. По-видимому, они являются результатом действия *M. tuberculosis* на клетки-продуценты этих цитокинов. Как указывалось выше, повышение продукции IFN- γ может расцениваться как механизм компенсации дефицита Т-лимфоцитов и их функциональной активности за счет активации НК-клеток, а гипосекреция TNF- α *in vitro* – как следствие супрессии цитокинсекреторной функции моноцитов/макрофагов [Воронкова О.В., 2007].

Следует заметить, что сам факт клинической манифестации ТЛ связывают с истощением клеточного звена иммунитета на фоне активации гуморального иммунного ответа [Симбирцев А.С., 1998, 2004; Фрейдлин И.С., 2005].

IL-4 – ведущий цитокин с противовоспалительными свойствами, продуцируемый Th2-лимфоцитами и осуществляющий контроль пролиферации, дифференцировки и функциональной активности В-лимфоцитов, т.е. антительного иммунного ответа, неадекватного при внутриклеточном паразитировании микобактерий [Фрейдлин И.С., 1998; Черешнев В.А., 2001]. Наряду с IL-4 основными противовоспалительными цитокинами с иммуносупрессорной активностью являются IL-10 и TGF- β , секретируемые преимущественно регуляторными Т-клетками с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg). TGF- β оказывает негативное регуляторное действие на функции иммунной системы, подавляет пролиферацию Т-лимфоцитов, цитотоксическую активность CD8⁺ Т-клеток, лимфокинактированных киллеров, ингибирует секрецию иммуноглобулинов активированными В-лимфоцитами [Никитин Н.А., 2009]. IL-10, являясь антагонистом IL-12 и обладая противовоспалительными и иммуносупрессорными свойствами, опосредует поляризацию иммунного ответа в направлении Th2-пути и подавление антигенспецифического Т-клеточного иммунного ответа. Он тормозит пролиферативный ответ Т-клеток, антигенпрезентирующую и провоспалительную активность макрофагов, препятствует формированию гранулемы в очаге специфического воспаления и тем

самым способствует диссеминации туберкулезной инфекции [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008].

В частности, было показано, что у больных ТЛ увеличение числа CD20⁺ В-лимфоцитов в крови сопряжено с повышением спонтанной и VCG-индуцированной продукции IL-10 *in vitro* (табл. 3). При этом у больных ИТЛ спонтанный уровень продукции IL-4 был близок к контрольным значениям, а VCG-индуцированный – значимо ниже нормы. При диссеминированной форме ТЛ спонтанная продукция IL-4 *in vitro*, напротив, была значимо выше, чем в группе здоровых доноров, однако при стимуляции клеток вакцинным штаммом VCG существенного прироста образования исследуемого цитокина выявлено не было (табл. 3).

Анализ ассоциации генотипов полиморфизмов C-590T гена *IL4* и C-592A гена *IL10* с содержанием соответствующих цитокинов в супернатантах культуральных суспензий показал, что в группе больных ТЛ базальная и VCG-индуцированная секреция IL-4 *in vitro* у пациентов с генотипом TT (70,45(62,12-109,4) пг/мл) была значимо выше, чем в случае носительства генотипов CT (38,64 (27,27-50,00) пг/мл) и CC (40,0(17,05-57,12) пг/мл) полиморфного сайта C-590T гена *IL4*, а продукция IL-10 у больных с генотипом CC полиморфного сайта гена *IL10* (19,27(16,40-23,37) пг/мл) ниже, чем у пациентов, имеющих генотипы CA (52,14(39,25-74,94) пг/мл) и AA (114,04(95,75-120,04) пг/мл).

Таким образом, у больных ТЛ генотипы CT (для больных ИТЛ) и TT (для больных ДТЛ) гена *IL4* и генотип AA (C-592A) гена *IL10* ассоциированы с повышенной продукцией соответствующих интерлейкинов *in vitro*.

Помимо этого, в ходе проведенного исследования было выявлено, что на фоне снижения количества CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови уровень спонтанной секреции TGF-β у больных ТЛ был сопоставимым с соответствующими значениями в группе здоровых доноров (табл. 3).

Повышение уровня TGF-β, как известно, выявляется преимущественно в период регрессии острофазных явлений и активации процессов репарации [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008]. Вероятно, факт обследования больных ТЛ в острый период заболевания мог обуславливать отсутствие изменений секреции цитокина. VCG-индуцированный уровень секреции TGF-β *in vitro* также не претерпевал выраженных изменений. По-видимому, это связано с тем, что регуляторные Т-клетки – основные продуценты данного цитокина, изначально являясь функционально анергичной популяцией Т-лимфоцитов, малочувствительны к действию VCG, что объясняет отсутствие ответной TGF-β-секреторной реакции, индуцированной вакциной, как у здоровых доноров, так и у больных ТЛ (табл. 3).

Анализ продукции TGF-β *in vitro* у больных ТЛ в зависимости от аллельного варианта полиморфизма C-509T гена *TGFB* показал, что у гомозигот по аллелю T

она является максимальной ((4276,10(1913,1-2872,1) пг/мл), а у гомозигот по аллелю *C* – минимальной ((104,05(91,09-119,57) пг/мл).

Подытоживая полученные данные, следует отметить, что особенности патогенеза туберкулезной инфекции обусловлены, с одной стороны, сложным характером влияния *M. tuberculosis* на иммунокомпетентные клетки макроорганизма, а с другой стороны, – иммунологическими и молекулярно-генетическими особенностями формирования и течения патологического процесса у пациента. Так, показано, что дефицит CD3⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов сочетается с дефицитом секреции IL-2 и увеличением продукции IL-10 *in vitro*, что обусловлено носительством аллеля *G* и генотипа *GG* (*T-330G*) гена *IL2*, обеспечивающего низкую продукцию соответствующего цитокина, и аллеля *A* и генотипа *AA* (*C-592A*) гена *IL10*, ассоциированных с гиперпродукцией IL-10. Снижение секреции IL-2 и увеличение продукции IL-10 также могло быть обусловлено носительством «патологического» аллеля *T* и генотипа *CT* (*C-590T*) гена *IL4*, ассоциированных с повышенной продукцией данного противовоспалительного цитокина. Повышение секреции IFN- γ и снижение образования TNF- α *in vitro* у больных ТЛ не связано с носительством исследованных полиморфных сайтов генов, поскольку их ассоциации с частотой встречаемости «высокопродуцирующего» аллеля *T* и генотипа *TT* (+874A/T) гена *IFNG* и «низкопродуцирующего» аллеля *G* и генотипа *GG* (*G-308A*) гена *TNFA* выявлено не было.

Полученные результаты обосновывают допущение о том, что структурная организация промоторной области гена влияет на продукцию кодируемого продукта, но не в полной мере определяет концентрацию синтезируемого белка. *In vivo* при контакте организма с чужеродным антигеном учитываются резервные возможности иммунной системы, заложенные в индивидуальном наборе генов, а также общее состояние системы противoinфекционной защиты на момент проникновения инфектогена [Gardy J.L. et al., 2011].

ВЫВОДЫ:

1. У больных туберкулезом легких аллель *G* и генотип *GG* (*T-330G*) гена *IL2*, аллель *T* и генотип *CT* (*C-590T*) гена *IL4*, аллель *A* и генотип *AA* (*C-592A*) гена *IL10*, аллель *A* и генотипы *GA* и *AA* (*G-308A*) гена *TNFA*, аллель *T* и генотип *TT* (*C-590T*) гена *TGFB* и аллель *A* и генотип *AA* (+874A/T) гена *IFNG* встречаются чаще, чем у здоровых доноров. У пациентов с инфильтративным туберкулезом легких значимо выше также частота встречаемости генотипов *CT* (*C-590T*) гена *IL4* и *GA* (*G-308A*) гена *TNFA*, а у больных диссеминированным туберкулезом легких – генотипов *TT* (*C-590T*) гена *IL4* и *AA* (*G-308A*) гена *TNFA*.
2. Дефицит CD3⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови у больных туберкулезом легких сочетается с гипосекрецией IL-2 и увеличением продукции IL-10 *in vitro* в связи с носительством «патологического» аллеля *G* и генотипа *GG* (*T-330G*) гена *IL2*

- (ассоциированных с низкой продукцией IL-2) и аллеля *A* и генотипа *AA* (*C-592A*) гена *IL10* (ассоциированных с гиперпродукцией IL-10).
3. Повышенное содержание CD20⁺ В-лимфоцитов в крови у больных туберкулезом легких сопряжено с гиперсекрецией IL-4 *in vitro* в связи с носительством «патологического» аллеля *T* и генотипа *CT* (*C-590T*) гена *IL4*, ассоциированных с повышенной продукцией цитокина.
 4. Гиперсекреция IFN- γ и гипосекреция TNF- α *in vitro*, сочетающиеся с повышенным содержанием CD16⁺ клеток, нормальным числом CD8⁺ и дефицитом CD3⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови, не связаны с аллельным полиморфизмом генов *IFNG* и *TNFA*, о чем свидетельствует низкая частота встречаемости аллеля *T* и генотипа *TT* (+874A/T) гена *IFNG* и, напротив, высокая частота обнаружения аллеля *A* и генотипа *AA* (*G-308A*) гена *TNFA*, ассоциированных с повышенной цитокинопродукцией.
 5. Подверженность туберкулезной инфекции ассоциирована с генотипами *GG* (*T-330G*) гена *IL2*; *CT* и *TT* (*C-590T*) гена *IL4*, *AA* (*C-592A*) гена *IL10*; *GA* и *AA* (*G-308A*) гена *TNFA*; *TT* (*C-509T*) гена *TGF β* и *AA* (+874A/T) гена *IFNG*.
 6. При диссеминированном туберкулезе легких частота встречаемости аллеля *G* и генотипа *GG* (*T-330G*) гена *IL2*, генотипа *TT* (*C-590T*) гена *IL4* и генотипа *AA* (*G-308A*) гена *TNFA* значимо выше, чем при инфильтративной форме туберкулеза легких.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Иммунопатогенез бактериальных и вирусных инфекций: роль полиморфизма генов цитокинов / И.О. Наследникова, О.И. Уразова, О.В. Воронкова, В.В. Новицкий, Р.Р. Хасанова, В.А. Серебрякова, Т.Е. Будкина, О.А. Васильева, Е.Л. Никулина и др. // **Аллергология и иммунология**. – 2008. – Т. 9, № 3. – С. 294.
2. Сравнительная оценка показателей адаптивного иммунитета при лекарственно-чувствительном и лекарственно-устойчивом туберкулезе легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, Р.Р. Хасанова, В.В. Новицкий, В.А. Серебрякова, О.И. Наследникова, А.Е. Колосова, Т.Е. Будкина, Е.Л. Никулина и др. // **Аллергология и иммунология**. – 2008. – Т. 9, № 3. – С. 288-289.
3. Генетическая гетерогенность возбудителей вирусного гепатита и туберкулеза легких на территории Томской области / О.В. Воронкова, И.О. Наследникова, О.И. Уразова, Р.Р. Хасанова, В.А. Серебрякова, Е.Л. Никулина и др. // **Науки о человеке: Материалы XI конгресса молодых ученых и специалистов** / под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. – Томск: СибГМУ, 2010. – С. 56-57.
4. Полиморфизм генов *IL2* и *IL4* при инфильтративном туберкулезе легких / И.О. Наследникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, О.В. Воронкова, А.И. Рубанова, Ю.В. Стамбула, Р.Р. Хасанова, Т.Е. Будкина, О.В. Колоколова, В.А. Серебрякова, Е.Г. Чурина, Е.Л. Никулина и др. // **Иммунология**. – 2009. – Т. 30, № 2. – С. 88-92.

5. Молекулярно-генетические аспекты прогнозирования и иммунотерапии туберкулёзной инфекции / В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, О.И. Уразова, И.О. Наследникова, А.К. Стрелис, Р.Р. Хасанова, В.А. Серебрякова, Е.Г. Чурина, О.В. Колоколова, Т.Е. Будкина, Н.П. Пирогова, *Е.Л. Никулина* и др. // **Успехи физиологических наук**. – 2009. – Т. 40, № 2. – С. 40-46.

6. Аллельный полиморфизм генов цитокинов при туберкулёзе лёгких / И.О. Наследникова, О.И. Уразова, О.В. Воронкова, А.К. Стрелис, В.В. Новицкий, *Е.Л. Никулина* и др. // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2009. – Т. 148, № 8. – С. 137-139.

7. Молекулярно-генетические аспекты туберкулеза легких / *Е.Л. Никулина*, К.О. Михеева, Н.А. Сухаленцева и др. // Материалы XV Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», г. Санкт-Петербург, 22-23 апреля 2009 г. – СПб., 2009. – С. 85-86.

8. TGF- β как фактор иммуносупрессии у туберкулинотрицательных пациентов с различными клиническими формами туберкулеза легких / А.Е. Колосова, Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, *Е.Л. Никулина* и др. // Материалы VIII Российско-германской научно-практической конференции «Инновации в медицине. Социально значимые инфекции», г. Новосибирск, 13-14 ноября 2009 г. – Новосибирск, 2009. – С. 198-199.

9. Аллельный полиморфизм генов цитокинов при туберкулезе легких / *Никулина Е.Л.*, Наследникова И.О., Уразова О.И. и др. // Материалы VIII Российско-германской научно-практической конференции «Инновации в медицине. Социально значимые инфекции», г. Новосибирск, 13-14 ноября 2009 г. – Новосибирск, 2009. – С. 214-215.

10. Препарат-индуцированный апоптоз лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких / В.А. Серебрякова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Т.Е. Кононова, О.А. Васильева, О.В. Воронкова, И.О. Наследникова, А.Е. Колосова, *Е.Л. Никулина* // Материалы VIII Российско-германской научно-практической конференции «Инновации в медицине. Социально значимые инфекции», г. Новосибирск, 13-14 ноября 2009 г. – Новосибирск, 2009. – С. 218-219.

11. Эпидемиология и иммунопатогенез «BEIJING»-туберкулеза в Томской области / О.И. Уразова, О.В. Воронкова, Р.Р. Хасанова, В.В. Новицкий, И.О. Наследникова, *Е.Л. Никулина* и др. // Материалы VIII Российско-германской научно-практической конференции «Инновации в медицине. Социально значимые инфекции», г. Новосибирск, 13-14 ноября 2009 г. – Новосибирск, 2009. – С. 221-222.

12. Аллельный полиморфизм генов цитокинов IFNG и TGFB как фактор модуляции секреции цитокинов и подверженности туберкулезу легких / *Е.Л. Никулина*, И.О. Наследникова, О.И. Уразова и др. // **Туберкулез и болезни легких**. – 2010. – № 6. – С. 15-19.

13. Аллельный полиморфизм гена IFNG при туберкулезе легких / *Никулина Е.Л.*, Наследникова И.О., Уразова О.И. и др. // **Медицинская иммунология**. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 259-264.
14. Особенности секреции про- и противовоспалительных цитокинов *in vitro* у туберкулиноотрицательных пациентов с различными клиническими формами туберкулеза легких / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, И.О. Наследникова, *Е.Л. Никулина* и др. // **Пульмонология**. – 2010. – № 6. – С. 46-50.
15. Аллельный полиморфизм генов цитокинов при социально значимых инфекционных заболеваниях / И.О. Наследникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, *Е.Л. Никулина* и др. // **Вестник уральской медицинской академической науки**. – 2010. – № 4. – С. 259-264.
16. Реактивность иммунокомпетентных клеток при туберкулезе легких: молекулярно-генетическое исследование / О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, Р.Р. Хасанова, И.О. Наследникова, *Е.Л. Никулина* и др. // **Вестник уральской медицинской академической науки**. – 2010. – № 4. – С. 104-107.
17. Особенности иммунного дисбаланса при различных клинко-патогенетических вариантах остро прогрессирующего туберкулеза легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина, Р.Р. Хасанова, И.О. Наследникова, О.В. Филинюк, В.А. Серебрякова, Ю.В. Колобовникова, *Е.Л. Никулина* и др. // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 42-50.
18. Особенности продукции провоспалительных цитокинов у больных инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких / Е.Г. Чурина, А.Е. Колосова, В.А. Серебрякова, *Е.Л. Никулина* и др. // Материалы XV Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», г. Санкт-Петербург, 21-22 апреля 2010 г. – СПб., 2010. – С. 184-185.
19. Влияние полиморфных вариантов генов IFN-G и TGF-B на восприимчивость к туберкулезной инфекции / *Никулина Е.Л.*, Наследникова И.О., Уразова О.И. и др. // **Науки о человеке: Материалы XI конгресса молодых ученых и специалистов** / под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. – Томск: СибГМУ, 2010. – С. 62-63.
20. Функциональный полиморфизм гена IL-2 при туберкулезе легких / И.О. Наследникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, *Е.Л. Никулина* и др. // **Новые горизонты: инновации и сотрудничество в медицине и здравоохранении: Материалы IX российско-немецкой научно-практической конференции Форума им. Р. Коха и И.И. Мечникова** / под общей ред. О.В. Кравченко (Россия), Г. Хана (Германия). – Новосибирск: Изд-во «Сибирский Центр Деловых Технологий», 2010. – С. 234-236.
21. Роль Т-лимфоцитов в патогенезе туберкулезной инфекции / Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, О.В. Воронкова, В.В. Новицкий, И.О. Наследникова, А.Е. Колосова, *Е.Л. Никулина* и др. // **Туберкулез и болезни легких**. – 2011. – № 3. – С. 3-7.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДТЛ – диссеминированный туберкулез легких
ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких
ОКЛ – общее количество лейкоцитов
ТЛ – туберкулез легких
ЦТЛ – цитотоксические лимфоциты
BCG – бацилла Кальметта-Герена
CD (cluster of differentiation) – дифференцировочные антигены
IFN (interferon) – интерферон
IL (interleukin) – интерлейкины
NK (natural killers) – натуральные киллеры
TGF (transforming growth factor) – трансформирующий фактор роста
TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухолей
Th1 – Т-лимфоциты хелперы типа 1
Th2 – Т-лимфоциты хелперы типа 2