

УДК 616-002.5:575.174.015.3

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ИММУНОСУПРЕССОРНЫХ ЦИТОКИНОВ IL-10 И TGF- $\beta$ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Чурина Е.Г.<sup>1</sup>, Уразова О.И.<sup>1</sup>, Новицкий В.В.<sup>1,2</sup>, Филинчук О.В.<sup>1</sup><sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

### РЕЗЮМЕ

Целью работы явилось исследование связи аллельного полиморфизма генов *IL10* и *TGF $\beta$*  с изменениями базальной и BCG-индуцированной продукции соответствующих иммуносупрессорных цитокинов IL-10 и TGF- $\beta$  мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* у пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких (ТБ) в зависимости от клинической формы заболевания. Оценку продукции цитокинов осуществляли путем измерения их концентрации в культуральных супернатантах методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Для исследования полиморфных участков генов цитокинов использовали аллельспецифичную амплификацию специфических участков генома. Материалом исследования являлись ДНК и супернатанты культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из периферической венозной крови у здоровых добровольцев и больных ТБ. В ходе проведенных исследований выявлено, что базальная и BCG-индуцированная гиперпродукция IL-10 *in vitro* определяется при ТБ вне зависимости от генотипа локуса *C-592A* гена *IL10*. Наряду с этим у больных инфильтративным и диссеминированным ТБ генотип AA полиморфизма гена *IL10* ассоциирован с максимальной, а генотип CC – с минимальной продукцией IL-10 *in vitro*. Анализ продукции TGF- $\beta$  *in vitro* у больных ТБ показал ее увеличение только в случае носительства аллеля *T(C-509T)* гена *TGF $\beta$* . При этом у больных диссеминированным ТБ с гомозиготным генотипом *TT* фиксировалось увеличение как базальной, так и BCG-индуцированной продукции TGF- $\beta$ , а у больных инфильтративным ТБ – только при индукции клеток антигеном BCG.

Таким образом, гиперпродукция цитокинов с ингибирующей активностью у больных ТБ является генетически детерминированной и способствует формированию супрессорного режима иммунорегуляции. При этом выраженное увеличение секреции цитокинов IL-10 и TGF- $\beta$  *in vitro* у больных ТБ ассоциировано с носительством аллеля *A* и генотипа *AA* (*C-592A*) гена *IL10* и аллеля *T* и генотипа *TT* (*C-509T*) гена *TGF $\beta$* .

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** полиморфизм генов, цитокины, IL-10, TGF- $\beta$ , туберкулез легких, иммунный ответ, иммуносупрессия.

### Введение

Генетическая регуляция – сложный процесс, складывающийся из взаимодействия множества участков генома. Туберкулез (ТБ) как мультифакторная патология развивается в результате действия множества генов, каждый из которых вносит свой вклад в развитие туберкулезной инфекции. Полиморфизм генов, белковые продукты которых вовлечены в механизмы иммунологической защиты, определяет степень резистентности к микобактериальной инфекции, а

также тяжесть и продолжительность заболевания [1]. У большинства людей, инфицированных *Mycobacterium tuberculosis*, развивается протективный иммунитет, и лишь у 5–10% индивидов иммунный ответ оказывается неэффективным, в результате чего происходят реактивация латентно протекающей инфекции и развитие активных форм ТБ. С одной стороны, это может быть обусловлено тем, что генетический контроль над функционированием иммунной системы вариативен и способен повышать риск заболевания ТБ. С другой стороны, особенности иммунопатогенеза туберкулезной инфекции связаны с доминирующим влиянием факторов супрессии иммунного ответа на

✉ Уразова Ольга Ивановна, тел.: 8-903-913-1483;  
e-mail: urazova72@yandex.ru

различных стадиях его реализации. Так, ранее нами было установлено, что у больных ТБ повышено содержание в периферической крови регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) на фоне увеличения их функциональной активности [2, 3]. В ходе проведения дальнейших исследований стал актуальным вопрос о том, является ли супрессорный режим функционирования иммунной системы при ТБ генетически детерминированным или же это следствие дисрегуляции иммунной системы, индуцированной возбудителем.

Поскольку экзонные последовательности генов цитокинов очень консервативны, а экспрессия соответствующего участка генома непосредственно контролируется его промотором, целью работы явилось исследование у больных ТБ полиморфизмов промоторных регионов генов *IL10* и *TGFB*, которые влияют на количество генного продукта (продукцию клетками иммуносупрессорных цитокинов IL-10 и TGF- $\beta$ ), но не изменяют аминокислотной последовательности белка и его функций.

## Материал и методы

Обследовано 140 пациентов с впервые выявленным ТБ (90 мужчин и 50 женщин в возрасте от 18 до 55 лет, средний возраст –  $(47,2 \pm 8,3)$  года), поступивших на стационарное лечение в Томскую областную клиническую туберкулезную больницу. Диагноз ТБ устанавливался на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Все больные были разделены на две группы по клинической форме заболевания: группу с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ) составили 95 человек, группу с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) – 45 человек. В исследование не включались больные, получавшие на момент исследования терапию противотуберкулезными, нестероидными противовоспалительными препаратами и глюкокортикостероидами; больные с тяжелыми сопутствующими заболеваниями (онкопатология, сахарный диабет, бронхиальная астма); больные с иммунозависимыми, в том числе аутоиммунными и аллергическими заболеваниями, инфицированные вирусами гепатита и ВИЧ; больные, которым применялась иммунотерапия.

Группу сравнения образовали 75 здоровых добровольцев (45 мужчин и 30 женщин, возраст  $(42,5 \pm 7,4)$  года), 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.

Материалом исследования являлись ДНК и супернатанты культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из периферической крови, взятой утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл у больных ТБ до назначения специфической химиотерапии и у здоровых добровольцев.

Определение концентрации цитокинов в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов до и после стимуляции клеток антигеном (BCG – *Bacilla Calmette-Guerin*) осуществляли с помощью твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» метода (ELISA). Выделение мононуклеарных лейкоцитов из цельной крови выполняли на градиенте плотности фикоoll-урографина ( $\rho = 1077 \text{ кг/м}^3$ ) (Медбиоспектр, Россия). Процедуру иммуноферментного анализа выполняли по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем (Протеиновый контур, Россия; Biosource, США). Оптическую плотность содержимого ячеек планшета регистрировали на фотометре-анализаторе Multiscan EX (Финляндия) при длине волны 450 нм.

Выделение ДНК из крови выполняли согласно инструкции, прилагаемой к набору «ДНК-сорб-В» (ИнтерЛабСервис, Россия). Исследование полиморфных участков генов цитокинов осуществлялось с использованием аллельспецифичной амплификации специфических участков генома [4]. Амплификацию проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору «Ампли-Сенс-200-1» (ИнтерЛабСервис, Россия), методом полимеразной цепной реакции с применением амплификатора «Терцик МС2» (ДНК-технология, Россия). Были исследованы полиморфные сайты *C-592A* гена *IL10* (rs1800872) и *C-509T* гена *TGFB* (rs1800469).

Статистический анализ результатов измерения продукции цитокинов проводили с использованием стандартного пакета программ SPSS 11.0. Гипотезу о нормальном распределении выборочных данных проверяли по критерию Колмогорова–Смирнова. Для каждой выборки вычисляли медиану, 25-й и 75-й процентиля. Для оценки статистической значимости различий выборок, не подчиняющихся нормальному распределению, использовали *U*-критерий Манна–Уитни (для независимых выборок) и критерий Вилкоксона (для зависимых выборок). Различия считались достоверными при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

Известно, что изменения в промоторной области влекут за собой изменение активности контролируемого гена. В настоящей работе нами был проведен поиск ассоциаций аллельных вариантов полиморфных

сайтов *C-592A* гена *IL10* и *C-509T* гена *TGFB* с уровнем продукции соответствующих цитокинов *in vitro*.

Исследование продукции ИЛ-10 *in vitro* зависимости от аллельного полиморфизма *C-592A* гена *IL10* показало, что у здоровых добровольцев и больных ТБ с генотипом *AA* уровень ИЛ-10 в супернатантах культуральных суспензий мононуклеарных лейкоцитов превышал его содержание у лиц, имеющих генотипы *CC* и *CA* (табл. 1). При этом у пациентов с ТБ (равно как и у здоровых добровольцев), несущих генотип *CC(C-592A)* гена *IL10*, базальная и *BCG*-индуцированная продукция исследуемого цитокина была минимальной. В группах больных ИТБ и ДТБ отмечалась сходная картина (табл. 1).

Анализ продукции *TGF-β* *in vitro* в зависимости от аллельного варианта полиморфизма *C-509T* гена *TGFB* выявил, что у гомозиготных по аллелю *T* больных ТБ (как и в группе контроля) отмечался максимальный, а у гомозигот по аллелю *C* – минимальный

ее уровень (табл. 2). Было показано также, что в общей группе пациентов с ТБ продукция *TGF-β* у гомозигот по аллелю *T* и *CT*-гетерозиготных носителей полиморфизма *C-509T* гена *TGFB* была значимо выше, чем у здоровых добровольцев. Что же касается продукции *TGF-β* у больных ТБ с генотипом *CC*, то она оказалась сопоставимой с нормой (табл. 2).

У больных ИТБ и ДТБ, несущих генотип *TT* (*C-509T*) гена *TGFB*, продукция *TGF-β* *in vitro* была выше, чем в случае носительства генотипа *CC* (табл. 2). Кроме того, увеличение базальной продукции исследуемого цитокина по сравнению с группой здоровых добровольцев было зарегистрировано в группах больных ИТБ и ДТБ, несущих генотип *CT*, и у больных ДТБ с генотипом *TT*. У последних и при ИТБ (у носителей аналогичного генотипа *TT*) также было выявлено значимое увеличение *BCG*-индуцированной продукции *TGF-β* сравнительно с нормой (табл. 2).

Таблица 1

Секреция цитокина		Группа обследованных лиц		
		Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких	
			ИТБ	ДТБ
CC	Базальная	8,11 (6,71–9,38) $p_{CC/CA} = 0,042$	19,27 (16,40–23,37) $p_1 = 0,033; p_{CC/CA} = 0,028$	
			22,24 (18,03–24,31) $p_1 = 0,023; p_{CC/CA} = 0,013$	18,55 (16,40–20,74) $p_1 = 0,039; p_{CC/CA} = 0,019$
	При индукции <i>BCG</i>	18,40 (7,11–20,22) $p_{CC/CA} = 0,037$	23,71 (22,21–33,36) $p_1 = 0,040; p_{CC/CA} = 0,011$	
			24,84 (22,89–35,68) $p_1 = 0,034$	25,25 (20,74–30,10) $p_1 = 0,048$
CA	Базальная	23,84 (21,78–33,70) $p_{CA/AA} = 0,032$	52,14 (39,25–74,94) $p_1 = 0,019$	
			58,05 (40,53–91,27) $p_1 = 0,014$	49,19 (37,02–74,94) $p_1 = 0,026; p_{CA/AA} = 0,012$
	При индукции <i>BCG</i>	23,07 (20,22–35,37)	65,73 (37,26–120,00) $p_1 = 0,022$	
			67,60 (46,00–125,60) $p_1 = 0,016$	60,86 (33,36–81,19) $p_1 = 0,028$
AA	Базальная	38,30 (33,36–43,25) $p_{CC/AA} = 0,045$	114,04 (95,75–120,04) $p_1 = 0,023; p_{CC/AA} = 0,008$	
			110,70 (80,80–117,39) $p_1 = 0,008; p_{CC/AA} = 0,011$	122,70 (110,22–124,44) $p_1 = 0,002; p_{CC/AA} = 0,005$
	При индукции <i>BCG</i>	40,04 (35,11–44,98) $p_{CC/AA} = 0,038$	104,15 (64,66–119,00) $p_1 = 0,025; p_{CC/AA} = 0,017$	
			116,00 (37,02–122,00) $p_1 = 0,044; p_{CC/AA} = 0,013$	92,31 (87,34–93,43) $p_1 = 0,031; p_{CC/AA} = 0,010$

Примечание.  $p_{CC/CA}$ ,  $p_{CA/AA}$ ,  $p_{CC/AA}$  – уровень статистической значимости различий показателей в зависимости от аллельного варианта локуса *C-592A* гена *IL10*; здесь и в табл. 2: \* – в общей группе больных туберкулезом легких, ИТБ – инфильтративный туберкулез легких, ДТБ – диссеминированный туберкулез легких,  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с параметрами у здоровых доноров.

Т а б л и ц а 2

Секретция цитокина		Группа обследованных лиц		
		Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких	
			ИТБ	ДТБ
СС	Базальная	838,20 (623,32–929,81)	762,55 (591,84–950,61) $p_{CC/CT} = 0,037$	
			819,80 (610,37–986,71) $p_{CC/CT} = 0,043$	671,00 (566,28–850,41)
	При индукции BCG	1047,10 (907,87–1299,54)	875,16 (623,77–939,84)	
			939,80 (838,24–1466,90)	654,95 (580,08–799,24)
СТ	Базальная	934,20 (913,21–1000,00) $p_{CT/TT} = 0,022$	1197,13 (1013,11–1452,09) $p_1 = 0,040; p_{CT/TT} = 0,011$	
			1181,95 (1053,62–1305,98) $p_1 = 0,035$	1452,00 (907,28–2558,61) $p_1 = 0,046$
	При индукции BCG	745,0 (586,07–1164,53)	1105,50 (734,51–1298,47) $p_{CT/TT} = 0,027$	
			1254,70 (847,53–1471,65) $p_{CT/TT} = 0,008$	806,96 (734,56–1298,43) $p_{CT/TT} = 0,004$
ТТ	Базальная	1487,20 (1327,22–1726,01) $p_{CC/TT} = 0,017$	2276,10 (1913,20–2872,18) $p_1 = 0,014; p_{CC/TT} = 0,001$	
			1360,00 (1290,10–1645,54) $p_{CC/TT} = 0,028$	2466,20 (2044,49–3178,72) $p_1 = 0,019; p_2 = 0,042$ $p_{CC/TT} = 0,011$
	При индукции BCG	1087,80 (1009,22–1198,80)	3051,40 (2423,37–3325,20) $p_1 = 0,001; p_{CC/TT} = 0,009$	
			3020,20 (2120,22–3345,47) $p_1 = 0,001; p_{CC/TT} = 0,001$	3225,20 (3120,28–3325,40) $p_1 = 0,001; p_{CC/TT} = 0,006$

Пр и м е ч а н и е.  $p_{CC/CT}$ ,  $p_{CT/TT}$ ,  $p_{CC/TT}$  – уровень статистической значимости различий показателей в зависимости от аллельного варианта локуса C-509T гена TGFβ;  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с параметрами у больных ИТБ.

## Обсуждение

Молекулярно-генетические методы и технологии стали неотъемлемой частью иммунологии XXI в, что ознаменовало ее переход на качественно новый уровень. Важным направлением иммуногенетических исследований стало изучение функционального полиморфизма генов цитокинов, связанного с заменами единичных нуклеотидов (single nucleotide polymorphism – SNP). Важно, что любые мутации в генах цитокинов приводят к серьезным нарушениям иммунитета, при этом у человека подобные мутации встречаются достаточно редко, что свидетельствует о важнейшей роли цитокинов в осуществлении защитных реакций [5, 6].

Факт клинической манифестации ТБ связан с функциональной несостоятельностью воспалительного и цитотоксического клеточного иммунного ответа на фоне активации факторов супрессии и Th2-зависимого гуморального иммунитета с преобладанием характерного цитокинового профиля [3]. Известно, что продукция цитокинов является индуцибельной, активация транскрипции гена зависит от связывания транскрип-

ционных факторов с регуляторной областью гена. В связи с этим нами была проанализирована продукция IL-10 и TGF-β *in vitro* в зависимости от аллельного полиморфизма C-592A гена IL10 и C-509T гена TGFβ у больных ТБ.

Основная биологическая роль исследуемых в работе цитокинов – супрессия иммунного ответа, т.е. негативная регуляция функций иммунной системы. Установлено, что IL-10 подавляет продукцию не только провоспалительных цитокинов, но и цитокинов, ассоциированных с Т-лимфоцитами-хелперами типов Th2 и Th17. Кроме того, показана важная роль IL-10 в ограничении развития реакций врожденного и приобретенного противоинфекционного иммунитета, способных вызывать повреждение тканей организма [7].

В ходе проведенных исследований у пациентов с ТБ (как в общей группе, так и подгруппах больных с ИТБ и ДТБ) было зарегистрировано повышение уровня базальной и BCG-индуцированной продукции IL-10 *in vitro* вне зависимости от генотипа локуса C-592A гена IL10. Однако было установлено, что продукция IL-10 у больных ТБ с генотипом СС поли-

морфного сайта гена *IL10* является минимальной (табл. 1). В целом распределение генотипов данного полиморфизма по их соотношению с результатами анализа продукции *IL-10 in vitro* можно представить следующим образом (в порядке возрастания цитокинопродукции):  $CC \rightarrow CA \rightarrow AA$ . Таким образом, у пациентов с ТБ аллель *A* (*C-592A*) гена *IL10* ассоциирован с наиболее выраженным увеличением продукции *IL-10 in vitro*.

TGF- $\beta$  является важнейшим медиатором, участвующим в реализации иммуносупрессорной функции регуляторных Т-лимфоцитов, а также модулирующим их функциональную активность за счет повышения экспрессии гена *FOXP3* [8]. TGF- $\beta$  обладает регенерирующим и противовоспалительным действием, оказывает антипролиферативное действие на CD4-позитивные Т-лимфоциты посредством угнетения синтеза *IL-2* и усиления продукции ингибиторов клеточного цикла. К числу эффектов TGF- $\beta$  относятся подавление синтеза цитокинов макрофагами, дендритными клетками и Т-лимфоцитами, что препятствует индукции и реализации Th1-зависимых реакций, поддерживая иммунологическую толерантность к антигенам [9]. Гиперпродукция TGF- $\beta$  при ТБ, по всей видимости, является неблагоприятным фактором, поскольку известно, что она способствует хронизации воспалительного процесса, формированию фиброза и деструктивных изменений в легких [10].

Анализ продукции TGF- $\beta$  *in vitro* у пациентов с ТБ в зависимости от аллельного варианта полиморфизма *C-509T* гена *TGFB* показал, что у гомозигот по аллелю *T* она существенно выше, чем у здоровых добровольцев, а также у больных ТБ с генотипами *CT* и *CC* гена *TGFB*. При этом у больных ТБ (вне зависимости от клинической формы заболевания) с генотипом *CC* гена *TGFB* базальная и VCG-индуцированная продукция TGF- $\beta$  *in vitro* соответствовала норме и была при этом значительно ниже, чем в случае носительства генотипа, гетерозиготного и гомозиготного по аллелю *T* (табл. 2). В то же время у пациентов с ТБ (в общем по группе, а также у больных ИТБ и ДТБ) с генотипом *CT* гена *TGFB* отмечалось увеличение (сравнительно с нормой) только базальной продукции цитокина, а в случае носительства генотипа *TT* (в общем по группе и при ДТБ) – и базальной, и VCG-индуцированной продукции TGF- $\beta$  *in vitro* (табл. 2), в то время как у больных ИТБ с генотипом *TT* возрастала лишь VCG-индуцированная продукция медиатора (табл. 2). Это дает основание утверждать, что генетически детерминированная гиперпродукция TGF- $\beta$ , свидетельствующая о гиперфункции иммуносупрессорных Treg-клеток, определяется носительством аллеля *T*

полиморфизма *C-509T* гена *TGFB* и является более характерной для диссеминированной формы ТБ.

В целом установленные изменения продукции *IL-10* и TGF- $\beta$  *in vitro* в зависимости от аллельного полиморфизма их генов свидетельствуют о важной роли супрессорных цитокинов в иммунопатогенезе туберкулезной инфекции. В работах ряда авторов показано, что у больных ТБ в биоптатах воспалительной гранулемы обнаруживается значительное количество TGF- $\beta$  [10, 11]. Возможно, что локальный синтез цитокина инфицированными макрофагами бронхоальвеолярного тракта также является одним из механизмов снижения эффективности противотуберкулезной защиты уже на уровне мукозального иммунитета.

Функциональный полиморфизм генов, определяющий высокий уровень продукции иммуносупрессорных цитокинов, является существенным фактором предрасположенности к развитию ТБ и последующей хронизации инфекционного процесса. В то же время пока не установлено, какие мутации и каких именно генов имеют решающее значение. По-видимому, большую роль играют не столько отдельные аллели генов, сколько их сочетания. В связи с этим перспективным направлением иммуногенетических исследований цитокинов является изучение роли сочетаний аллелей их генов в подверженности к заражению и длительной персистенции возбудителя инфекции в организме.

## Заключение

Гиперпродукция цитокинов с ингибирующей активностью у больных ТБ является генетически детерминированной и способствует формированию супрессорного режима иммунорегуляции при туберкулезной инфекции. Выраженное увеличение продукции *IL-10* и TGF- $\beta$  *in vitro* у больных ТБ ассоциировано с носительством аллеля *A* и генотипа *AA* (*C-592A*) гена *IL10* и аллеля *T* и генотипа *TT* (*C-509T*) гена *TGFB*.

*Исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 16.512.11.2046 от 14.02.2011 г.), РФФИ (Проект № 11-04-98057-р) и Совета по грантам Президента РФ (НШ-4184.2014.7).*

## Литература

1. Gonzalo X., Ambroggi M., Cordova E., Brown T., Poggi S., Drobniewski F. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis, Buenos Aires, Argentina // Emerging Infectious Diseases. 2011. V. 17, № 3. P. 528–531. doi: 10.3201/eid1703.100394.
2. Churina E.G., Urazova O.I., Novitskiy V.V. The role of *Foxp3*-expressing regulatory T-cells and T-helpers in immunopathogenesis of multi-drug resistant pulmonary tuber-

- culosis // Hindawi Publishing Corporation, "Tuberculosis Research and Treatment". 2012. Vol. 2012. Article 931291. 9 p. doi: 10.1155/2012/931291.
3. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Есимова И.Е. Вторичная иммунологическая недостаточность у больных туберкулезом легких. Иммунодиагностика и иммунотерапия. Томск: Печатная мануфактура, 2013. 84 с.
  4. Кофиади И.А., Ребриков Д.В. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфическая ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой // Генетика. 2006. Т. 42, № 1. С. 22–32.
  5. Абрамов Д.Д., Кофиади И.А., Уткин К.В., Трофимов Д.Ю., Хаитов Р.М., Алексеев А.П. Полиморфизм одиночных нуклеотидов в генах цитокинов и их рецепторов: биологический эффект и методы идентификации // Иммунология. 2011. № 5. С. 275–280.
  6. Kalsotra A., Cooper T.A. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing // Nat. Rev. Genet. 2011. V. 12, № 10. P. 715–729. doi: 10.1038/nrg3052.
  7. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1: физиология, патология, клиника. М.: Фолиант, 2011. 480 с.
  8. Sakaguchi S., Vignali D.A., Rudensky A.Y., Neeb R.E., Waldmann H. The plasticity and stability of regulatory T cells // Nat. Rev. Immunol. 2013. V. 13, № 6. P. 461–467. doi: 10.1038/nri3464. Epub. 2013. May 17.
  9. Sheppard D. Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis // Proc. Am. Thorac. Soc. 2006. V. 3, № 5. P. 413–417.
  10. Fichtner-Feigl S., Strober W., Kawakami K., Puri R.K., Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis // Nat. Med. 2006. V. 12, № 1. P. 99–106.
  11. Co D.O., Hogan L.H., Kim S.I., Sandor M. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship // Clin. Immunol. 2004. V. 113, № 2. P. 130–136.

Поступила в редакцию 05.08.2014 г.

Утверждена к печати 09.10.2014 г.

Чурина Елена Георгиевна – д-р мед. наук, доцент кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Уразова Ольга Ивановна (✉) – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Новицкий Вячеслав Викторович – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ, старший научный сотрудник лаборатории моделирования физических процессов в биологии и медицине физического факультета НИ ТГУ (г. Томск).

Филинук Ольга Владимировна – д-р мед. наук, доцент, зав. кафедрой фтизиатрии и пульмонологии (г. Томск).

✉ Уразова Ольга Ивановна, тел.: 8-903-913-1483; e-mail: urazova72@yandex.ru

## POLYMORPHISM OF GENES OF IMMUNOSUPPRESSIVE CYTOKINE IL-10 AND TGF-β AT TUBERCULOSIS INFECTION

Churina Ye.G.<sup>1</sup>, Urazova O.I.<sup>1</sup>, Novitsky V.V.<sup>1,2</sup>, Filinyuk O.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

### ABSTRACT

The aim of the work was the study of connection of allelic polymorphism of *IL10* and *TGFB* genes with changes in the basal and BCG-induced production of immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF-β by mononuclear leukocytes *in vitro* in patients with the first diagnosed pulmonary tuberculosis (TB), depending on the clinical form of the disease. The evaluation of the cytokines production was conducted by measuring its concentration in culture supernatants by ELISA. The allele-specific amplification of specific stretches of the genome was used for the study of polymorphic genes of cytokines. The DNA and supernatants of culture suspensions of blood mononuclear leucocytes in healthy volunteers and patients with TB were the material of the research. It was shown in the research conducted that the basal and BCG-induced over-production of IL-10 *in vitro* occurs in patients with TB, regardless of the genotype of the locus of *C-592A1L10* gene. In addition, genotype AA of polymorphism of *IL10* gene in patients with infiltrative and disseminated TB is associated with the maximum production of IL-10 *in vitro* and genotype CC – with the minimum production of this cytokine *in vitro*. Analysis of the production of TGF-β *in vitro* in patients with TB showed its increase only in case of carriage of allele T (*C-509T*) of

*TGFB* gene. In patients with disseminated TB and homosygotic genotype *TT* the increase in both basal and BCG-induced production of TGF- $\beta$  was determined, and in patients with infiltrative TB – only after induction of cells by BCG-antigen.

Thus, the over-production of cytokines with inhibiting activity in patients with TB is genetically determined and promotes the formation of suppressive mode of immune-regulation. The increase in the secretion of cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  *in vitro* in patients with TB are associated with carriage of allele *A* and genotype *AA* (*C-592A*) of *IL10* gene and allele *T* and genotype *TT* (*C-509T*) of *TGFB* gene.

**KEY WORDS:** gene polymorphism, cytokines, IL-10, TGF- $\beta$ , pulmonary tuberculosis, immune response, immune-suppression.

*Bulletin of Siberian Medicine*, 2014, vol. 13, no. 5, pp. 107–113

### References

1. Gonzalo X., Ambroggi M., Cordova E., Brown T., Poggi S., Drobniowski F. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis, Buenos Aires, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, vol. 17, no. 3, pp. 528–531. doi: 10.3201/eid1703.100394.
2. Churina Ye.G., Urazova O.I., Novitsky V.V. The role of *Foxp3*-expressing regulatory T-cells and T-helpers in immunopathogenesis of multi-drug resistant pulmonary tuberculosis. *Hindawi Publishing Corporation, "Tuberculosis Research and Treatment"*, 2012, vol. 2012, article 931291, 9 p. doi: 10.1155/2012/931291.
3. Churina Ye.G., Urazova O.I., Novitsky V.V., Esimova I.Ye. *Secondary immune deficiency in patients with pulmonary tuberculosis. Immunodiagnostic and immunotherapy*. Tomsk, Pechatnaya manufaktura Publ., 2013. 84 p. (in Russian).
4. Kofiadi I.A., Rebrikov D.V. The methods of single nucleotide polymorphisms detection: the allele-specific PCR and hybridization with the oligonucleotide sample. *Genetika – Genetics*, 2006, vol. 42, no. 1, pp. 22–32 (in Russian).
5. Abramov D.D., Kofiadi I.A., Utkin K.V., Trofimov D.Ju., Haitov R.M., Alekseev L.P. Single nucleotide polymorphism in genes of cytokines and their receptors: biological effect and methods of identification. *Immunologija – Immunology*, 2011, no. 5, pp. 275–280 (in Russian).
6. Kalsotra A., Cooper T.A. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nat. Rev. Genet.*, 2011, vol. 12, no. 10, pp. 715–729. doi: 10.1038/nrg3052.
7. Simbircev A.S. *Interleukin-1: physiology, pathology, clinic*. Moscow, Foliant Publ., 2011. 48 p. (in Russian).
8. Sakaguchi S., Vignali D.A., Rudensky A.Y., Niec R.E., Waldmann H. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, vol. 13, no. 6, pp. 461–467. doi: 10.1038/nri3464. Epub 2013 May 17.
9. Sheppard D. Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2006, vol. 3, no. 5, pp. 413–417.
10. Fichtner-Feigl S., Strober W., Kawakami K., Puri R.K., Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13 $\alpha$ 2 receptor is involved in induction of TGF- $\beta$ 1 production and fibrosis. *Nat. Med.*, 2006, vol. 12, no.1, pp. 99–106.
11. Co D.O., Hogan L.H., Kim S.I., Sandor M. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin. Immunol.*, 2004, vol. 113, no. 2., pp. 130–136.

Churina Yelena G., Siberian State Medical University, Russian Federation.

Urazova Olga I. (✉), Siberian State Medical University, Russian Federation.

Novitsky Vyacheslav V., Siberian State Medical University, National Research Tomsk State University, Russian Federation.

Filinyuk Olga V., Siberian State Medical University, Russian Federation.

✉ Urazova Olga I., Ph. +7-903-913-1483; e-mail: urazova72@yandex.ru