

КОМБИНАЦИИ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Беляева С.В., Сташкевич Д.С., Бурмистрова А.Л.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Резюме. Туберкулез – широко распространенное инфекционное заболевание, вызываемое *M. tuberculosis*, которое является одной из основных причин смертности в мире. Согласно многочисленным литературным данным, это генетически детерминированное заболевание, и полиморфизм генов является механизмом, который приводит к прогрессированию от инфицирования к клинической манифестации. Восприимчивость к инфекции коррелирует с различными генами в нескольких локусах, и каждый отдельный ген играет определенную уникальную роль. Известно, что анализ отдельных полиморфных вариантов генов не дает достаточно полного представления о механизмах формирования предрасположенности к мультифакторным патологиям, таким как туберкулез, так как в основе их развития лежат сложные межгенные и ген-средовые взаимодействия, которые необходимо учитывать при прогнозировании риска развития активных форм заболевания и его тяжести. Концепция функционирования цитокинов в качестве биомаркеров туберкулеза предполагает, что их продукция и взаимодействия играют важную роль в иммунопатогенезе заболевания, так как они формируют цитокиновую цепь с уникальными функциями, где удаление любого звена цепи приводит к разрыву всего механизма формирования иммуновоспалительного процесса. IL-6 вместе с TNF α и IL-1 β инициируют ранние провоспалительные реакции при туберкулезе, стимулируя местную и системную воспалительную реакцию с участием всех известных механизмов провоспалительного действия с дальнейшим переходом к активации приобретенного иммунитета. Ранее нами был проведен комплекс исследований по оценке ассоциации аллелей и генотипов генов данных цитокинов с предрасположенностью/устойчивостью к туберкулезу легких у русских Челябинской области, в ходе которого установлены особенности распределения аллелей и генотипов генов IL-1 β , TNF α , IL-6 при туберкулезе легких и различных его формах. Были использованы следующие методы: выделение образцов ДНК из цельной крови, проведение генотипирования исследуемых полиморфизмов генов с помощью полимеразно-цепной реакции и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. В настоящем исследовании был проведен анализ межгенных взаимодействий генов провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF α , IL-6 с использованием метода сокращения многофакторной размерности у больных туберкулезом легких. Программа формирует оптимальные модели комбинаций исследуемых генов и их взаимодействий при туберкулезе. В результате исследования была установлена трехлокусная модель IL-6 (-174)*C – IL-1 β (+3953)*T – IL-1 β (+3953)*C, которая характеризовалась 100% воспроизводимостью и точностью предсказания 72%. Среди анализируемых полиморфизмов наибольшим предсказательным потенциалом обладал полиморфизм IL-6 (-174)*C – 15,27%.

Ключевые слова: межгенные взаимодействия, провоспалительные цитокины, генетический полиморфизм, туберкулез легких, метод сокращения многофакторной размерности

Адрес для переписки:

Сташкевич Дарья Сергеевна
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный
университет»
454021, Россия, г. Челябинск, ул. Молдавская, 25, кв. 15.
Тел.: 8 (351) 799-71-54.
E-mail: stashkevich_dary@mail.ru

Address for correspondence:

Stashkevich Daria S.
Chelyabinsk State University
454021, Russian Federation, Chelyabinsk,
Moldavskaya str., 25, apt 15.
Phone: 7 (351) 799-71-54.
E-mail: stashkevich_dary@mail.ru

Образец цитирования:

С.В. Беляева, Д.С. Сташкевич, А.Л. Бурмистрова
«Комбинации генов провоспалительных цитокинов
и их взаимодействия у больных туберкулезом русских
Челябинской области» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 4. С. 811-815.
doi: 10.15789/1563-0625-COP-2007
© Беляева С.В. и соавт., 2020

For citation:

S.V. Belyaeva, D.S. Stashkevich, A.L. Burmistrova
“Combinations of proinflammatory cytokine genes and their
interactions in Russian tuberculosis patients in the Chelyabinsk
Region”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 811-815.
doi: 10.15789/1563-0625-COP-2007
DOI: 10.15789/1563-0625-COP-2007

COMBINATIONS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENES AND THEIR INTERACTIONS IN RUSSIAN TUBERCULOSIS PATIENTS IN THE CHELYABINSK REGION

Belyaeva S.V., Stashkevich D.S., Burmistrova A.L.

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Tuberculosis is a widespread infectious disease caused by *M. tuberculosis*, which is one of the leading causes of death in the world. According to numerous literature data, this is a genetically determined disease, and genetical polymorphism is a mechanism that leads to progression from infection to clinical manifestation. Susceptibility to infection correlates with different genes at several loci, and each individual gene plays a unique role. It is known, that the analysis of individual polymorphic variants of genes does not provide a sufficiently complete picture of the mechanisms of formation of a predisposition to multifactorial pathologies, such as tuberculosis, since their development is based on complex intergenic and gene-environmental interactions, which must be taken into account when predicting the risk of developing active forms of the disease and its severity. The concept of the functioning of cytokines as biomarkers of tuberculosis suggests that their products and interactions play an important role in the immunopathogenesis of the disease, because they form a cytokine chain with unique functions, where the removal of any link in the chain disrupts the entire mechanism of the immuno-inflammatory process. IL-6, together with TNF α and IL-1 β , initiate early pro-inflammatory reactions in tuberculosis, stimulating local and systemic inflammatory reactions under participation of all common pro-inflammatory mechanisms with further transition to activation of acquired immunity. Earlier, we carried out a set of studies to evaluate the association of alleles and genotypes of these cytokine genes with a predisposition/resistance to pulmonary tuberculosis in Russians of the Chelyabinsk region. These studies have resulted into assessment of certain distribution patterns of IL-1 β , TNF α , IL-6 alleles and their genotypes in pulmonary tuberculosis and its various clinical forms. The following methods were used: isolation of DNA samples from whole blood, genotyping of the studied gene polymorphisms using PCR and RFLP techniques. In this study, we analyzed the intergenic interactions of the genes for the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF α , IL-6 using the method of reducing multifactor dimension in patients with pulmonary tuberculosis. The program designs optimal models of combinations for the studied genes and their interactions in tuberculosis patients. As a result of this study, a three-locus model IL-6 (-174)*C – IL-1 β (+3953)*T – IL-1 β (+3953)*C was established, which was characterized by 100% reproducibility and prediction accuracy of 72%. Among the analyzed polymorphisms, the IL-6 (-174)*C polymorphism possessed the highest predictive potential with 15.27%.

Keywords: intergenic interactions, pro-inflammatory cytokines, genetic polymorphism, pulmonary tuberculosis, multifactorial dimension, reduction

Введение

Туберкулез – одна из самых актуальных проблем мирового здравоохранения. Треть населения мира заражена *M. tuberculosis*, однако только у 10% инфицированных людей в течение жизни развивается активная форма [3], что свидетельствует о наличии естественной устойчивости. В настоящее время нет эффективных лекарств, вакцин и диагностических тестов на туберкулез, до сих пор не выявлены биомаркеры, которые могли бы эффективно использоваться при данной патологии. Поэтому существует острая необходимость поиска подходящего биомаркера или группы маркеров, которые помогут прогнозировать потенциальный риск развития заболевания, а также характер и тяжесть течения туберкулеза.

Недавно была предложена концепция функционирования цитокинов в качестве биомаркеров туберкулеза, так как считается, что их продукция и взаимодействия имеют важное значение для иммунопатогенеза заболевания [5, 8]. Согласно Симбирцеву А.С., одной из ключевых сторон нарушения механизма формирования нормальных иммунологических реакций при развитии иммунопатогенеза мультифакторных патологий является выпадение одного из звеньев цитокиновых цепей, что приводит к нарушению их функциональной целостности [4]. Известно, что ранние провоспалительные реакции при туберкулезе инициируются IL-6 вместе с TNF α и IL-1 β [8], которые приводят к активации приобретенного иммунитета [4]. IL-6, в отличие от

TNF α и IL-1 β , не так важен для антимикобактериальных эффекторных механизмов. В то же время данный цитокин имеет решающее значение для контроля роста микобактерий и для формирования устойчивости к туберкулезу после инфицирования [7, 10].

В предыдущих исследованиях мы изучали ассоциации аллелей и генотипов генов основных провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α , IL-6) с чувствительностью к туберкулезу легких у русских Челябинской области и установили особенности распределения аллелей и генотипов данных генов при заболевании и различных его формах [1, 2]. Важно отметить, что оценка единичных генных полиморфизмов цитокинов, которые участвуют в воспалении при туберкулезе, без учета их взаимодействий с другими генотипами является недостаточной и может привести к неправильной интерпретации, поскольку их совместное действие может иметь различные эффекты. Необходимо комплексное исследование межгенных взаимодействий, что будет способствовать развитию новых взглядов на профилактические и терапевтические подходы при туберкулезе легких.

Цель – определение комбинаций генов провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α и IL-6), ассоциированных с туберкулезом легких.

Материалы и методы

Выборка больных с туберкулезом легких состояла из 65 человек русской популяции Челябинской области, пациентов ГБУЗ «Челябинский областной клинический противотуберкулезный диспансер».

Выделение геномной ДНК из крови выполняли на колонках согласно инструкции производителя Ахуген (США). Генотипирование SNPs в генах исследуемых цитокинов осуществляли следующим образом: методом ПЦР в гене IL-6 (-174)*G/C (реактивы ООО НПФ «Литех», Москва), методом ПДРФ в генах TNF α (-308)*G/A

и TNF α (-238)*G/A (реактивы ИХБиФМ СО РАН, г. Новосибирск) и IL-1 β (+3953)*C/T (реактивы «Синтол», Москва, и Fermentas, США). Для детекции использовали электрофоретический метод в 3% агарозном геле.

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили, используя анализ межгенных взаимодействий. Для этого был выбран метод сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR), предложенный Hahn L.W и соавт. [6].

Программа формирует лучшие модели, для каждой из которых рассчитываются следующие параметры: воспроизводимость и точность предсказания. Модель с наиболее высокой воспроизводимостью (9/10) и точностью предсказания (не менее 70%) выбирается как оптимальная. На основе модели строятся дендрограмма и схема Фрухтермана–Рэйнгольда, которые позволяют визуализировать изучаемые межгенные взаимодействия и оценить значимость отдельных маркеров заболевания.

Результаты и обсуждение

В нашей работе мы провели анализ межгенных взаимодействий генов цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-6 у больных туберкулезом легких методом MDR с построением дендрограммы и схемы Фрухтермана–Рэйнгольда. Характеристики полученных моделей представлены в таблице 1.

В результате исследования взаимодействия генов мы получили трехкомпонентную модель IL-6 (-174)*C – IL-1 β (+3953)*T – IL-1 β (+3953)*C, с воспроизводимостью 10/10 и точностью предсказания 72%. В состав данной модели входят аллель IL-6 (-174)*C, связанный с низким уровнем продукции цитокина, и аллели IL-1 β (+3953)* с разнонаправленными эффектами. Исходя из точности предсказания и воспроизводимости тестируемых моделей, для данного анализа оптимальным межгенным взаимодействием является двухкомпонентная модель IL-6 (-174)*C-IL-1 β (+3953)*T, которая характеризуется воспроизво-

ТАБЛИЦА 1. МОДЕЛИ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

TABLE 1. MODELS OF INTERGENIC INTERACTIONS IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS

Модель Model	Точность предсказания в тестовой выборке Testing balanced accuracy	Воспроизводимость тестируемой модели Cross-validation (CV) consistency
IL-6 (-174)*C	0,6115	9/10
IL-1 β (+3953)*T – IL-6 (-174)*C	0,7446	10/10
IL-1 β (+3953)*T – IL-1 β (+3953)*C – IL-6 (-174)*C	0,7219	10/10
IL-1 β (+3953)*T – TNF α (-238)*A – IL-1 β (+3953)*C – IL-6 (-174)*C	0,7219	7/10



Рисунок 1. Дендрограмма межгенных взаимодействий
Figure 1. Dendrogram of intergenic interactions

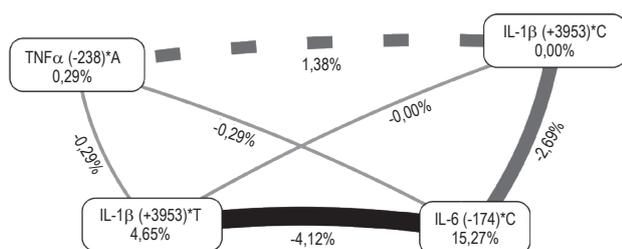


Рисунок 2. График энтропии (Фрухтерман–Рэйнгольд), отражающий межгенные взаимодействия в четырехлокусной модели

Примечание. На вершине многогранника представлена информационная ценность каждого маркера, на ребрах – информационная ценность взаимодействия пары генов. Черные линии – антагонизм, серые линии – синергизм, серые пунктирные линии – слабый синергический эффект, узкие серые линии – независимый эффект.

Figure 2. Graph of entropy (Fruchterman–Rheinbold), reflecting intergenic interactions in the four-locus model

Note. At the top of the polyhedron, the informational value of each marker is presented; on the edges, the informational value of the interaction of a pair of genes. Black lines - antagonism, gray lines - synergism, gray dashed lines - weak synergistic effect, narrow gray lines - independent effect.

димостью 10/10 и точностью предсказания 74%. Мы установили, что наибольшую значимость в данной модели имеет аллель IL-6 (-174)*C, отвечающий за сниженную продукцию цитокина.

Кроме текстового отображения результатов, программа позволяет представить результаты в виде графика дендрограммы, отображающие попарные взаимодействия локусов, что позволяет не только увидеть полиморфизмы, образующие модель, но и оценить вид и силу их взаимодействий (рис. 1).

Пары с более сильными взаимодействиями имеют меньшее расстояние из-за коротких линий, а со слабыми – большее. В данном рисунке черные линии характеризуют наиболее сильные антагонистические взаимодействия между генами IL-6 (-174)*C и IL-1β (+3953)*T, а серые прерывистые линии – слабые синергические взаи-

модействия между генами TNFα (-238)*A и IL-1β (+3953)*C.

С помощью схемы Фрухтермана–Рэйнгольда, предлагаемой программой, мы оценили информационную ценность отдельного маркера и комбинации генов (рис. 2).

По данной схеме мы установили, что межгенные взаимодействия локусов IL-1β (+3953)*T/IL-6 (-174)*C характеризуются долей фенотипической энтропии 4,12%, а эффект этих взаимодействий можно охарактеризовать как антагонистический. Кроме того, согласно схеме, между полиморфизмами IL-1β (+3953)*C и TNFα (-238)*A наблюдается умеренное, а между полиморфизмами IL-1β (+3953)*C и IL-6 (-174)*C сильное синергическое взаимодействие. Продукты данных генов отвечают за умеренный провоспалительный эффект.

Схема Фрухтермана–Рэйнгольда показала, что наибольшим предсказательным потенциалом из всех изучаемых генов обладает полиморфизм IL-6 (-174)*C – 15,27%.

Учитывая полученные данные, можно предположить, что большую роль при туберкулезе играют не столько отдельные аллели генов провоспалительных цитокинов, сколько их сочетания.

В результате исследования нами установлена трехлокусная модель IL-6 (-174)*C – IL-1β (+3953)*T – IL-1β (+3953)*C, в которой наибольшим предсказательным потенциалом обладает аллель IL-6 (-174)*C. Антагонистические взаимодействия IL-6 (-174)*C и IL-1β (+3953)*T, на долю которых приходится максимум фенотипической энтропии, могут быть объяснены тем, что, по литературным данным, IL-6 снижает экспрессию IL-1β и TNFα [10]. Вероятно, вклад SNP -174 IL-6 в развитие предрасположенности к туберкулезу среди исследуемых генов является максимальным. Тем не менее в исследованиях на европейских популяциях, в том числе и у русских Челябинской области, не было обнаружено достоверной ассоциации данного полиморфизма с туберкулезом легких [2, 9, 10, 11]. Учитывая его центральное положение в нашей модели, можно предположить регуляторную роль данного цитокина по отношению к другим провоспалительным цитокинам.

Исследования межгенных ассоциаций генов цитокинов, вовлеченных в иммунопатогенез туберкулеза, и составление на их основе генной цепи для конкретного больного помогут установить центральные гены и регуляторные [2, 5], что даст возможность предсказать тяжесть течения заболевания при активной форме, а также расширить знания об этиологии и патогенезе инфекции для оптимизации методов лечения и профилактики.

Список литературы / References

1. Беляева С.В., Сташкевич Д.С. Роль полиморфизмов гена TNFA в формировании различных вариантов воспалительного ответа при туберкулезе легких у русских Челябинской области // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 775-778. [Belyaeva S.V., Stashkevich D.S. The role of TNFA gene polymorphisms in the formation of different variants of the inflammatory response in pulmonary tuberculosis in russians of Chelyabinsk region. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 3, pp. 775-778. (In Russ.)]
2. Бурмистрова А.Л., Беляева С.В. Визуализация генетических комбинаций, участвующих в формировании воспалительного ответа при туберкулезе легких, методом канонического анализа соответствий // Вестник Челябинского государственного университета, 2015. № 21 (376). Биология. Вып. 3. С. 12-16. [Burmistrova A.L., Belyaeva S.V. Visualization of genetic combinations involved in the formation of the inflammatory response in tuberculosis of lungs, by canonical correspondence analysis. *Vestnik Chelyabinskogo gosudarstvennogo universiteta = Chelyabinsk State University Bulletin*, 2015, no. 21 (376), Biology, Iss. 3, pp. 12-16. (In Russ.)]
3. Васильева И.А., Белиловский Е.М., Борисов С.Е., Стерликов С.А. Глобальные отчеты Всемирной организации здравоохранения по туберкулезу: формирование и интерпретация // Туберкулез и болезни легких, 2017. Т. 95. С. 7-16. [Vasilyeva I.A., Belilovsky E.M., Borisov S.E., Sterlikov S.A. WHO Global tuberculosis reports: compilation and interpretation. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, Vol. 95, no. 5, pp. 7-16. (In Russ.)]
4. Симбирцев А.С. Иммунофармакологические аспекты системы цитокинов // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 84-95. [Simbirtsev A.S. Immunopharmacological aspects of the cytokine system. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 84-95. (In Russ.)]
5. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Ситникова А.В., Бармина С.Э. Функциональный полиморфизм генов провоспалительных цитокинов при туберкулезе легких // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С.149-156. [Churina E.G., Urazova O.I., Novitsky V.V., Sitnikova A.V., Barmina S.E. Functional polymorphism of the pro-inflammatory cytokine genes in pulmonary tuberculosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 149-156. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-149-156.
6. Hahn L.W., Ritchie M.D., Moore J.H. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics*, 2003, Vol. 19, pp. 376-382.
7. Martinez A.N., Mehra S., Kaushal D. Role of interleukin 6 in innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 207, Iss. 8, pp. 1253-1261.
8. Singh P.P., Goyal A. Interleukin-6: a potent biomarker of mycobacterial infection. *SpringerPlus*, 2013, Vol. 2, 686. doi: 10.1186/2193-1801-2-686.
9. Sun Y., Wang M. Association between IL-6 gene polymorphisms and susceptibility of tuberculosis: evidence based on a meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2017, Vol. 10, no. 3, pp. 4297-4304.
10. Wu S., Wang M.-G., Wang Yu., He J.-Q. Polymorphisms of cytokine genes and tuberculosis in two independent studies. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, 2507. doi: 10.1038/s41598-019-39249-4.
11. Wu S., Wang Y., Zhang M., Shrestha S.-S., Wang M.-G., He J.-Q. Genetic polymorphisms of IL1B, IL6, and TNF α in a Chinese Han population with pulmonary tuberculosis. *BioMed Res. Int.*, 2018, Vol. 11, pp. 1-10.

Авторы:

Беляева С.В. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Сташкевич Д.С. — к.б.н., декан биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Бурмистрова А.Л. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Belyaeva S.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Stashkevich D.S., PhD (Biology), Dean, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Burmistrova A.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 11.04.2020

Отправлена на доработку 30.04.2020

Принята к печати 06.05.2020

Received 11.04.2020

Revision received 30.04.2020

Accepted 06.05.2020