

На правах рукописи



ИМАНГУЛОВА МИЛЯУША МУСИНЕВНА

**АНАЛИЗ ГЕНОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ТУБЕРКУЛЕЗУ
ЛЕГКИХ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН**

03.00.15 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Уфа – 2005

**Работа выполнена в Институте биохимии и генетики Уфимского
научного центра Российской академии наук**

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Хуснутдинова Эльза Камилевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Спицын Виктор Алексеевич

доктор медицинских наук, профессор
Викторова Татьяна Викторовна

Ведущая организация: Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова
Российской академии наук, Москва

Защита диссертации состоится 17 ноября 2005 г. в 12 часов на заседании
Регионального диссертационного совета КМ 002.133.01 при Институте
биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г
Уфа, просп. Октября, 71

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Уфимского
научного центра РАН.

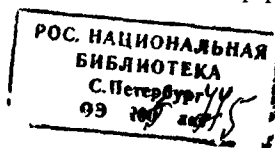
Автореферат разослан 15 октября 2005 г.

Ученый секретарь
Регионального диссертационного совета, к.б.н.

Бикбулатова С.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Туберкулез – это инфекционное заболевание, характеризующееся сложной, полиморфной клинической картиной и поражением различных органов и тканей. Данное заболевание представляет собой серьезную медико-социальную проблему, поскольку поражает лиц молодого, трудоспособного возраста, приводит к ранней инвалидизации, а также развитию угрожающих жизни осложнений. Ежегодно в мире регистрируется 8-9 миллионов новых случаев заражения туберкулезом легких (ТЛ). По уровню основных эпидемиологических показателей Россия входит в число 18 стран мира, которые составляют 80% от мирового уровня заболеваемости ТЛ (Чучалин А. Г., 1998). В 2003 г. заболеваемость ТЛ в России составила 83,2 человека на 100 000 населения, а смертность – 21,8:100 000, что в 2,5 раза выше, чем в 1990 г. Эпидемиологическая ситуация в Республике Башкортостан (РБ) в целом отражает общероссийскую обстановку, хотя основные эпидемиологические показатели ниже среднефедеративного уровня: заболеваемость в 2003 г. составляла 49,8:100 000, смертность - 13,1:100 000 населения. Рост заболеваемости, в первую очередь, вызван ухудшением социально-экономического уровня жизни значительной части населения, качества медицинского обслуживания, а также миграцией, появлением лиц без определенного места жительства и большого количества амнистированных. ТЛ – это многофакторное заболевание, которое развивается как результат сложного взаимодействия между *Mycobacterium tuberculosis* (МБ), организмом человека и внешне средовыми факторами. На сегодняшний день накоплен обширный фактический материал в области иммунологии заболевания, установлена главенствующая роль в сопротивляемости инфекции Т-клеточного иммунитета (Орте I.M., 1987; Блум Б. Р. и соавт., 2002). С появлением лекарственно-устойчивого ТЛ интенсивно исследуется геном МБ с целью выяснения причин устойчивости и разработки ДНК-вакцин (Степаншин Ю.Г. и соавт., 1999; Медников Б.Л., 2005). Имеются данные о влиянии факторов внешней среды на развитие ТЛ (неблагоприятные экологические и социальные условия, экзогенные и эндогенные интоксикации, наличие сопутствующих заболеваний и др.) (Stead W.W et. al., 1990; Ryan F, 1993; Блум Б. Р. и соавт., 2002). Многочисленные семейные и близнецовые исследования указывают на наличие генетической предрасположенности к ТЛ (Kallmann F.J. and Reisner D., 1943; Comstock G.W., 1978; Чуканова В. П. и соавт., 1981; Хоменко А.Г. и соавт., 1990). Однако молекулярно-генетические основы формирования



заболевания пока изучены недостаточно и на сегодняшний день исследования наследственных основ подверженности ТЛ направлены на поиск конкретных генов, формирующих структуру наследственной предрасположенности к заболеванию. Одним из наиболее доступных подходов, применяемых в молекулярно-генетических исследованиях многофакторных заболеваний, является исследование ассоциаций заболевания с полиморфными вариантами генов-кандидатов, белковые продукты которых тем или иным образом могут участвовать в патогенезе болезни. Выявлена ассоциация ТЛ с генами главного комплекса гистосовместимости (HLA), генами цитокинов и их рецепторов (*IFNG*, *IFNGR1*, *TNFA*, *IL1*, *IL1RA*, *IL10*, *IL12*, *IL12R1*), геном индуцибельной синтазы окиси азота (*NOS2A*), геном *NRAMP1*, ответственным за восприимчивость к различным микобактериальным инфекциям, геном рецептора витамина D (*VDR*) и др. (Kallmann F.J. and Reisner D., 1943; Comstock G.W., 1978; Goodman A. H., and Motulsky, 1979; Хоменко А.Г. и соавт., 1990; Блум Б. Р. и соавт., 2002).

В рамках рассматриваемой проблемы идентификация генов, вовлеченных в развитие ТЛ, является важной медико-генетической задачей, решение которой будет способствовать формированию фундаментальных представлений о патогенезе этого тяжелого, социально-опасного заболевания, а также позволит разработать эффективные методы профилактики и диагностики ТЛ. Поскольку в РБ молекулярно-генетического исследования ТЛ до сих пор не проводилось, актуальным являлось исследование полиморфных вариантов наиболее значимых генов-кандидатов, ассоциированных с данным заболеванием.

Цель работы: Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов-кандидатов с туберкулезом легких в Республике Башкортостан.

Задачи исследования

Провести в группах больных туберкулезом легких и здоровых доноров, проживающих в Республике Башкортостан:

1. Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов цитокинов *TNFA* (-308G>A), *IL1B* (-511C>T, 3953C>T) и *IL1RA* (VNTR).
2. Исследование 1729+55del4 и D543N полиморфизмов гена *NRAMP1*, ассоциированного с естественной резистентностью макрофагов.
3. Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов гена рецептора витамина D - *VDR* (FokI, TaqI).

4. Исследование полиморфных локусов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков *CYP1A1* (*Ile462Val*), *CYP2E1* (*Ins₉₆*) и *GSTM1*, а также гена индуцибельной синтазы окиси азота *NOS2A* (*STR*).
5. Анализ ассоциаций исследованных полиморфных вариантов генов и возможных их сочетаний с риском развития туберкулеза легких с учетом этнической принадлежности анализируемых групп и клинической формы заболевания.

Научная новизна исследования

Впервые собрана коллекция ДНК больных ТЛ, проживающих в РБ. Проведен анализ ассоциаций полиморфных локусов генов цитокинов, генов *NRAMP1*, *VDR*, *NOS2A* и генов, кодирующих ферменты биотрансформации ксенобиотиков, с заболеванием. Впервые определена частота аллелей исследованных локусов у здоровых доноров русской, татарской и башкирской этнической принадлежности, проживающих на территории РБ. Установлены аллельные варианты генов *TNFA*, *IL1B*, *IL1RA*, *NRAMP1*, *VDR*, *CYP1A1* и *GSTM1*, а также комбинации генотипов исследованных ДНК-локусов, детерминирующие повышенный и пониженный риск развития ТЛ.

Научно-практическая значимость работы

Результаты работы вносят вклад в общее представление о генетических основах предрасположенности к ТЛ. Впервые получены статистические оценки частот аллелей и генотипов исследуемых ДНК-локусов у больных ТЛ. Впервые выявлены генетические маркеры предрасположенности к тяжелому деструктивному и хроническому течению заболевания. Данные диссертационной работы могут послужить основой для последующих исследований по определению генетических факторов риска развития ТЛ в РБ. Они также могут быть использованы при чтении спецкурсов на факультетах биологии, в медицинских ВУЗах, на курсах повышения квалификации медицинских работников.

Положения, выносимые на защиту

1. Ассоциация полиморфных вариантов генов цитокинов: фактора некроза опухолей α (*TNFA*), интерлейкина 1β (*IL1B*) и его рецепторного антагониста (*IL1RA*) с развитием туберкулеза легких в РБ.
2. Ассоциация гетерозиготных генотипов по *1729+55del4* и *D543N* полиморфизмам гена *NRAMP1* (Natural-Resistance-Associated-Macrophage Protein 1 gene) с туберкулезом легких у лиц русской этнической принадлежности.

3. Генетические маркеры повышенного риска и устойчивости к развитию туберкулеза легких по *FokI* полиморфизму гена рецептора витамина D (*VDR*) у лиц русской этнической принадлежности.
4. Ассоциация туберкулеза легких с полиморфными вариантами генов биотрансформации ксенобиотиков (*CYP1A1* и *GSTM1*).
5. Генотипы риска развития тяжелых деструктивных и хронических форм туберкулеза легких по полиморфным вариантам генов *IL1B*, *IL1RA*, *VDR*, *CYP1A1* и *GSTM1*.

Апробация работы

Материалы диссертационной работы были представлены на Всероссийской научно-практической конференции «Современные достижения клинической генетики» (Москва, 2003), Всероссийской конференции Вавиловского общества генетиков и селекционеров «Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития» (Москва, 2004), международной конференции «Международный союз по борьбе с туберкулезом и легочными заболеваниями (IUATLD)» (Москва, 2004), VIII всероссийском научном форуме с международным участием имени В. И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2004), конференции Европейского общества генетики человека (Мюнхен, Германия, 2004), V съезде Российского общества медицинских генетиков (Уфа, 2005).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 240 страницах машинописного текста. Состоит из введения; обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 173 источника, из них 132 работы зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 32 рисунками, 74 таблицами и дополнена приложением (12 стр., 34 табл.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования. В работе использованы образцы ДНК 195 больных ТЛ, находящихся на стационарном лечении в противотуберкулезном диспансере г. Уфы. Выборку больных ТЛ составили неродственные между собой пациенты в возрасте от 17 до 78 лет ($40,65 \pm 2,22$). Диагноз был поставлен на основании данных клинического обследования, анализа микроскопии мазков мокроты (бактериоскопии), флюорографического исследования. Состав данной выборки по этнической принадлежности был следующим: русские – 91, татары – 62, башкиры – 17 и 25 пробандов, происходивших из межнациональных

браков. В зависимости от клинико-рентгенологических данных (согласно приказу №109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» от 21.03.03г.) больные были разделены на 3 группы: с малыми формами ТЛ (МТЛ), в которую входили больные инфильтративным ТЛ (61 человек), очаговым ТЛ (2 человека) и туберкулемой легких (9 человек); деструктивными формами (ДТЛ) - инфильтративным ТЛ в фазе распада и обсеменения (69 человек) и казеозной пневмонией (15 человек); хроническими формами (ХТЛ) - фиброзно-кавернозным (38 человек) и кавернозным ТЛ (1 человек).

Контрольная группа была сформирована из здоровых неродственных жителей РБ, не состоящих на учете в тубдиспансере, соответствующих выборке больных по возрасту, полу и этнической принадлежности (русские – 60 человек, татары – 59 человек, башкиры – 35 человек). Общая численность группы составила 151 человек.

Методы исследования. ДНК была выделена из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew et al., 1984). Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК (ПЦР) и ПДРФ-анализом с последующим электрофорезом в 7% полиакриламидном геле.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ: «Statistica for Windows 5.5» (StatSoft), RxC (Rows and Columns) (Roff, Bentzen, 1989), программного обеспечения MS Excel (Microsoft). При попарном сравнении частот генотипов и аллелей в группах больных и здоровых лиц использовался точный двухсторонний критерий Фишера Р (F_2), а также критерий χ^2 (Р) для таблиц сопряженности 2x2 с поправкой Йейтса на непрерывность (Леонов, 1998). Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя соотношения шансов Odds Ratio (OR) (Schlesselman J., 1982).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование полиморфизма генов цитокинов у больных туберкулезом легких и здоровых доноров

Учитывая важную роль цитокинов в формировании гранулемы и развитии воспалительной реакции, а также данные литературы об ассоциации генов *TNFA*, *IL1B* и *IL1RA* с риском развития ТЛ, нами изучено распределение частот аллелей и генотипов полиморфных ДНК-локусов генов: *TNFA* (-308G>A), *IL1B* (-511C>T, 3953C>T) и *IL1RA* (VNTR) у больных с ТЛ и здоровых доноров из РБ.

Анализ ассоциации полиморфного локуса -308G>A гена фактора некроза
опухолей – α (*TNFA*) с туберкулезом легких

Оценка распределения частот аллелей и генотипов -308G>A полиморфизма гена *TNFA* обнаружила статистически значимые различия между контрольной группой и больными ТЛ ($P<0,001$). У больных ТЛ наблюдалось достоверное увеличение частоты гетерозиготного генотипа *TNFA**G/*A по сравнению со здоровыми индивидами (35,9% против 18,8%) ($P<0,01$; OR=2,41; 95%CI 1,39-4,19) (рис. 1). Анализ распределения частот аллелей показал, что в группе больных ТЛ частота аллеля *TNFA**A в 2 раза выше контрольной частоты (20,5% против 10,9%) ($P<0,01$; OR=2,12; 95%CI 1,32-3,41).

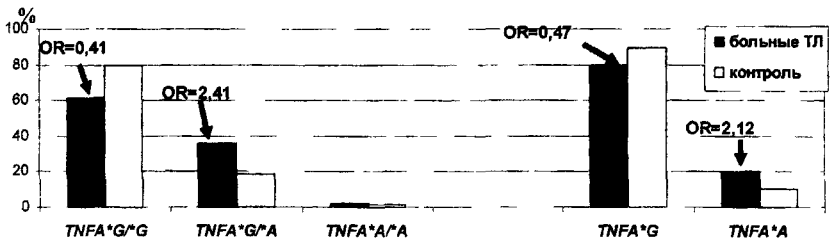


Рис. 1. Распределение частот аллелей и генотипов -308G>A полиморфизма гена *TNFA* у больных туберкулезом легких и здоровых доноров

При анализе распределения частот аллелей и генотипов у больных различными формами ТЛ выявлены достоверные отличия между всеми группами больных и здоровыми донорами ($P<0,05$). У больных МТЛ и ДТЛ частота генотипа *TNFA**G/*A (34,7% и 40,5%, соответственно) была существенно выше, чем в контрольной группе (18,8%) (OR=2,29; 95% CI 1,14-4,60 и OR=2,93; 95% CI 1,53-5,65, соответственно) (рис. 2). Повышение частоты генотипа *TNFA**G/*A у пациентов с ХТЛ (28,2%) оказалось статистически недостоверным ($P>0,05$).

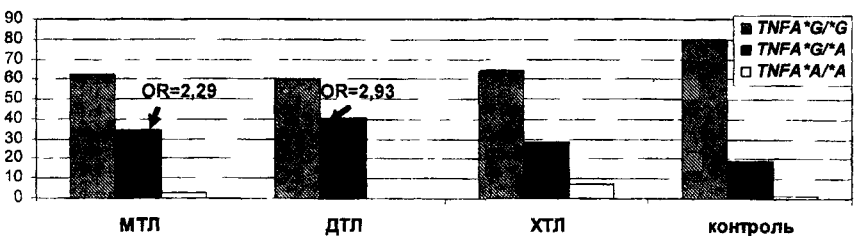


Рис. 2. Распределение частот генотипов -308G>A полиморфизма гена *TNFA* у больных различными формами туберкулеза легких и здоровых доноров

Полученные нами результаты анализа $-308G>A$ полиморфизма гена *TNFA* у больных ТЛ и здоровых доноров РБ показали, что генетическими маркерами повышенного риска развития ТЛ являются аллель *TNFA*А* и генотип *TNFA*G/*А*.

Анализ ассоциации полиморфных локусов $-511C>T$ и $3953C>T$ гена интерлейкина 1 β (*IL1B*) с туберкулезом легких

При сравнении выборки больных ТЛ с контрольной группой в целом, а также при разделении групп согласно их этнической принадлежности статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов $-511C>T$ полиморфизма гена *IL1B* не обнаружено ($P>0,05$). Оценка распределения частот генотипов у больных с различными формами ТЛ и в контрольной группе выявила достоверные отличия между здоровыми индивидами и больными ХТЛ ($P<0,05$). Частота генотипа *IL1B*С/*Т* у больных ХТЛ была в 1,5 раза выше (75,7%) (OR=3,25; 95%CI 1,34-8,07), а частота генотипа *IL1B*С/*С* в 2 раза ниже (16,2%) (OR=0,35; 95%CI 0,12-0,96), чем в контроле (48,9% и 35,6%, соответственно) (рис. 3).

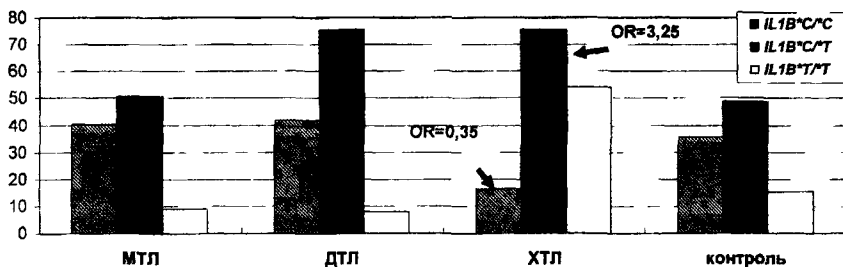


Рис. 3. Распределение частот генотипов полиморфного локуса $-511C>T$ гена *IL1B* у больных различными формами туберкулеза легких и здоровых доноров

Анализ распределения частот аллелей и генотипов $3953C>T$ полиморфизма гена *IL1B* между объединенными выборками больных ТЛ и здоровых доноров, а также при разделении их по этнической принадлежности и в соответствии с клинической формой ТЛ не выявил ассоциаций с риском развития ТЛ в РБ.

Оценка распределения частот комбинаций генотипов по полиморфным вариантам $-511C>T$ и $3953C>T$ гена *IL1B* выявила значимые отличия между больными ТЛ и контрольной группой ($P<0,0001$). Установлено достоверное повышение частоты комбинации *C/C-C/T* в группе больных ТЛ (27,2%) по сравнению с контролем (14,3%) (OR=2,24; 95%CI 1,2-4,2; $P<0,01$) (рис. 4). Напротив, комбинации генотипов *C/T-C/C* и *T/T-C/C* чаще наблюдаются в

группе здоровых индивидов (33,8% и 12%), чем у больных (15% и 2,8%, соответственно) (OR=0,35; 95%CI 0,19-0,62 и OR=0,21; 95%CI 0,07-0,63, соответственно).

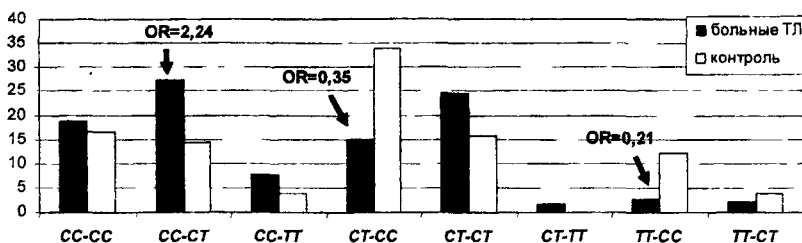


Рис. 4. Распределение частот комбинаций генотипов по -511C>T и 3953C>T полиморфизмам гена *IL1B* у больных туберкулезом легких и здоровых доноров

Анализ ассоциаций VNTR полиморфизма гена антагониста рецептора интерлейкина 1β (*IL1RA*) с туберкулезом легких

Анализ распределения частот аллелей и генотипов VNTR полиморфизма гена *IL1RA* между больными ТЛ и контрольной группой в целом достоверных отличий не обнаружил ($P>0,05$). При разделении исследуемых выборок согласно их этнической принадлежности и попарном сравнении частот аллелей и генотипов были выявлены статистически значимые отличия у больных ТЛ русской этнической принадлежности от соответствующей им контрольной группы ($P<0,01$). Частота генотипа *IL1RA**I*/I у больных ТЛ была в 1,5 раза выше (73,3%) (OR=3,60; 95%CI 1,7-7,6), а частота генотипа *IL1RA**I*/II, наоборот, существенно ниже (22,2%) (OR=0,33; 95%CI 0,15-0,70), чем в контрольной группе русских (43,3% и 46,7%, соответственно) (рис. 5).

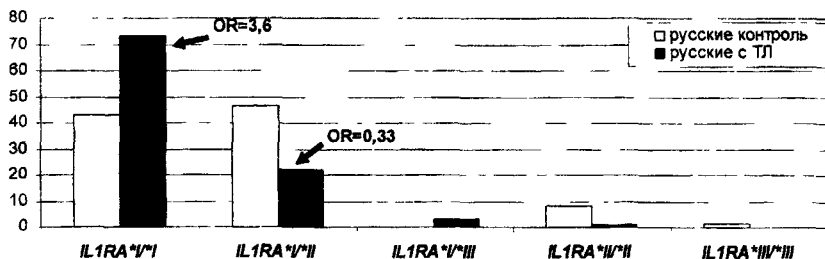


Рис. 5. Распределение частот генотипов VNTR полиморфизма гена *IL1RA* у больных туберкулезом легких и здоровых доноров русской этнической принадлежности

При сравнении распределения частот генотипов *VNTR* полиморфизма гена *IL1RA* не выявлено значимых отличий у больных различными формами ТЛ с контрольной группой ($P>0,05$), однако у больных ДТЛ и ХТЛ отмечено статистически достоверное увеличение частоты генотипа *IL1RA**I*/I (75,9% и 82,1%, соответственно) по сравнению с контролем (61,1%). Риск развития ДТЛ составил 2,0 (95%CI 1,1-3,8), а ХТЛ - 2,9 (95%CI 1,1-7,8) (рис.6).

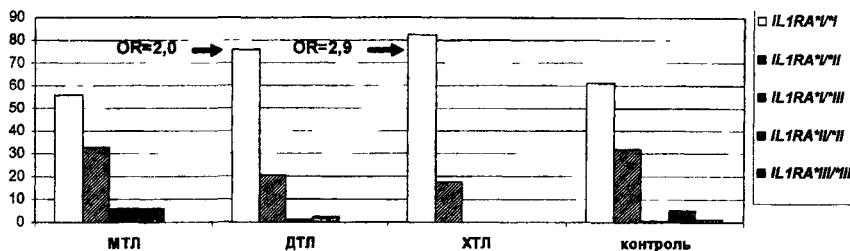


Рис. 6. Распределение частот генотипов *VNTR* полиморфизма гена *IL1RA* у больных различными формами туберкулеза легких и здоровых доноров

Анализ комбинаций генотипов полиморфных локусов генов *IL1B* и *IL1RA* с туберкулезом легких

Поскольку белковые продукты генов *IL1RA* и *IL1B* являются естественными антагонистами и конкурируют за связывание с одними клеточными рецепторами, проведен анализ сочетаний генотипов полиморфных локусов генов *IL1RA* (*VNTR*) и *IL1B* ($-511C>T$ и $3953C>T$) с целью выявления возможных ассоциаций с ТЛ.

Сравнение распределения частот комбинаций генотипов ДНК-локусов - $511C>T$ гена *IL1B* и *VNTR* гена *IL1RA* в контрольной группе и выборке больных ТЛ обнаружило достоверные отличия между больными ТЛ русской этнической принадлежности и соответствующей им группой контроля ($P<0,0001$). Выявлено преобладание комбинации генотипов *C/T-I/I* у русских, больных ТЛ, по сравнению со здоровыми донорами (39,1% против 11,7%) ($OR=4,86$; 95%CI 1,85-13,25). Напротив, сочетание гетерозиготных генотипов по исследуемым полиморфизмам (*C/T-II/II*) чаще представлено в контрольной группе (36,7% и 12,6%) ($OR=0,25$; 95%CI 0,10-0,61).

Оценка распределения частот генотипов у больных различными формами ТЛ и здоровых доноров позволила выявить комбинацию генотипов *C/T-I/I*, которая является маркером повышенного риска развития деструктивных ($OR=1,99$; 95%CI 1,03-3,84) и хронических ($OR=5,64$; 95%CI 2,42-13,27) форм ТЛ (рис.7).

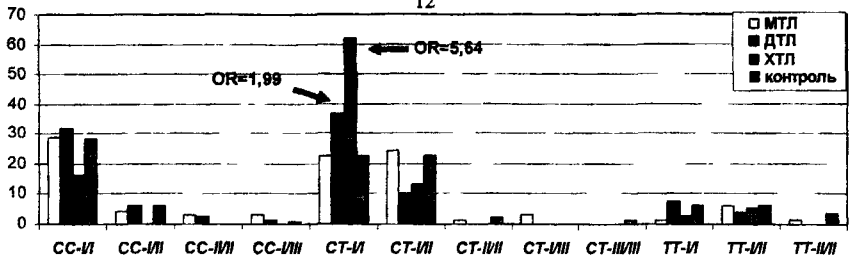


Рис. 7. Распределение частот комбинаций генотипов полиморфных локусов - *511C>T* гена *IL1B* и *VNTR* гена *IL1RA* в группах больных с различными формами туберкулеза легких и здоровых доноров

Сравнение распределения частот комбинаций генотипов по полиморфизмам *3953C>T* гена *IL1B* и *VNTR* гена *IL1RA* показало, что сочетание генотипов *C/T-I/I* ассоциировано с развитием ТЛ ($OR=1,74$; 95%CI 1,0-3,0) и является маркером повышенного риска формирования ДТЛ ($OR=1,98$; 95%CI 1,0-3,8) (рис. 8).

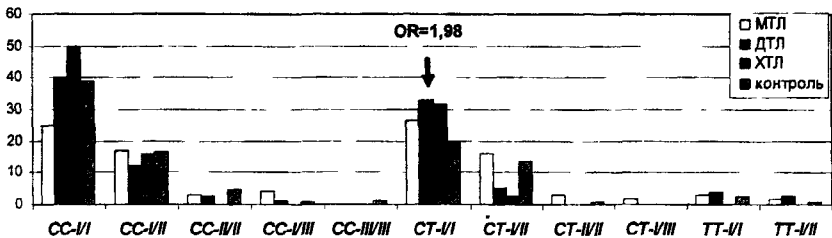


Рис. 8. Распределение частот комбинаций генотипов полиморфных локусов *3953C>T* гена *IL1B* и *VNTR* гена *IL1RA* у больных различными формами туберкулеза легких и здоровых доноров

Анализ комбинаций генотипов одновременно по всем трем исследуемым полиморфным локусам генов *IL1RA* (*VNTR*) и *IL1B* (*-511C>T*, *3953C>T*) обнаружил статистически значимые различия между больными ТЛ и здоровыми донорами ($P<0,05$). Сочетание генотипов *I/I-C/T-C/T* существенно преобладало у больных ТЛ (18,44%) по сравнению с контролем (3,82%) ($OR=5,7$; 95%CI 2,04-17,15). Установлены достоверные различия в распределении частот комбинаций генотипов *VNTR*-(*-511C>T*)-*3953C>T* у больных ДТЛ ($P<0,01$) и ХТЛ ($P<0,01$) от контрольной группы. Комбинация генотипов *I/I-C/T-C/T* достоверно чаще наблюдалась у больных с ДТЛ (21,8%) и ХТЛ (24,3%) по сравнению со здоровыми донорами (3,82%). Относительный

риск развития ДТЛ у лиц, имеющих данное сочетание генотипов, составил 7,02 (95%CI 2,3-22,9; $P<0,001$), хронического течения заболевания - 8,1 (95%CI 2,2-30,5; $P<0,001$). Обнаружено снижение частоты комбинации гетерозиготных генотипов *I/II-C/T-C/T* в группе больных ХТЛ (2,6%) по сравнению с контрольной выборкой (11,5%) ($OR=0,20$; 95%CI 0,03-0,97; $P<0,05$) (рис. 9).

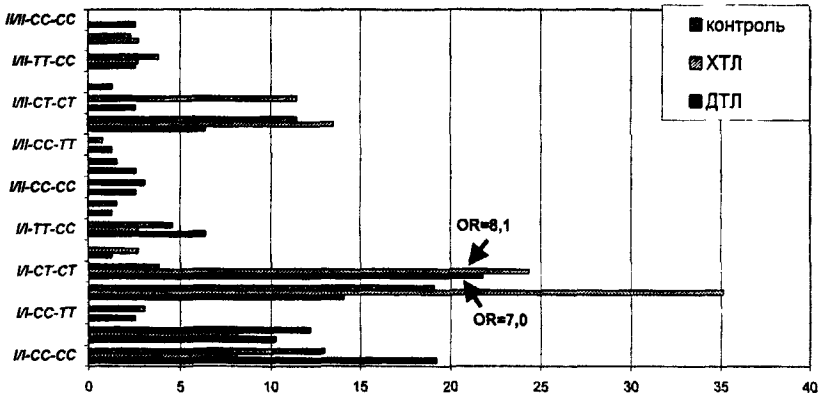


Рис. 9. Распределение частот комбинаций генотипов по *VNTR* – локусу гена *IL1RA* и полиморфизмам *-511C>T* и *3953C>T* гена *IL1B* у больных различными формами туберкулеза легких и здоровых доноров

Таким образом, в результате проведенного исследования полиморфных ДНК-локусов генов цитокинов *IL1B* и *IL1RA* показано, что различные сочетания генотипов полиморфных вариантов этих генов могут оказывать влияние на течение и исход ТЛ. Поскольку, согласно данным литературы, аллельные варианты *-511T* и *3953T* полиморфизмов *-511C>T* и *3953C>T* гена *IL1B* характеризуются повышенной продукцией $IL1\beta$, полученные нами результаты позволяют предположить, что постоянная выработка достаточно высоких концентраций провоспалительного цитокина $IL1\beta$ приводит к выраженной воспалительной реакции. Скорее всего, сочетание в организме высокой продукции $IL1\beta$ с относительно низкой концентрацией его рецепторного антагониста (при наличии аллеля *IL1RA**) способствует неблагоприятному течению туберкулезной инфекции.

Таким образом, результаты нашего исследования указывают на немаловажную роль цитокинов в сопротивляемости организма ТЛ, что в целом является еще одним подтверждением важной роли иммунной системы в борьбе с этим тяжелым, социально-опасным заболеванием.

2. Анализ ассоциаций полиморфных локусов 1729+55del4 и D543N гена *NRAMP1* с туберкулезом легких

При анализе распределения частот аллелей и генотипов 1729+55del4 полиморфизма гена *NRAMP1* выявлены статистически значимые различия между объединенными выборками больных ТЛ и здоровых доноров ($P < 0,01$ и $P < 0,05$, соответственно). У больных ТЛ отмечено достоверное увеличение частоты аллеля *NRAMP1**del (8,3%) и генотипа *NRAMP1**TGTG/*del (12,4%) по сравнению с контролем (3,1% и 4,8%, соответственно) ($OR = 2,9$; 95%CI 1,3-6,6; $P < 0,01$ и $OR = 2,8$; 95%CI 1,1-7,5; $P < 0,05$, соответственно) (рис. 10).

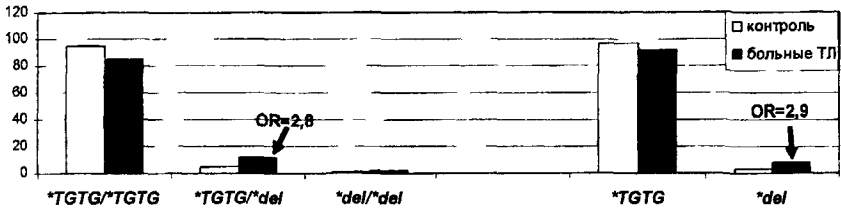


Рис. 10. Распределение частот аллелей и генотипов 1729+55del4 полиморфизма гена *NRAMP1* у больных туберкулезом легких и в контрольной группе

Анализ распределения частот аллелей и генотипов данного полиморфного локуса между больными различными формами ТЛ и контролем показал, что у больных МТЛ аллель *NRAMP1**del (11,1%) и генотип *NRAMP1**TGTG/*del (19,4%) определялись достоверно чаще, чем в группе здоровых доноров (3,1% и 4,8%). Относительный риск развития МТЛ у лиц, имеющих генотип *NRAMP1**TGTG/*del, составил 4,83 (95%CI 1,7-14,03; $P < 0,01$). Напротив, генотип *NRAMP1**TGTG/*TGTG является маркером пониженного риска развития МТЛ (79,2%) и ДТЛ (85,4%) ($OR = 0,22$; 95%CI 0,08-0,59; $P < 0,01$ и $OR = 0,34$; 95%CI 0,12-0,93; $P < 0,05$) (рис 11).

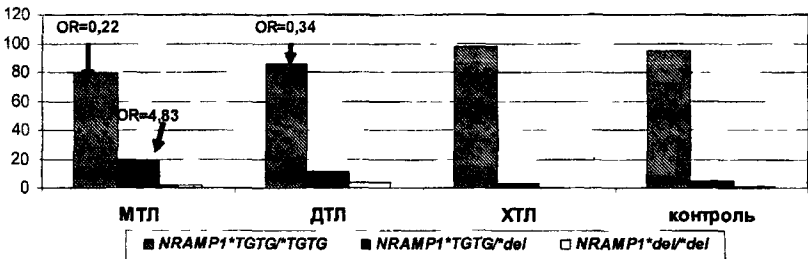


Рис. 11. Распределение частот генотипов полиморфного локуса 1729+55del4 гена *NRAMP1* у больных различными формами туберкулеза легких и в контроле

Оценка распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса *D543N* гена *NRAMP1* в объединенных выборках здоровых доноров и больных ТЛ, а также при разделении их по этнической принадлежности не обнаружила достоверных отличий между сравниваемыми группами ($P>0,05$). При анализе распределения частот аллелей и генотипов данного полиморфного локуса у больных различными формами ТЛ продемонстрировано статистически значимое различие между больными МТЛ и контрольной группой (рис. 12). Установлено достоверное повышение частоты аллеля *NRAMP1**A (6,3%) у больных МТЛ по сравнению со здоровыми индивидами (1,7%) ($P<0,05$; $OR=3,93$; 95%CI 1,18-13,77). Кроме того, у этой группы пациентов реже встречался генотипа *NRAMP1**G/*G (88,9%) по сравнению с контролем (96,7%) ($P<0,05$; $OR=0,28$, 95%CI 0,08-0,98).

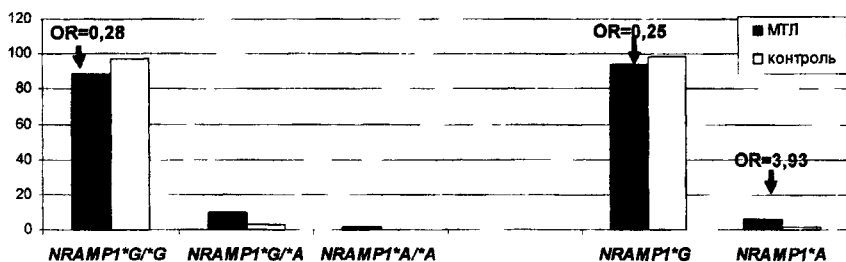


Рис. 12. Распределение частот генотипов полиморфного локуса *D543N* гена *NRAMP1* у больных малыми формами туберкулеза легких и здоровых доноров

Сравнение распределения частот комбинаций генотипов по *1729+55del4* и *D543N* полиморфизмам гена *NRAMP1* между больными ТЛ и контрольной группой в целом достоверных отличий не выявило ($P>0,05$), однако у больных ТЛ наблюдалось снижение частоты комбинации *TGTG/TGTG-G/G* (82,8%) по сравнению со здоровыми донорами (93,8%) ($P<0,01$; $OR=0,32$; 95%CI 0,14-0,72).

При разделении анализируемых групп согласно их этнической принадлежности обнаружены отличия в распределении частот комбинаций генотипов между больными ТЛ и здоровыми донорами русской этнической принадлежности ($P<0,05$). Комбинация генотипов *TGTG/TGTG-G/G* значительно реже встречалась у больных ТЛ (80,2%) по сравнению с контрольной группой (98,3%) ($P<0,01$; $OR=0,07$; 95%CI 0,004-0,52).

Анализ распределения частот комбинаций генотипов *1729+55del4* и *D543N* полиморфизмов гена *NRAMP1* у больных различными формами ТЛ позволил

выявить комбинации генотипов *TGTG/del-G/G* (12,5%) ($P<0,05$; $OR=4,03$; 95%CI 1,2-14,5) и *TGTG/del-G/A* (6,94%) ($P<0,05$; $OR=10,82$; 95%CI 1,2-253,9), которые выступают маркерами повышенного риска развития МТЛ (3,42% и 0,68% в контроле, соответственно). Напротив, сочетание генотипов *TGTG/TGTG-G/G* является маркером пониженного риска формирования МТЛ (76,4% у больных против 93,26% в контроле) ($P<0,001$; $OR=0,21$; 95%CI 0,08-0,54) (рис. 13).

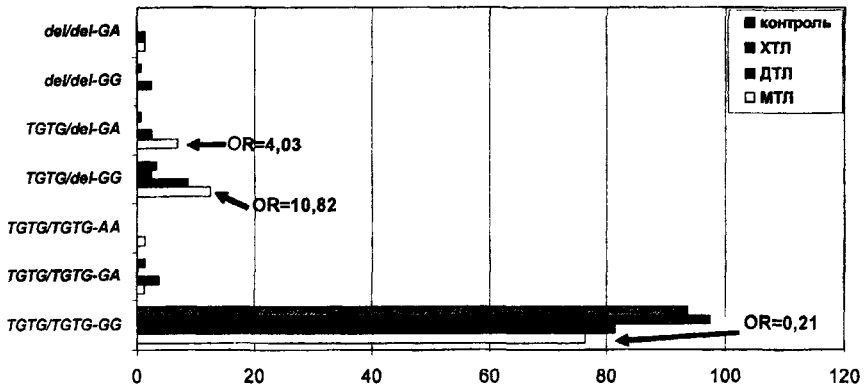


Рис. 13. Распределение частот комбинаций генотипов по *1729+55del4* и *D543N* полиморфизмам гена *NRAMP1* у больных различными формами туберкулеза легких и здоровых доноров

Таким образом, гетерозиготные генотипы *NRAMP1*GTG/*del* (*1729+55del4*) и *NRAMP1*G/*A* (*D543N*) гена *NRAMP1*, а также сочетания генотипов *TGTG/del-G/A* и *TGTG/del-G/G* по анализируемым полиморфным локусам ассоциированы с развитием ТЛ в РБ. Учитывая функциональную значимость полиморфизмов *1729+55del4* и *D543N* гена *NRAMP1*, основная функция которого заключается в транспорте двухвалентных катионов металлов из фагосомы, можно предположить, что у носителей аллелей *NRAMP1*del* и/или *NRAMP1*A*, может быть нарушен процесс выведения катионов металлов. Возможно, что в макрофагах индивидов, имеющих «дефектный» белок-транспортер *NRAMP1*, нарушается процесс элиминации катионов металлов из фагосом, что благоприятно сказывается на росте МБ и отрицательно влияет на течение ТЛ.

Анализ ассоциаций *FokI* и *TaqI* полиморфизмов гена *VDR* с туберкулезом легких

Анализ распределения частот генотипов *FokI* полиморфизма гена *VDR* обнаружил достоверные отличия между больными ТЛ и здоровыми индивидами русской этнической принадлежности ($P < 0,05$). У русских пациентов с ТЛ частота генотипа *VDR*F/*f* была почти в 1,5 раза выше (71,1%) ($OR = 2,15$; 95%CI 1,0-4,5; $P < 0,05$), а частота генотипа *VDR*F/*F* в 2 раза ниже (18,9%) ($OR = 0,40$; 95%CI 0,18-0,90), чем в контрольной группе (53,3% и 36,7%, соответственно) (рис. 14). При сравнении распределения частот аллелей и генотипов *FokI* полиморфизма гена *VDR* у больных МТЛ, ДТЛ и ХТЛ с контрольной группой достоверных отличий не обнаружено ($P > 0,05$).

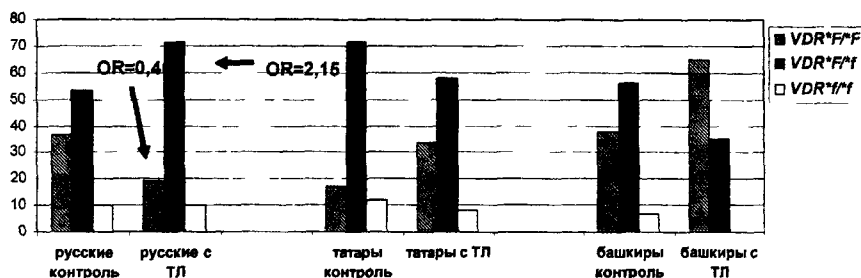


Рис. 14. Распределение частот генотипов *FokI* полиморфизма гена *VDR* у больных туберкулезом легких и в контрольной группе различной этнической принадлежности

Исследование распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса *TaqI* гена *VDR* у больных ТЛ и здоровых доноров, а также анализ сочетаний генотипов по *FokI* и *TaqI* полиморфизмам гена *VDR* не выявили ассоциаций с развитием ТЛ в РБ.

Учитывая данные о том, что витамин D стимулирует клеточно-опосредованный иммунитет, активирует макрофаги человека и обладает способностью угнетать рост и репликацию МБ, возникает необходимость проведения дальнейших молекулярно-генетических исследований ассоциаций полиморфных вариантов гена *VDR* с ТЛ.

4. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов биотрансформации ксенобиотиков (*CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*) с туберкулезом легких

Сравнение распределения частот аллелей и генотипов *Ile462Val* полиморфизма гена *CYP1A1* обнаружило достоверное увеличение частоты

генотипа *CYP1A1**I/*I у больных ТЛ (89,9%) по сравнению со здоровыми индивидами (81,3%) (OR=2,05; 95%CI 1,04-4,05; $P<0,05$). Частота гетерозигот *CYP1A1**I/*V у больных ТЛ оказалась в 2 раза ниже (9,6%), чем у здоровых индивидов (18,1%) (OR=0,48; 95%CI 0,24-0,96; $P<0,05$).

При разделении анализируемых выборок согласно их этнической принадлежности было выявлено, что у русских пациентов с ТЛ частота генотипа *CYP1A1**I/*I (96,6%) ($P=0,005$, OR=6,8, 95%CI 1,63-32,37) достоверно выше, а частота генотипа *CYP1A1**I/*V (3,4%) ($P<0,01$; OR=0,15, 95%CI 0,03-0,61) существенно ниже, чем в контрольной группе (80,7% и 19,3%, соответственно) (рис. 15).

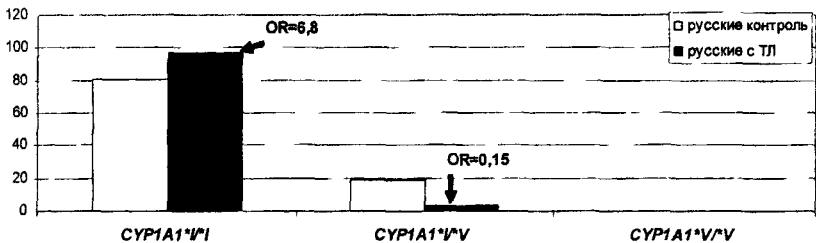


Рис. 15. Распределение частот генотипов *Ile462Val* полиморфизма гена *CYP1A1* у больных туберкулезом легких и здоровых доноров русской этнической принадлежности

Не обнаружено различий в распределении частот аллелей и генотипов инсерционного полиморфизма гена *CYP2E1* между больными ТЛ и здоровыми донорами, а также при разделении групп по этнической принадлежности и клиническим формам заболевания, что свидетельствует об отсутствии ассоциации данного ДНК-локуса с ТЛ в РБ.

Анализ распределения частот генотипов гена *GSTM1* в группе больных ТЛ и здоровых доноров показал, что у больных ТЛ частота генотипа *GSTM1**0/*0 (55,9%) более чем в 1,5 раза выше, чем в контроле (34%) ($P<0,001$; OR=2,46; 95%CI 1,54-3,93). При сравнении распределения частот генотипов гена *GSTM1* в анализируемых нами группах с учетом их этнической принадлежности обнаружено статистически значимое увеличение частоты генотипа *GSTM1**0/*0 (59,7%) (OR=4,24; 95%CI 1,83-9,98) и понижение частоты генотипа *GSTM1**+/*+ (40,3%) (OR=0,24; 95%CI 0,10-0,55) у больных ТЛ татарской этнической принадлежности по сравнению с соответствующей им группой здоровых доноров (25,8% и 74,1%, соответственно).

Частота генотипа *GSTM1**0/*0 у больных МТЛ (55,6%) и ДТЛ (60,7%) также была достоверно выше, а частота генотипа *GSTM1**+/*+ существенно ниже (44,4% и 39,3%), чем у здоровых доноров (34% и 66%, соответственно). Относительный риск для больных МТЛ и ДТЛ с нулевым генотипом составил 2,43 (95%CI 1,31-4,50; $P<0,01$) и 2,30 (95%CI 1,66-5,43; $P<0,001$), соответственно (рис. 16).

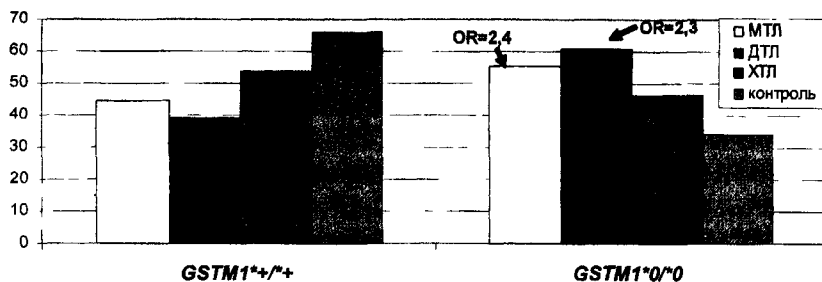


Рис. 16. Распределение частот генотипов гена *GSTM1* у больных различными формами туберкулеза легких

Обезвреживание экзо- и эндогенных веществ возможно только при хорошо скоординированной и совместной работе всех ферментов системы биотрансформации ксенобиотиков. Наличие нулевого генотипа гена *GSTM1*, ассоциированного с отсутствием белкового продукта, приводит к тому, что токсичные промежуточные метаболиты, образовавшиеся в результате окисления и гидролиза различных веществ ферментами первой фазы, накапливаются в клетке, но не конъюгируют с глутатионом, а, следовательно, не обезвреживаются, что может способствовать оксидативному стрессу в клетке, деструкции и включению апоптоза. Результаты данной работы продемонстрировали, что полиморфные варианты генов, кодирующих ферменты детоксикации, могут оказывать влияние на предрасположенность к ТЛ.

5. Исследование *STR*- полиморфизма гена индуцибельной синтазы окиси азота (*NOS2A*) у больных туберкулезом легких и здоровых доноров

Распределение частот аллелей и генотипов *STR*-полиморфизма гена *NOS2A* в объединенных выборках здоровых доноров и больных ТЛ, а также при разделении исследуемых групп согласно этнической принадлежности и клинической форме заболевания достоверных отличий не обнаружило ($P>0,05$), что свидетельствует об отсутствии ассоциации данного полиморфного локуса с ТЛ в РБ.

ВЫВОДЫ

1. Установлена ассоциация генотипа *TNFA**G/*A -308G>A полиморфизма гена фактора некроза опухолей α (*TNFA*) с развитием туберкулеза легких.
2. Показано, что генотип *IL1RA**I/*I VNTR полиморфизма гена рецепторного антагониста интерлейкина 1 β (*IL1RA*) ассоциирован с туберкулезом легких у лиц русской этнической принадлежности. Выявлены комбинации генотипов по -511C>T и 3953C>T полиморфизмам гена *IL1B* и VNTR полиморфизму гена *IL1RA*, ассоциированные с развитием туберкулеза легких: C/C-C/T (*IL1B**-511C>T - *IL1B**3953C>T), C/T-I/I (*IL1B**-511C>T - *IL1RA**VNTR), C/C-I/I (*IL1B**3953C>T - *IL1RA**VNTR), I/I-C/T-C/T и I/I-C/T-T/T (*IL1RA**VNTR - *IL1B**-511C>T - *IL1B**3953C>T). Сочетание гетерозиготных генотипов по всем трем исследованным локусам I/II-C/T-C/T является протективным фактором.
3. Обнаружена ассоциация генотипа *NRAMP1**TGTG/*del полиморфизма 1729+55del4 и генотипа *NRAMP1**G/*A полиморфизма D543N гена *NRAMP1* с туберкулезом легких у русских. Комбинации генотипов TGTG/del-G/A и TGTG/del-G/G (1729+55del4 - D543N) повышают риск развития малых форм туберкулеза легких, а сочетание генотипов TGTG/TGTG-G/G, напротив, снижает вероятность формирования заболевания.
4. Установлено, что маркером повышенного риска развития туберкулеза легких по *FokI* полиморфизму гена рецептора витамина D (*VDR*) у русских является генотип *VDR**F/*f.
5. Показана ассоциация туберкулеза легких с полиморфными вариантами гена цитохрома P450 *CYP1A1* (*CYP1A1**I/*I) и глутатионтрансферазы M1 *GSTM1* (*GSTM1**0/*0).
6. Выявлены генотипы повышенного риска развития тяжелых деструктивных форм туберкулеза легких: *TNFA**G/*A, *IL1RA**I/*I, а также генотип *IL1B**C/*T полиморфизма -511C>T гена *IL1B*, предрасполагающий к хроническому течению заболевания.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Имангулова М. М., Бикмаева А. Р., Хуснутдинова Э. К. Исследование полиморфизмов *D543N* и *3'-UTR* гена *NRAMP1* у больных инфильтративным туберкулезом легких в Башкортостане // Медицинская генетика. - 2003. - №8. - С.376-379.
2. Имангулова М. М., Бикмаева А. Р., Хуснутдинова Э. К. Анализ полиморфизма генов *GSTM1* и *CYP2E1* у больных туберкулезом легких в Республике Башкортостан // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Современные достижения клинической генетики», Москва, 2003. - Медицинская генетика. – 2003. - №10. - С.419.
3. Бикмаева А. Р., Имангулова М. М. Молекулярно-генетическое изучение туберкулеза легких в Башкортостане // Сборник тезисов «Международный союз по борьбе с туберкулезом и легочными заболеваниями (IUATLD), 3-й Конгресс Европейского региона». – Москва. - 2004. - С.384.
4. Имангулова М. М., Бикмаева А. Р., Хуснутдинова Э. К. Генетический анализ полиморфизмов *D543N* и *3'-UTR* гена *NRAMP1* у больных инфильтративным туберкулезом легких в Башкортостане // Сборник тезисов «Международный союз по борьбе с туберкулезом и легочными заболеваниями (IUATLD), 3-й Конгресс Европейского региона». – Москва. – 2004. - С.393.
5. Имангулова М. М., Бикмаева А. Р., Хуснутдинова Э. К. Полиморфизм гена *TNF-альфа* у больных тяжелой формой инфильтративного туберкулеза легких и у здоровых жителей Республики Башкортостан // Сборник тезисов «Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития». – Москва. – 2004. - С.68.
6. Имангулова М.М., Бикмаева А.Р., Хуснутдинова Э.К. Генетический анализ генов *IL-1β*, *IL-1RA* и *TNF-α* у больных инфильтративным туберкулезом легких в Башкортостане // Материалы VIII Всероссийского научного Форума с международным участием имени В.И. Иоффе Дни иммунологии в Санкт-Петербурге «Молекулярные основы иммунорегуляции, иммунодиагностики и иммунотерапии», Санкт-Петербург, 2004. - Медицинская иммунология. – 2004. - Т.6. - № 3-5. - С. 309.
7. M. Imangulova, A.Bikmaeva, E.Khusnutdinova. Genetic analysis of *D543N* and *3'-UTR* polymorphisms *NRAMP1* gene in patients with pulmonary

tuberculosis of republic Bashkortostan //Abstracts of European Human Genetics Conference. – Munich, 2004. - European Journal of Human Genetics. 2004. P. 280.

8. Имангулова М. М., Бикмаева А. Р., Хуснутдинова Э. К. Полиморфизм кластера гена *IL1* у больных туберкулезом легких // Цитокины и воспаление, 2005. - Т.4. - №1. – С.36-42.
9. Имангулова М. М., Бикмаева А. Р., Карунас А. С., Хуснутдинова Э. К. Молекулярно-генетический анализ туберкулеза легких в Башкортостане // Материалы V съезда Российского общества медицинских генетиков (Часть II), Уфа, 2005. - Медицинская генетика. - 2005. - №5. – С. 197.
10. Имангулова М. М., Карунас А. С., Хуснутдинова Э. К. Молекулярно-генетические аспекты туберкулеза легких // Медицинская генетика, 2005. - №11. – С.506-511.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

МБ	- микобактерия туберкулеза
ТЛ	- туберкулез легких
ПДРФ	- полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
CYP1A1	- цитохром P450 класса 1A
CYP2E1	- цитохром P450 класса 2E
GSTM1	- глутатион-S-трансфераза M1
IL1B	- интерлейкин 1β
IL1RA	- рецепторный антагонист интерлейкина 1 β
NOS2A	- индуцибельная синтаза окиси азота
NRAMP1	- Natural-Resistance-Associated-Macrophage Protein 1
OR (odds ratio)	- соотношение шансов
TNFA	- фактор некроза опухолей-α
VDR	- рецептор витамина D
95% CI (confidence interval)	- доверительный интервал

Имангулова Миляуша Мусиевна

**Анализ генов предрасположенности к туберкулезу легких в
Республике Башкортостан**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Лицензия № 0177 от 10.06.96 г.

Подписано в печать 14 10 2005 г.

Отпечатано на ризографе.

Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Усл.-печ. л. 1,5. Уч.-изд. л. 1,7

Тираж 100 экз. Заказ № 316.

**450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
ГОУ ВПО «Башгосмедуниверситет РосЗДРАВА»**

№ 19358

РНБ Русский фонд

2006-4

21289