

Д. О. Бутов

**ВПЛИВ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ IL-2, IL-4 ТА IL-10 НА СИНТЕЗ ЦИТОКІНІВ
ВЕНОЗНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ ПРИ РЕЦИДИВИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ЛЕГЕНЬ
НА ФОНІ СТАНДАРТНОЇ ХІМІОТЕРАПІЇ**

Харківський національний медичний університет

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ IL-2, IL-4 И IL-10
НА СИНТЕЗ ЦИТОКИНОВ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ
ПРИ РЕЦИДИВЕ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ НА ФОНЕ
СТАНДАРТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ**

Д. А. Бутов

Резюме

Целью исследования было изучение влияния полиморфизма генов IL-2, IL-4 и IL-10 на синтез цитокинов венозной крови у больных при рецидиве туберкулеза легких (РТБЛ) на фоне стандартной химиотерапии.

Материалы и методы. У 100 больных с РТБЛ и 30 относительно здоровых доноров изучались участки генов интерлейкина (ИЛ) -2 полиморфизма T-330G, ИЛ-4 — C-589T и ИЛ-10 — G-1082A методом полимеразой цепной реакции и уровень цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-10) в венозной крови измерялся иммуноферментным способом.

Результаты. До начала лечения у больных РТБЛ, наблюдалось достоверное повышение ИЛ-2, и снижение ИЛ-4, ИЛ-10, при сопоставлении с относительно здоровыми донорами. После проведенной двухмесячной стандартной терапии ИЛ-2 достоверно снизился, а содержание ИЛ-4 и ИЛ-10 достоверно повысилось. При исследовании приведенного полиморфизма генов было установлено, что среди больных РТБЛ чаще встречаются носители гетерозиготного генотипа, нежели гомозиготного варианта.

Выводы. На стадии воспаления у больных с рецидивом туберкулеза легких наблюдалось достоверное снижение ИЛ-4, ИЛ-10 и увеличение ИЛ-2 в сравнении с относительно здоровыми донорами. Низкий уровень секреции ИЛ-4, ИЛ-10 и высокие изменения ИЛ-2 у больных с рецидивом туберкулеза легких в большей степени ассоциированы с гетерозиготным полиморфизмом C-589T гена ИЛ-4, G-1082A — ИЛ-10 и T-330G — ИЛ-2. Стандартная двухмесячная химиотерапия больных с рецидивом туберкулеза легких приводит к уменьшению воспалительных процессов в виде достоверного снижения уровня ИЛ-2 и повышения ИЛ-4, ИЛ-10 при сравнении с исходными показателями. Для относительно здоровых доноров характерен гомозиготный вариант промоторного участка C-589T гена ИЛ-4, G-1082A — ИЛ-10 и T-330G — ИЛ-2, в отличие от больных с рецидивом туберкулеза легких, у которых наблюдался гетерозиготный вариант полиморфизма генов.

Ключевые слова: туберкулез, полиморфизм генов, иммунитет, цитокины, интерлейкин.

Укр. пульмонолог. журнал. 2015, № 1, С. 15–17.

Бутов Дмитро Олександрович
Харківський національний медичний університет
Асистент кафедри фтизіатрії та пульмонології, к. мед. н.
145, вул. Ньютона, 61096, м.Харків, Україна
Тел. +38057 357-11-08, dddimad@gmail.com

**INFLUENCE OF IL-2, IL-4 AND IL-10 GENE POLYMORPHISM
ON VENOUS BLOOD CYTOKINE SYNTHESIS IN PATIENTS
WITH RECURRENT PULMONARY TUBERCULOSIS
ON STANDARD CHEMOTHERAPY**

D. O. Butov

Abstract

Aim of this study was to evaluate the influence of polymorphisms in the genes IL-2, IL-4 and IL-10 on venous blood cytokine synthesis in patients with recurrent pulmonary tuberculosis (RPTB) on standard chemotherapy.

Materials and methods. In 100 patients with RPTB and 30 healthy donors we studied gene plots IL-2 polymorphism T-330G, IL-4 — C-589T and IL-10 — G-1082A using polymerase chain reaction. The level of cytokines (IL-2, IL-4 and IL-10) was measured in venous blood using enzyme immunoassay method.

Results. Prior to the treatment in RPTB patients there was a significant increase in IL-2, and decreased IL-4, IL-10, compared to apparently healthy donors. Following a two-month standard therapy IL-2 reduced significantly, while IL-4 and IL-10 significantly increased. Gene polymorphism study demonstrated that among RPTB patients heterozygous genotype carriers were found more frequently than homozygous carriers.

Conclusion. At the stage of inflammation in RPTB patients a significant decrease of IL-4, IL-10 and an increase in IL-2 as was observed. Low levels of IL-4, IL-10, and shift of IL-2 in patients with RPTB were associated with heterozygous polymorphism of C-589T IL-4, G-1082A IL-10 and T-330G IL-2 genes. Standard two-month chemotherapy led to reduction in IL-2 and enhancing IL-4, IL-10 when compared to baseline values due to recovery of inflammation. For apparently healthy donors it was typical the presence of homozygous promoter regions of the C-589T gene IL-4, G-1082A — IL-10 and T-330G — IL-2.

Key words: tuberculosis, gene polymorphism, immunity, cytokines, interleukin.

Ukr. Pulmonol. J. 2015; 1:15–17.

Dmytro O. Butov
Kharkiv National Medical University
Assistant Department of Phthiology and Pulmonology, PhD
145, Newton str., Kharkiv, 61096, Ukraine
Tel. +38057 357-11-08, dddimad@gmail.com

Туберкульоз є основною причиною захворюваності та смертності в усьому світі. За оцінками ВООЗ, одна третина населення світу інфікована мікобактеріями туберкульозу (МБТ), і приблизно 1 млрд. людей будуть додані до цього числа до 2020 року [1]. У принципі, звичайно зараження залежить від складної взаємодії господаря, МБТ та навколишніх факторів [2]. Одним із таких основних факторів при туберкульозі є особливості інфікованої штаму МБТ, характер імунної відповіді та генетичні особливості макроорганізму [3, 4].

Основну роль при специфічному запаленні відіграють альвеолярні макрофаги та Т-лімфоцити, які можуть диференціюватись на різні субпопуляції у залежності від якості та дози антигену, а також продукування ними різних цитокинів. Так, одними з основних цитокинів, котрі грають велику роль у визначенні субпопуляції Т-лімфоцитів, є інтерлейкін (ІЛ)-2, ІЛ-4 та ІЛ-10 [5, 6].

ІЛ-2 грає значну роль у імунопатогенезі туберкульозної інфекції, що зв'язано з його здатністю направляти диференціювання Т-хелперів (Th)0 у Th1 та регулювати інтенсивність гіперчутливості уповільненого типу. Контрзапальний ІЛ-4, ІЛ-10, є продуктом Т-лімфоцитів,

які виступають в якості антагоністу Th1-відповіді, сприяючи тим самим поляризації імунної реакції у направлененні гуморального типу реагування [6, 7, 8].

Крім цього, характер перебігу запальної відповіді, направленість протиінфекційного імунітету при туберкульозній інфекції у значній мірі визначається особливостями міжклітинної кооперації імуніцитів, як модульованими у відповідь на вплив МБТ, так і генетично детермінованими. Структурні особливості генів цитокінів можуть обумовлювати диференціацію імунної відповіді організму на бактеріальну агресію, визначаючи перебіг та наслідки хвороби. Гени цитокінів характеризуються більшою або меншою активністю, що можливо визначити за рівнем відповідних інтерлейкінів [9, 10]. У зв'язку з чим *ціллю цього дослідження* було вивчення зв'язку поліморфізму генів IL-2, IL-4 та IL-10 з рівнем цитокінів венозної крові у хворих при рецидиві туберкульозу легень (РТБЛ) на фоні стандартної хіміотерапії.

Матеріали і методи

Під нашим спостереженням було 100 хворих на РТБЛ (1 група) європеїдного походження, які проживають на території Харкова та Харківської області, у віці з 20 до 70 років, середній вік склав $(41,79 \pm 0,94)$ років. Хворі знаходилися на обстеженні та лікуванні у Обласному протитуберкульозному диспансері №1 м. Харків, Обласній туберкульозній лікарні №1 м. Харкова, Обласному протитуберкульозному диспансері №3 м. Зміїв та Обласному протитуберкульозному диспансері №4 м. Ізюм. У всіх хворих спостерігався інфільтративний туберкульоз легень з приблизно однаковою розповсюдженістю процесу у легенях. У контрольну групу були включені 30 відносно здорових донорів (2 група) з порівняною характеристикою за віком, з відсутністю легеневого анамнезу, патологічних змін у легенях при рентгенологічному обстеженні органів грудної клітини, хронічних інфекційних захворювань, алергічних реакцій та гострих респіраторних захворювань продовж 3 місяців, передуючих дослідженню.

Збір венозної крові для дослідження проводився зранку (8–9 годин ранку) натще, у перші дні госпіталізації хворих та через два місяці перебування у стаціонарі. Після забору крові у хворих, всі зразки центрифугували. Після чого зразки заморожували та одноразово використовували, після розморожування, для визначення рівня та поліморфних ділянок генів цитокінів.

Дослідження ділянок генів IL-2 поліморфізму T-330G, IL-4 — C-589T та IL-10 — G-1082A у геномі людини визначали методом полімеразної ланцюгової реакції з флюоресцентною схемою детекції продуктів у режимі реально часу з використанням набору реагентів "SNP-ЭКСПРЕСС" (НВФ «Литех», Росія), згідно інструкції виробника.

Рівень цитокінів (IL-2, IL-4 та IL-10) у сироватці венозної крові вимірювався імуноферментним способом з використанням набору для імуноферментного дослідження фірми «Вектор-Бест», (Росія).

Результати досліджень хворих обробили з використанням t-тесту Ст'юдента та імовірності відхилення відносно частоти від постійної ймовірності в незалежних випробуваннях [11, 12]. Оцінювали отримані данні з визначенням середнього значення (M) та його стандартного відхилення (m). Різниця вважалася достовірною при зна-

ченні t-критерію, яке відповідало 95 %, або ($p < 0,05$).

Результати дослідження

До початку лікування у хворих на РТБЛ, спостерігалося достовірне підвищення IL-2, та зниження IL-4, IL-10, при зіставленні з відносно здоровими донорами (Табл.).

Після проведеної двомісячної стандартної терапії стан наведених показників значно змінився. Так, стан IL-2 достовірно знизився у хворих на РТБЛ при зіставленні до лікування. Якщо ми спостерігали зниження вище зазначеного показника під час лікування хворих на РТБЛ, то вміст IL-4 і IL-10, навпаки, достовірно підвищувався у пацієнтів з РТБЛ. Крім того, при зіставленні показників після проведеної хіміотерапії упродовж двох місяців ми спостерігали, що показник IL-2 був ще достовірно високим, а IL-4 був достовірно нижчим, ніж у відносно здорових донорів, що свідчить про перевагу Th1-відповіді порівняно з Th2 на другому місяці антимікобактеріальної терапії. Що стосується IL-10, то тут не спостерігалось його відновлення від такого зростання до рівня норми групи відносно здорових донорів даного цитокіну на другому місяці проведеної терапії.

Таблиця

Концентрація цитокінів у сироватки крові хворих на рецидив туберкульозу легень та практично здорових донорів (M ± m), пг/л

Групи (під-групи)	Інтерлейкін-2		Інтерлейкін-4		Інтерлейкін-10	
	до лікування	через два місяці проведеної терапії	до лікування	через два місяці проведеної терапії	до лікування	через два місяці проведеної терапії
1 (n=100)	$39,44 \pm 0,71^*$	$29,59 \pm 0,55^{*#}$	$9,55 \pm 0,24^*$	$16,68 \pm 0,44^{*#}$	$40,04 \pm 0,74^*$	$48,53 \pm 0,87^-$
2 (n=30)	$21,60 \pm 0,80$		$29,99 \pm 1,27$		$50,25 \pm 1,26$	

Примітки: * — розбіжність достовірна ($p < 0,05$) при зіставленні з практично здоровими донорами (2група); # — розбіжність достовірна ($p < 0,05$) при зіставленні результатів дослідження до лікування і через два місяці у групі хворих.

Таким чином, у хворих на РТБЛ до лікування ми спостерігали достовірне підвищення прозапального (IL-2) та зниження протизапальних (IL-4 та IL-10) [7, 8] цитокінів при зіставленні з відносно здоровими донорами. При застосуванні стандартної антимікобактеріальної терапії через 2 місяці ми спостерігали достовірне зниження IL-2, а IL-4, IL-10 навпаки — підвищення.

На основі отриманих вище даних, стосовно змін цитокінів у хворих на РТБЛ, було досліджено поліморфізм генів IL-2, IL-4 та IL-10, які координують секрецію відповідних цитокінів. Було встановлено, що серед хворих на РТБЛ достовірно частіше зустрічаються носії гетерозиготного генотипу — 74 (74 %) — IL-2, 61 (61 %) — IL-4 і 64 (64 %) — IL-10 хворих ($p < 0,05$), найбільш рідкісним генотипом виявився гомозиготний варіант у 26 (26 %) — IL-2, 39 (39 %) — IL-4 і 36 (36 %) — IL10 хворих промоторної ділянки IL-2 гена T-330G, IL-4 — C-589T та IL10-G-1082A з яких 18 (18 %) — IL-2, 21 (21 %) — IL-4 та 23 (23 %) — IL-10 хворих мутаційна і 8 (8 %) — IL-2, 18 (18 %) — IL-4 та 13 (13 %) — IL-10 хворих нормальна гомозигота генотипу (рис.1–3). Серед здорових осіб достовірно переважала

нормальна гомозигота у 18 (60 %) — ІЛ-2, 17 (56,66 %) — ІЛ-4 та 17 (56,66 %) — ІЛ-10 хворих над гетерозиготним генотипом 5 (16,66 %) — ІЛ-2, 7 (23,34 %) — ІЛ-4 та 7 (23,34 %) — ІЛ-10 і мутаційним гомозиготним генотипом у 7 (23,34 %) — ІЛ-2, 6 (20 %) — ІЛ-4 та 6 (20 %) — ІЛ-10 хворих ($p < 0,05$) (рис. 1–3).



Рис. 1. Поліморфізм T-330G гену ІЛ-2 у хворих на туберкульоз.



Рис. 1. Поліморфізм C-589T гену ІЛ-4 у хворих на туберкульоз.

Таким чином, дослідження ділянок генів ІЛ-2 поліморфізму T-330G, ІЛ-4 - C-589T та ІЛ-10 - G-1082A показало, що завдяки гетерозиготному генотипу виникає достовірний вплив на зміни цитокинового профілю у хворих на

ЛІТЕРАТУРА

- Global tuberculosis report 2013 [Text] / World Health Organization. — Geneva, 2013. — 289 p.
- Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan [Text] / R. Bellamy, N. Beyers, K. McAdam [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2000. — № 97. — P. 8005–8009.
- Новицкий, В. В. Особенности цитокиновой продукции при лекарственно-устойчивом туберкулезе [Текст] / В. В. Новицкий, О. И. Уразова, О. В. Воронкова // Бюл. сиб. мед. — 2005. — Т. 4, прил. 1. — С. 94–95.
- Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes [Text] / D. Franchimont, J. Galon, M. Gadina [et al.] // J. Immunol. — 2000. — Vol. 164, №4. — P. 1768–1774.
- Особенности специфического иммунного ответа у отдельных больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких [Текст] / Т. Е. Кисина, И. Н. Фрейдлин, Б. Е. Кноринг [и др.] // Мед. Иммунол. — 2006. — Т. 8, №4. — С. 501–510.
- Randomized trial of adjunctive interleukin-2 in adults with pulmonary tuberculosis [Text] / J. L. Johnson, E. Ssekasanvu, A. Okwera [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2003. — Vol. 168, № 2. — P. 185–191.
- Цитокины в оценке иммунной системы у больных туберкулезом легких [Текст] / Е. Ф. Чернушенко, Л. П. Кадан, О. Р. Панасюкова [и др.] // Укр. пульмон. журн. — 2010. — № 2. — С. 39–43.
- Уровень цитокинов при инфицировании ex vivo макрофагов мыши микобактериями туберкулезного комплекса [Текст] / Л. Н. Черноусова, Т. Г. Смирнова, С. Н. Андреевская [и др.] // Туберкулез и болезни легких. — 2009. — № 8. — С. 46–48.
- Семейный анализ ассоциации полиморфизма генов SLC11A1, VDR, IL12B, IL1B, IL1RA с туберкулезом у тувинцев и русских [Текст] / А. А. Рудко, О. В. Колоколова, Э. А. Ондар [и др.] // Мед. генетика. — 2006. — Т. 5, № 10. — С. 13–15.
- Human cytokine gene nucleotide sequence alignments [Text] / J. L. Bidwell, N. A. Wood, H. R. Morse [et al.] // Eur. J. Immunogenet. — 1998. — Vol. 25, № 2–3. — P. 83–267.
- Лапач, С. Н. Статистические методы в медикобиологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. — К.: Морион, 2000. — 320 с.
- Теория вероятностей и математическая статистика: Учеб. пособие для вузов [Текст] / В. Е. Гмурман. — Москва: Высш. шк., 2003. — 479 с.



Рис. 1. Поліморфізм G-1082A гену ІЛ-10 у хворих на туберкульоз.

РТБЛ, ніж у практично здорових, що у свою чергу патологічно впливає на клітинний ланцюг імунної системи.

Висновки

1. На стадії запалення у хворих на рецидив туберкульозу легень спостерігалось достовірне зниження ІЛ-4, ІЛ-10 та збільшення ІЛ-2 у порівнянні з відносно здоровими донорами, що свідчить про переваження Th1-реакції.

2. Низький рівень секреції ІЛ-4, ІЛ-10 та високі зміни ІЛ-2 у хворих на рецидив туберкульозу легень достовірно асоційовані з гетерозиготним поліморфізмом C-589T гена ІЛ-4, G-1082A - ІЛ-10 та T-330G- ІЛ-2.

3. Стандартна двомісячна хіміотерапія хворих на рецидив туберкульозу легень зменшує та приводить до зменшення запальних процесів у вигляді достовірного зниження рівня ІЛ-2 та підвищення ІЛ-4, ІЛ-10 при порівнянні з показниками до лікування.

4. Для відносно здорових донорів достовірно характерний гомозиготний варіант промоторної ділянки C-589T гена ІЛ-4, G-1082A - ІЛ-10 та T-330G- ІЛ-2, ніж у хворих на рецидив туберкульозу легень, де спостерігався гетерозиготний варіант поліморфізму генів.

REFERENCES

- Global tuberculosis report 2013. World Health Organization. Geneva, 2013. 289 p.
- Bellamy R, Beyers N, McAdam K, et al. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000;97:8005–8009.
- Novitskiy VV, Urazova OI, Voronkova OV. Osobennosti tsitokinovoy produktsii pri lekarstvenno-ustoychivom tuberkuleze (Cytokine production in drug-resistant tuberculosis). Byul. sib. med. 2005;No 4(1):94–95.
- Franchimont D, Galon J, Gadina M, et al. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. J. Immunol. 2000;164(4):1768–1774.
- Kisina TYe, Freydlin IN, Knoring BYe, et al. Osobennosti spetsificheskogo immunnogo otveta u otdelnykh bolnykh fibrozno-kavernoznym tuberkulezom legkikh (Features specific immune response in some patients with fibrous-cavernous pulmonary tuberculosis). Med. Immunol. 2006;No 8(4):501–510.
- Johnson JL, Ssekasanvu E, Okwera A, et al. Randomized trial of adjunctive interleukin-2 in adults with pulmonary tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003;168(2):185–191.
- Chernushenko YeF, Kadan LP, Panasyukova OR, et al. Tsitokiny v otsenke immunnogo sistema u bolnykh tuberkulozom legkikh (Cytokines in the evaluation of the immune system in patients with pulmonary tuberculosis). Ukr. pulmonol. zhurn. 2010;No 2:39–43.
- Chernousova LN, Smirnova TG, Andreyevskaya SN, et al. Uroven tsitokinov pri infitsirovani ex vivo makrofagov myshi mikobakteriyami tuberkuleznogo kompleksa (Cytokine levels during infection ex vivo mouse macrophage Mycobacterium tuberculosis complex). Tuberkuloz i bolezni legkikh. 2009;No 8:46–48.
- Rudko AA, Kolokolova OV, Ondar EA, et al. Semeynyy analiz assotsiatsiiy polimorfizma genov SLC11A1, VDR, IL12B, IL1B, IL1RA s tuberkulozom u tuvintsev i russkikh (Family association analysis of polymorphisms of genes SLC11A1, VDR, IL12B, IL1B, IL1RA tuberculosis in tuvan and russian). Med. genetika. 2006;No 5(10):13–15.
- Bidwell JL, Wood NA, Morse HR, et al. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments. Eur. J. Immunogenet. 1998;25(2–3):83–267.
- Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskiye metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniyem Excel (Statistical methods using Excel in biomedical studies). K: Morion, 2000. 320 p.
- Gmurman VYe. Teoriya veroyatnostey i matematicheskaya statistika: uchebnoye posobiye dlya vuzov (Probability theory and mathematical statistics: a manual for high schools). Moscow: Vysshaya shkola, 2003. 479 p.