

Влияние однонуклеотидных полиморфизмов генов *TNF* и *LTA* на клинические параметры и маркеры воспаления у пациентов с муковисцидозом

Шмарина Г.В.^{1,2*}, Пухальская Д.А.¹, Букина А.М.¹, Авакян Л.В.³, Семькин С.Ю.³, Амелина Е.Л.⁴, Красовский С.А.⁴, Усачева М.Ю.⁴, Алешкин В.А.²

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

² ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

³ ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России, Москва

⁴ НИИ пульмонологии Минздравсоцразвития РФ, Москва

* e-mail: sakmarariver@yahoo.com

Цель настоящей работы состояла в исследовании влияния аллельного полиморфизма генов *TNF* (транзигция G — A в промоторной области в позиции -308) и *LTA* (транзигция A — G в первом интроне в положении +252) на клинические параметры и маркеры воспаления у пациентов с муковисцидозом. В исследовании принимали участие 120 детей и 80 взрослых пациентов. Все пациенты находились на активном диспансерном наблюдении и регулярно (каждые 3—6 месяцев) получали антибактериальную терапию. Пациенты с генотипом *LTA+252AA* (низкие продуценты лимфотоксина-альфа, $LT\alpha$) были существенно старше пациентов с генотипами *LTA+252GG/AG* (высокие продуценты $LT\alpha$). В то же время пациенты двух групп не отличались по показателям функции внешнего дыхания, по частоте развития сахарного диабета и по числу умерших пациентов. Однако в группе с генотипами *LTA+252GG/AG* пять из шести пациентов с диабетом были моложе 14 лет. Против, в группе с генотипом *LTA+252AA* был только один (из 10) юный пациент с диабетом ($p = 0,007$). Исследование маркеров воспаления выявило значимое повышение уровней провоспалительных цитокинов IL-17A и $IFN\gamma$ в плазме пациентов с генотипами *LTA+252GG/AG*. У больных этой группы также отмечали выраженную тенденцию к повышению уровня IL-8. Таким образом, высокая активность системного воспалительного процесса у носителей аллеля *LTA+252G* отчасти объясняет более тяжелое, требующее регулярной госпитализации, течение заболевания и раннее развитие диабета в группе высоких продуцентов $LT\alpha$. Для получения достоверных данных о риске развития диабета в детском возрасте у больных с генотипами *LTA+252GG/AG* необходимо увеличить количество обследованных пациентов.

Ключевые слова: муковисцидоз, полиморфизм генов *TNF*, цитокины, сахарный диабет при муковисцидозе, фактор некроза опухолей-альфа, лимфотоксин-альфа, интерлейкин-17, интерферон-гамма.

Данное исследование частично поддержано грантом РФФИ № 14-04-01662а.

TNF and *LTA* gene polymorphisms in cystic fibrosis patients: clinical parameters and inflammatory markers

Shmarina G.V.^{1,2*}, Pukhalskaya D.A.¹, Bukina A.M.¹, Avakian L.V.³, Semykin S.U.³, Amelina E.L.⁴, Krasovskiy S.A.⁴, Usacheva M.V.⁴, Alioshkin V.A.²

¹ Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow

² G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

³ Federal State Budgetary Institution «Russian Pediatric Clinical Hospital», Moscow

⁴ Federal Institution «Pulmonology Research Institute», Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow

* e-mail: sakmarariver@yahoo.com

The aim of the study was to investigate clinical parameters and inflammatory markers in cystic fibrosis patients (CF) with *TNF* and *LTA* gene polymorphisms: a G-to-A transition in position -308 in the promoter region of the *TNF* gene (*rs1800629*, *TNF-308*) and a A-to-G transition at position +252 in the first intron of the *LTA* gene (*rs909253*, *LTA+252*). The study included 120 children and 80 adults with CF. All patients had regularly (every 3—6 months) attended the Russian Pediatric Clinical Hospital or Pulmonology Research Institute for routine antibiotic therapy and clinical examination. The patients with genotype *LTA+252AA* (low production of lymphotoxin-alpha, $LT\alpha$) were significantly older than those with genotypes *LTA+252GG/AG* (high $LT\alpha$ production). In the same time the groups did not differ significantly in term their pulmonary function test results, frequency of diabetes development, or number of died patients. However, in group with genotypes *LTA+252GG/AG* 5 of 6 patients with diabetes were below 14 years old. In contrast, there was only patient below 14 among 10 patients with diabetes from group with genotype *LTA+252AA* ($p = 0,007$). Patients with *LTA+252GG/AG* genotypes had elevated plasma levels of IL-17A and $IFN\gamma$. The same trend was found in relation to plasma IL-8 concentrations. In conclusion, the children with genotypes *LTA+252GG/AG* had more often need of hospitalization and demonstrated increased rate of diabetes development. These phenomena may be partly explained by increased grade of systemic inflammation in the carriers of *LTA+252G* alleles. Further investigations with prolonged observation period and increased number of participants are needed to assess the risks of early diabetes development in CF patients with *LTA+252* polymorphisms.

Key words: cystic fibrosis, *TNF* gene polymorphisms, cytokines, cystic fibrosis associated diabetes, tumor necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha, interleukin-17, interferon-gamma.

Введение

Муковисцидоз (МВ) — одно из наиболее распространенных аутосомно-рецессивных наследственных заболеваний. Первичный генетический дефект при МВ связан с мутацией в гене *CFTR*, который кодирует белок клеточной мембраны, принимающий участие в образовании канала для ионов хлора. Нарушение электролитного транспорта между клетками и межклеточной жидкостью увеличивает всасывание натрия и воды клетками эпителия, в результате чего повышается вязкость клеточных секретов с последующим нарушением функции бронхолегочной системы, поджелудочной железы, кишечника и урогенитального тракта [1].

Клиницистам хорошо известен факт, что у носителей одной и той же мутации, даже если она находится в гомозиготном состоянии, заболевание может протекать по-разному. Из этого легко сделать вывод, что существуют другие, в том числе и генетические, механизмы, определяющие индивидуальные особенности течения МВ, изучение которых важно не только с точки зрения создания более полной картины патогенеза, но и для разработки новых подходов к терапии. Большой интерес в этом отношении представляет обширное семейство генов *TNF*, названное так по имени белка (фактор некроза опухолей; tumor necrosis factor), являющегося продуктом одного из генов, входящих в это семейство. Гены семейства *TNF* (*TNF*, *LTA* и *LTB*) расположены тандемом в области класса III главного комплекса гистосовместимости на коротком плече шестой хромосомы. У млекопитающих эта высококонсервативная область не претерпела изменений за последние 180 млн лет. Тандем *TNF* и *LTA* является еще более древним (не менее 450 млн лет) и обнаруживается у всех челюстных позвоночных, начиная с костистых рыб. По-видимому, такое кластерное расположение генов воспаления является ценным эволюционным приобретением. Гены семейства *TNF* представлены у человека в виде разных аллельных вариантов, и их различное сочетание может быть причиной высокой или низкой продукции факторов, регулирующих воспаление, состояние гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, метаболические процессы [2].

Гены *TNF* и *LTA* имеют общую транскрипционную ориентацию, а их продукты, соответственно фактор некроза опухолей альфа ($\text{TNF}\alpha$) и лимфотоксин альфа ($\text{LT}\alpha$), на 30% гомологичны, поэтому оба цитокина взаимодействуют с рецепторами фактора некроза опухоли первого и второго типов (TNFR1 и TNFR2) и могут оказывать сходные эффекты [3]. Так, $\text{TNF}\alpha$ и $\text{LT}\alpha$ впервые были описаны как биологически активные вещества, вызывающие гибель клеток фибросаркомы, при этом $\text{TNF}\alpha$ секретировался макрофагами, а источником $\text{LT}\alpha$ были лимфоциты [4]. Позднее было показано, что одна молекула $\text{LT}\alpha$ и две молекулы лимфотоксина β (продукт гена *LTB*) образуют мембраносвязанный гетеротример ($\text{LT}\alpha_1\beta_2$), который экспрессируется лимфоци-

тами и взаимодействует с рецептором $\text{LT}\beta\text{R}$ на миелоидных, паренхиматозных и стромальных клетках [5]. Таким образом, $\text{LT}\alpha_1\beta_2$ и $\text{LT}\beta\text{R}$ являются важным связующим звеном между иммунной системой и внутренними органами. Многочисленные исследования показали, что $\text{LT}\alpha$ играет ключевую роль в процессах развития и созревания вторичных лимфоидных органов, в формировании антибактериального и противовирусного иммунитета, а также в поддержании нормального состояния микрофлоры кишечника [5].

Наиболее изученным является однонуклеотидный полиморфизм гена *TNF* в позиции -308 (*TNF-308*). В этой части промоторной области гена *TNF* находится сайт связывания репрессирующего транскрипционного фактора AP-2. Транзиция G-A в позиции -308 снижает связывание репрессора AP-2, что в условиях отсутствия других репрессирующих транскрипционных факторов, существенно повышает экспрессию гена *TNF* [6]. Носители редкого аллеля *TNF-308A* характеризуются тяжелым течением инфекционных заболеваний, таких, как малярия, лейшманиоз, лепра, менингококковый энцефалит, а также повышенным риском развития атопий (бронхиальная астма, дерматит, вазомоторный ринит) [7–11].

Ген *LTA* расположен проксимальнее гена *TNF*, и однонуклеотидный полиморфизм внутри первого интрона в позиции +252 (*LTA+252*) влияет на экспрессию как $\text{LT}\alpha$, так и $\text{TNF}\alpha$. Носительство редкого аллеля *LTA+252G* коррелирует с повышенной экспрессией $\text{LT}\alpha$ на уровне мРНК и белка [12]. В то же время, наличие распространенного аллеля *LTA+252A* способствует повышенной продукции $\text{TNF}\alpha$, так как позиция +252 находится внутри специфического элемента, отвечающего на стимуляцию форболовыми эфирами и обладающего высоким сродством к транскрипционным факторам семейства AP-1, jun и c-fos [12].

Избыточная продукция провоспалительных цитокинов $\text{TNF}\alpha$ и $\text{LT}\alpha$ может повысить активность системного и локального воспалительных процессов у пациентов с МВ. Так, у педиатрических пациентов-носителей аллелей *TNF-308A* и *LTA+252G*, обуславливающих высокую продукцию цитокинов, было обнаружено значимое повышение уровня нейтрофильной эластазы в мокроте, высокая частота остеопороза, а также существенное снижение показателей функции внешнего дыхания [13, 14]. В то же время в 2015 г. Vitam с соавторами выявили стимулирующее влияние высоких концентраций $\text{TNF}\alpha$ на экспрессию и активность белка *CFTR* в эпителиальных клетках пациентов, гомозиготных по мутации *F508del* [15]. Более того, пациенты-носители аллеля *LTA+252A*, характеризующиеся высокой продукцией $\text{LT}\alpha$, реже заболели туберкулезом и вирусными гепатитами [13].

Цель настоящей работы состояла в исследовании влияния однонуклеотидных полиморфизмов генов *TNF* и *LTA* на клинические параметры и маркеры воспаления пациентов с МВ.

Материалы и методы исследования

Пациенты. В исследовании принимали участие 120 детей и подростков в возрасте от 3 до 17 лет и 80 взрослых пациентов в возрасте от 18 до 38 лет. Все пациенты находились на активном диспансерном наблюдении (в период с 2014 по 2015 гг.) либо в отделении педиатрии Российской детской клинической больницы, либо в НИИ пульмонологии Минздравсоцразвития РФ, где регулярно (каждые 3–6 месяцев) обследовались и получали антибактериальную терапию. Обследование включало антропометрию, функцию внешнего дыхания (ФВД), клинический анализ крови с гемосиндромом, биохимический анализ крови (общий белок, протеинограмма, креатинин, холестерин, глюкоза, АСАТ, АЛАТ, ЛДГ, триглицериды, электролиты (K^+ , Na^+ , Ca^{++}), общий анализ мочи, копрологическое исследование, посев мокроты на флору и чувствительность к антибиотикам, ЭКГ, УЗИ органов брюшной полости, рентгенографию органов дыхания. Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывали по формуле: $ИМТ = \text{Вес (кг)} / \text{Рост (м}^2\text{)}$.

Все больные получали базисную терапию (муколитики, жирорастворимые витамины, высококалорийную диету и ферменты, гепатопротекторы, ингаляционную терапию, кинезитерапию). Выбор антибактериальных препаратов зависел от результатов микробиологического исследования мокроты. Больным с синегнойной инфекцией назначали цефалоспорины третьего поколения в комбинации с аминогликозидами или ципрофлоксацином. Больные, инфицированные *Burkholderia cepacia complex*, получали комбинацию 2–3 антибактериальных препаратов (цефтазидим, меропенем, тазоцин, бисептол), при этом сочетали внутривенный и ингаляционный пути введения. Пациенты с тяжелым обструктивным синдромом, ателектазами, прогрессирующей легочно-сердечной недостаточностью получали альтернирующий курс преднизолона (0,3–0,5 мг/кг через день, длительно).

За весь период исследования умерли 15 пациентов.

Здоровый контроль. В исследовании были использованы образцы ДНК 129 детей в возрасте от 5 до 17 лет, проходивших профилактический осмотр в ДКБ № 38. Все дети были здоровы и не имели хронических заболеваний в анамнезе. Средний возраст детей составил 11,8 года.

От каждого участника исследования и/или его законного представителя было получено информированное согласие на забор и использование биологического материала.

Получение образцов плазмы. Забор биологических образцов осуществляли через 2–3 недели после госпитализации, по окончании антибактериальной терапии. Кровь собирали из локтевой вены в пробирки с K_3 -ЭДТА. Пробирки центрифугировали при 400 г в течение 10 мин при 4°C, собирали плазму, разливали по аликвотам и хранили вместе с осажденными клетками крови при температуре -60°C.

Определение однонуклеотидных полиморфизмов генов TNF и LTA. Геномную ДНК выделяли из образцов крови с антикоагулянтом стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. При исследовании однонуклеотидного полиморфизма в промоторной области гена *TNF* (rs1800629, -308 G/A) генотипирование образцов ДНК осуществляли методом ПЦР с использованием специфических праймеров (F 5'-AGGCAATAGGTTTGTGAGGGCCATG-3'; R 5'-GACACACAAGCATCAAGGATACC-3') и последующей *Nco*I рестрикцией. Реакцию ПЦР проводили в объеме 25 мкл (50–150 нг геномной ДНК, 1 мкМ каждого праймера, 2,5 е.а. Таq-ДНК-полимеразы, 0,1 мМ каждого dNTP, 2,5 мкл 10x буфера (67 мМ Tris-HCl, pH 8.8, 50 мМ NaCl, 1 мМ 2-меркаптоэтанол), 2 мМ $MgCl_2$). ПЦР проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 94°C — 5 минут, затем 35 циклов смены температур: 94°C — 30 секунд, температура отжига праймеров 64°C — 30 секунд, элонгация цепи 72°C — 30 секунд., заключительная элонгация при 72°C — 2 минуты. Продукты реакции инкубировали с 5 е.а. рестриктазы *Nco* I в течение 6 часов при 37°C. Детекцию фрагментов ДНК проводили методом электрофореза в 8% ПААГ (соотношение акриламида/бисакриламида 29/1). Результаты электрофореза визуализировали путем окрашивания геля раствором бромистого этидия. У носителей двух аллелей *TNF-α-308A* на электрофорезе выявляли один фрагмент величиной 145 п.н. (вследствие отсутствия сайта, чувствительного к рестриктазе *Nco*I). Для гетерозиготных обладателей аллелей *TNF-α-308A* *TNF-α-308G* было характерно наличие трех фрагментов: 145, 125 и 20 п.н. У носителей двух аллелей *TNF-α-308G* на электрофорезе обнаруживалось 2 фрагмента размером 125 п.н. и 20 п.н.

При исследовании однонуклеотидного полиморфизма в первом интроне гена *LTA* (rs909253, +252 A/G) генотипирование образцов ДНК осуществляли методом ПЦР с использованием специфических праймеров (F 5'-CTGCACCTGCTGCCTGGATCC-3'; R 5'-GACGTTTCAGGTGGTGTGCATGC-3') и последующей *Nco*I рестрикцией. Реакцию ПЦР проводили в объеме 25 мкл (50–150 нг геномной ДНК, 1 мкМ каждого праймера, 2,5 е.а. Таq-ДНК-полимеразы, 0,1 мМ каждого dNTP, 2,5 мкл 10x буфера (67 мМ Tris-HCl, pH 8.8, 50 мМ NaCl, 1 мМ 2-меркаптоэтанол), 1 мМ $MgCl_2$). ПЦР проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 94°C — 5 минут, затем 35 циклов смены температур: 94°C — 30 секунд, температура отжига праймеров 66°C — 30 секунд, элонгация цепи 72°C — 30 секунд; заключительная элонгация — 72°C — 30 секунд; заключительная элонгация — 2 минуты. Продукты реакции инкубировали с 5 е.а. рестриктазы *Nco* I в течение 6 часов при 37°C. Детекцию фрагментов ДНК проводили методом электрофореза в 8% ПААГ (соотношение акриламида/бисакриламида 29/1). Результаты электрофореза визуализировали путем окрашивания геля раствором бро-

мистого этидия. У носителей двух аллелей LTA+252A на электрофорезе выявляли один фрагмент величиной 361 п.н. (вследствие отсутствия сайта, чувствительного к рестриктазе NcoI). Для гетерозиготных обладателей аллелей LTA+252A и LTA+252G было характерно наличие трех фрагментов: 361, 231 и 130 п.н. У носителей двух аллелей LTA+252G на электрофорезе обнаружилось 2 фрагмента размером 231 и 130 п.н.

Определение уровня цитокинов в плазме. Содержание цитокинов (фактор некроза опухолей- α (TNF- α), интерлейкин-10 (IL-10), интерферон- γ (IFN γ), тканевый фактор роста- β 1 (TGF β 1), IL-4, IL-8, IL-17) и концентрацию нейтрофильной эластазы плазме пациентов с МВ определяли с использованием коммерческих иммуноферментных наборов.

Статистический анализ. Различия между группами оценивали с помощью U-критерия Манна—Уитни и точного критерия Фишера.

Результаты

Частоты аллельных полиморфизмов TNF-308 и LTA+252 у пациентов с МВ и в группе здорового контроля

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что частоты аллелей генов TNF α и LTA в группе больных МВ совпадали с таковыми в группе здоровых детей. Анализ распределения частот генотипов указанных полиморфных локусов TNF α и LTA выявил полное соответствие распределению Харди—Вайнберга, как в группе здорового контроля, так и в группе больных МВ (все $p > 0,4$).

Сравнение частот различных генотипов TNF-308 — LTA+252 у пациентов с МВ и здоровых добровольцев не выявило значимых различий между группами (табл. 2).

Влияние полиморфизма TNF-308 на исход и течение тяжелых воспалительных заболеваний (в том числе и МВ) широко и активно исследуется на протяжении двух последних десятилетий. Показано, что у носителей аллеля TNF-308A, ассоциированного с высокой продукцией дан-

Таблица 1

Аллельные полиморфизмы генов TNF α и LTA у здоровых добровольцев и пациентов с МВ

Полиморфизм	Здоровые	Больные	p^*
TNF-308	N = 129	N = 200	
GG	93 (72%)	159 (79%)	0,143
GA	33 (26%)	39 (20%)	0,220
AA	3 (2%)	2 (1%)	0,384
Частота аллелей, G/A	0,85/0,15	0,89/0,11	0,529
LTA+252	N = 127	N = 200	
GG	13 (10%)	13 (6%)	0,294
GA	42 (33%)	85 (42%)	0,130
AA	72 (57%)	102 (51%)	0,366
Частота аллелей, GA	0,27/0,73	0,28/0,72	1,000

Примечание. * — значение p рассчитывали с помощью двустороннего критерия Фишера. Полужирным шрифтом выделены аллели, ассоциированные с высокой продукцией соответствующих цитокинов.

Таблица 2

Частоты различных генотипов TNF-308 — LTA+252 у пациентов с МВ и здоровых добровольцев

Генотипы TNF-308-LTA+252	Контроль	Пациенты	p^*
TNF-308GG — LTA+252AA	67/127 (52,8%)	101/200 (50%)	0,460
TNF-308GG — LTA+252AG	21/127 (16,5%)	58/200 (29%)	0,305
TNF-308GG — LTA+252GG	3/127 (2,4%)	2/200 (1%)	0,661
TNF-308GA — LTA+252AA	6/127 (4,7%)	2/200 (1%)	0,290
TNF-308GA — LTA+252AG	18/127 (14,2%)	28/200 (14%)	0,411
TNF-308GA — LTA+252GG	9/127 (7,1%)	9/200 (5%)	0,194
TNF-308AA — LTA+252AA	Не обнаружено	Не обнаружено	—
TNF-308AA — LTA+252AG	2/127 (1,6%)	Не обнаружено	0,160
TNF-308AA — LTA+252GG	1/127 (0,8%)	2/200 (1%)	0,401

Примечание. * — значение p рассчитывали с помощью двустороннего критерия Фишера. Полужирным шрифтом выделены аллели, ассоциированные с высокой продукцией соответствующих цитокинов.

ного цитокина, инфекционные процессы протекают тяжелее, чем у обладателей двух аллелей *TNF-308G* [7—11]. Больные МВ, обладающие аллелем *TNF-308A*, демонстрировали низкие показатели ФВД, но позднее заболели хронической синегнойной инфекцией [14, 16, 17]. Как видно из данных, представленных в табл. 1, только пятая часть пациентов с МВ (21%; n = 41) были носителями аллеля *TNF-308A*, ассоциированного с высокой продукцией TNF- α . Такого количества пациентов в группе явно недостаточно для получения статистически значимых результатов. В связи с этим представлялось целесообразным сравнить пациентов с генотипом низкой продукции LT α (*LTA+252AA*; n = 103) и больных с генотипами высокой продукции LT α (*LTA+252AG/GG*; n = 97).

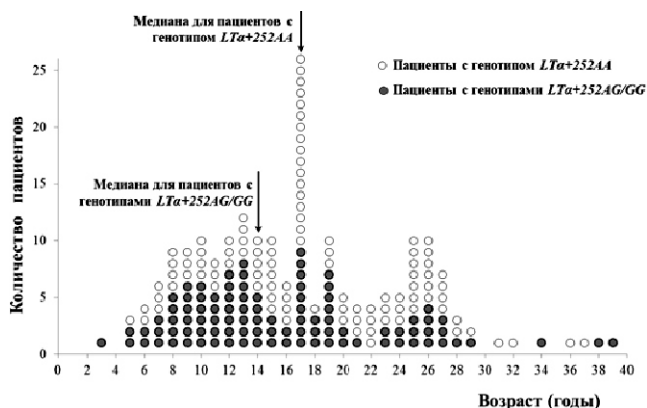
Демографические и клинические показатели пациентов с аллельными полиморфизмами гена LTA+252

В табл. 3 представлены демографические и клинические параметры пациентов с различными генотипами *TNF-308-LTA+252*. Пациенты двух групп значимо не различались между собой по полу, значению ИМТ (индекс массы тела), количеству больных, инфицированных *Burkholderia cepacia complex*. В то же время пациенты с генотипом низкой продукции LT α были значимо старше пациентов с генотипами высокой продукции LT α . Распределение пациентов по возрасту представлено на рисунке. Приведенные результаты показывают, что в группе с генотипами *LTA+252GG/AG* было больше пациентов в возрасте 5—17 лет, в то время как в группе па-

Таблица 3

Демографические и клинические показатели больных МВ с различными генотипами *TNF-308-LTA+252*

	Пациенты		p*
	с генотипами низкой продукции LT α	с генотипами высокой продукции LT α	
	<i>TNF-308AG-LTA+252AA</i> <i>TNF-308GG-LTA+252AA</i> (n = 103)	<i>TNF-308GG-LTA+252AG</i> <i>TNF-308GG-LTA+252GG</i> <i>TNF-308AG-LTA+252AG</i> <i>TNF-308AG-LTA+252GG</i> <i>TNF-308AA-LTA+252AG</i> <i>TNF-308AA-LTA+252GG</i> (n = 97)	
Возраст (лет)	18,0 ± 0,7	15,9 ± 0,7	0,023
Пол (М/Ж)	55/48	44/53	0,262
ИМТ (кг/м ²)	16,6 ± 0,3	16,6 ± 0,3	0,844
Мутации:			
<i>F508del/F508del</i>	21/84 (25%)	31/69 (45%)	0,011
<i>F508del/-</i>	41/84 (49%)	26/69 (38%)	0,192
<i>-/-</i>	22/84 (26%)	12/69 (17%)	0,242
ND	19/103	28/97	—
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	34/103 (33%)	25/97 (26%)	0,281
Показатели ФВД:			
ФЖЕЛ (%)	71,1 ± 2,6	74,9 ± 2,8	0,251
ОФВ1 (%)	54,6 ± 2,9	61,5 ± 3,3	0,125
Диабет:			
частота	10/103 (10%)	6/97 (6%)	0,439
возраст пациентов	19,9 ± 2,2	11,3 ± 1,4	0,009
Возраст постановки диагноза	5,0 ± 0,7	5,9 ± 0,7	0,775
Смертность:			
частота	7/103 (7%)	8/97 (8%)	0,791
возраст пациентов	15,0 ± 1,0	11,9 ± 1,3	0,083
Примечание. * — значение p рассчитывали с помощью двустороннего критерия Фишера или с применением U-критерия Манна—Уитни. Полужирным шрифтом выделены аллели, ассоциированные с высокой продукцией соответствующих цитокинов. ИМТ — индекс массы тела; ФВД — функция внешнего дыхания; ФЖЕЛ — форсированная жизненная емкость легких; ОФВ1 — объем форсированного выдоха за 1 секунду; -/- — неизвестные мутации; ND — генетическое обследование не проводили.			



Распределение по возрасту пациентов с различными генотипами *LTA+252*. Один символ соответствует одному пациенту.

циентов с генотипом низкой продукции $LT\alpha$ преобладали пациенты 17—26 лет. Следует отметить, что количество маленьких детей 3—7 лет и взрослых пациентов старше 30 было приблизительно одинаковым.

Обращает на себя внимание тот факт, что в группе пациентов с генотипами *LTA+252GG/AG* количество пациентов, гомозиготных по мутации *F508del* было приблизительно в 2 раза больше, чем в группе пациентов с генотипом *LTA+252AA*. Возможно, полученный результат связан с относительно высокой численностью пациентов, не прошедших генетическое обследование. Так, количество таких больных в группе с генотипом

LTA+252AA составило 18%, а в группе с генотипами *LTA+252GG/AG* — 29%.

Несмотря на значимую разницу в возрасте, две группы существенно не различались между собой по показателям ФВД, частоте развития сахарного диабета и количеству умерших пациентов. Однако в группе с генотипами *LTA+252GG/AG* пять из шести пациентов с диабетом были моложе 14 лет. Напротив, в группе с генотипом *LTA+252AA* был только один (из 10) юный пациент с диабетом ($p = 0,007$, двусторонний критерий Фишера). Сходным образом, значение медианы возраста умерших больных с генотипом *LTA+252AA* составляло 16 лет, а у пациентов с генотипами *LTA+252GG/AG* этот показатель был равен 11 годам. Следует отметить, что эти различия не достигали уровня статистической значимости ($p = 0,083$).

Маркеры воспаления в плазме пациентов с различными генотипами TNF-308 — LTA+252

Исследование маркеров воспаления в плазме выявило значимое повышение уровней $IL-17A$ и $IFN\gamma$ в группе пациентов с генотипами *LTA+252GG/AG* (высокие продуценты $LT\alpha$). У пациентов этой группы также отмечали выраженную тенденцию к повышению уровня $IL-8$. В то же время концентрация нейтрофильной эластазы в плазме пациентов с генотипами высокой продукции $LT\alpha$ была даже ниже соответствующего показателя в группе пациентов с генотипом низкой продукции этого цитокина, однако данные различия не достигали

Таблица 4

Маркеры воспаления в плазме пациентов с различными генотипами *TNF-308 — LTA+252*

Маркеры в плазме, чувствительность теста	Пациенты		p
	с генотипом низкой продукции $LT\alpha$	с генотипом высокой продукции $LT\alpha$	
	<i>TNF-308AG-LTA+252AA</i> <i>TNF-308GG-LTA+252AA</i> (n = 103)	<i>TNF-308GG-LTA+252AG</i> <i>TNF-308GG-LTA+252GG</i> <i>TNF-308AG-LTA+252AG</i> <i>TNF-308AG-LTA+252GG</i> <i>TNF-308AA-LTA+252AG</i> <i>TNF-308AA-LTA+252GG</i> (n = 97)	
Эластаза, пкг/мл (1,98 пкг/мл)	84,6 (29,8 ÷ 815,3)	70,6 (26,1 ÷ 233,3)	0,166
$IL-17A$, пкг/мл (20,0 пкг/мл)	0 (0 ÷ 284,3)	25,6 (0 ÷ 8701,4)	0,007
$IL-17F$, пкг/мл (3,3 пкг/мл)	5,9 (0 ÷ 444,8)	2,9 (0 ÷ 1737,0)	0,230
$IL-8$, пкг/мл (9,75 пкг/мл)	397,7 (36,8 ÷ 6074,2)	610,3 (14,6 ÷ 8580,9)	0,080
$IL-10$, пкг/мл (5,0 пкг/мл)	7,7 (0 ÷ 139,0)	7,0 (0 ÷ 490,4)	0,622
$IL-4$, пкг/мл (2,0 пкг/мл)	7,5 (0 ÷ 139,9)	9,7 (0 ÷ 277,2)	0,149
$IFN-\gamma$, пкг/мл (25,0 пкг/мл)	65,9 (30 ÷ 567,3)	94,7 (34,3 ÷ 2467,9)	0,017
$TGF-\beta1$, пкг/мл (8,6 пкг/мл)	10354,8 (0 ÷ 35703,2)	10039,8 (0 ÷ 45205,4)	0,436

Примечание. Результаты представлены в виде медиан (максимальное ÷ минимальное значение). Статистическую обработку данных проводили с помощью U-критерия Манна—Уитни. Полужирным шрифтом выделены аллели, ассоциированные с высокой продукцией соответствующих цитокинов. Уровень $TNF-\alpha$ в плазме подавляющего большинства участников исследования был ниже пределов чувствительности теста (1 пкг/мл).

уровня статистической значимости. Концентрации регуляторных цитокинов TGF- β_1 , IL-4, IL-10 в плазме пациентов с различными генотипами *LTA+252* значимо не различались между собой (табл. 4).

Обсуждение

Несмотря на то (или, возможно, вследствие того), что TNF α и LT α (он же TNF β) были открыты одновременно, роль последнего в регуляции гомеостаза человека и животных оставалась слабо изученной и недооцененной. В настоящее время показано, что LT α не просто дублирует эффекты TNF α , но и играет ключевую роль в формировании вторичных лимфоидных органов в эмбриогенезе, поддерживает гомеостаз лимфоидных тканей после рождения, стимулирует синтез защитных факторов слизистыми оболочками, а также участвует в регуляции метаболических процессов [5]. В связи с этим исследование, посвященное влиянию полиморфизмов гена LT α на течение заболеваний, сопровождающихся аберрантной воспалительной реакцией и метаболическим синдромом, безусловно, являются актуальными. Полиморфизм гена LT α в позиции +252, или так называемый TNF β *NcoI* полиморфизм, оказывает влияние не только на экспрессию соответствующего белка, но и на экспрессию TNF α [12]. Так, наличие распространенного аллеля +252A способствует повышенной продукции TNF α , так как позиция +252 находится внутри специфического элемента, отвечающего на стимуляцию форболовыми эфирами и обладающего высоким сродством к транскрипционным факторам семейства AP-1, jun и c-fos [12]. Таким образом, теоритически, пациенты с распространенным генотипом *TNF-308GG-LTA+252AA* должны продуцировать повышенные уровни TNF α в присутствии стимулирующих факторов. Иллюстрацией вышеизложенного служит значимое повышение сывороточного TNF α у гомозиготных носителей *LTA+252A* с постоперационным сепсисом. Влияние данного аллельного варианта носило аддитивный характер: уровень TNF α у пациентов с генотипом *LTA+252AG*, был значимо ниже, чем у пациентов с генотипом *LTA+252AA*, но существенно превышал средний уровень цитокина у гомозиготных носителей редкого аллеля *LTA+252G* [18]. Аналогичные результаты были получены у больных рассеянным склерозом и пациентов с острым ишемическим инсультом: у носителей двух аллелей *LTA+252A* концентрация TNF α в плазме была значимо выше соответствующего показателя в группах пациентов с генотипами *LTA+252AG/GG* [19, 20]. Следует отметить, что у египетских пациентов с ревматоидным артритом, напротив, носители редкого генотипа *LTA+252GG* характеризовались повышенным уровнем сывороточного TNF α [21].

Высокий уровень провоспалительных цитокинов или «цитокиновый шторм» при сепсисе наблюдается очень короткое время (от нескольких часов до нескольких дней), затем наступает фаза толерантности, связанная с присутствием в кровотоке большого количества бактериального липополисахарида (эндотоксина). Состояние толерантности к эндотоксину характеризуется выраженным иммунодефицитом и, как следствие, высоким риском развития фатальных оппортунистических инфекций. Парадоксально, но то же состояние толерантности к эндотоксину позволяет больным МВ с теми же фатальными оппортунистическими инфекциями длительное время оставаться в живых, избегая перманентного «цитокинового шторма» и сохраняя умеренную активность иммунной системы [22].

В нормальных физиологических условиях небольшие количества липополисахарида постоянно попадают в кровотоки через клетки эпителии кишечника и сосуды портальной системы. Его источником являются грамотрицательные бактерии, заселяющие толстый кишечник [23]. Сравнительное исследование содержания липополисахарида в плазме здоровых добровольцев и пациентов с тяжелыми воспалительными процессами показало, что концентрации липополисахарида в плазме пациентов с МВ не отличались от таковых в плазме септических больных (0,3 vs 0,5 нг/мл соответственно). В то же время средние концентрации липополисахарида в плазме здоровых добровольцев и пациентов с обструктивной болезнью легких были на порядок ниже и составляли около 0,05 нг/мл [24]. В условиях толерантности к эндотоксину клетки моноцитарно-макрофагального ряда приобретают особый супрессорный фенотип и в ответ на стимуляцию антигеном продуцируют IL-10, но не провоспалительные цитокины, такие, как TNF α [24]. Следует отметить, что независимо от генотипа *TNF-308-LTA+252* в плазме подавляющего большинства участников данного исследования были обнаружены умеренные количества IL-10, в то время как уровень TNF α был существенно ниже границы чувствительности иммуноферментного метода (1 пкг/мл).

T-лимфоциты относительно резистентны к воздействию липополисахарида и в случае развития состояния толерантности к эндотоксину сохраняют способность синтезировать провоспалительные цитокины, в том числе LT α , который может взаимодействовать с рецепторами первого и второго типа для TNF α , и таким образом, повышать продукцию других провоспалительных цитокинов [5]. Так, в нашем исследовании уровень IL-17A и IFN γ в плазме носителей аллеля *LTA+252G* был значимо выше концентрации данных цитокинов в кровотоке пациентов с генотипом *LTA+252AA* (табл. 4).

LT α (точнее, гетеротример LT $\alpha_1\beta_2$) является важным фактором регуляции локального иммунитета слизистых оболочек и паренхиматозных органов [5]. Дефицит этого цитокина у экспериментальных животных вызывал

развитие aberrантной воспалительной реакции при инфицировании *Micobacterium tuberculosis*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii* и др. микроорганизмами [5]. При вирусных инфекциях $LT\alpha_1\beta_2$ обеспечивает дифференцировку субкапсулярных макрофагов протективного фенотипа и индуцирует продукцию интерферонов I типа ($IFN\alpha$ и $IFN\beta$) [5]. В связи с этим стоит упомянуть наше предыдущее исследование, показавшее, что пациенты с генотипом низкой продукции $LT\alpha$ чаще заболели туберкулезом и вирусными гепатитами [13]. Наконец, $LT\alpha_1\beta_2$ регулирует состояние и состав микробиоты за счет стимуляции синтеза защитных пептидов и специфических IgA. Дефицит $LT\alpha_1\beta_2$ у лабораторных животных сопровождался повышенным ростом микробиоты и изменением ее состава [5]. Другим важным фактором, влияющим на состояние микробиоты, являются желчные кислоты, которые тормозят рост микрофлоры и блокируют всасывание бактериального липополисахарида [23]. Поскольку при МВ нарушаются продукция и отток желчи вследствие воспалительных и фибротических процессов в печени, для многих пациентов механизм регуляции микробиоты с участием $LT\alpha$ является основным. Таким образом, есть все основания полагать, что носители аллеля $LTA+252G$, ассоциированного с высокой продукцией цитокина, в меньшей степени подвержены «утечке» эндотоксина в кровоток, чем обладатели двух аллелей $LTA+252A$. В связи с этим повышенное содержание IL-17A и $IFN\gamma$ в плазме носителей аллеля $LTA+252G$ можно объяснить менее выраженной иммуносупрессией.

Высокая активность системного воспалительного процесса у носителей аллеля $LTA+252G$ отчасти объясняет возрастные различия между группами пациентов с разными аллельными вариантами гена $LT\alpha$. Так, в группе с генотипами $LTA+252GG/AG$ было больше пациентов в возрасте 5–14 лет, что свидетельствует о более тяжелом, требующем регуляторной госпитализации, течении заболевания. Хотя носители различных аллелей $LTA+252$ не отличались между собой по количеству смертельных исходов и по частоте развития диабета, погибшие больные с генотипами $LTA+252GG/AG$ были моложе, и диабет у пациентов этой группы развивался в очень юном возрасте (табл. 3).

Вне всяких сомнений, полиморфизм $LTA+252$ оказывает существенное влияние на развитие патологических состояний, сопровождающихся нарушениями углеводного обмена. Так, согласно данным, полученным в двух независимых исследованиях, проводившихся в японской и датской популяциях, обладатели редкого генотипа $LTA+252GG$ в большей степени подвержены риску развития сахарного диабета типа II [25, 26]. Данные о влиянии однонуклеотидного полиморфизма $LTA+252$ на риск развития сахарного диабета типа I неоднозначны и противоречивы. Два исследования с участием японских и тунисских пациентов продемонстрировали преобладание носителей двух аллелей $LTA+252A$

в группе больных сахарным диабетом типа I по сравнению со здоровым контролем [27, 28]. В то же время исследование, проводившееся в популяции Бахрейна, выявило среди больных сахарным диабетом типа I повышенное количество лиц с редким генотипом $LTA+252GG$ [29]. Описанные противоречия могут быть связаны с «двойным» эффектом аллелей $LTA+252$. Действительно, пациенты с генотипом низкой продукции $LT\alpha$ ($LTA+252AA$) могут демонстрировать более выраженные метаболические нарушения и более агрессивную воспалительную реакцию, так как аллель $LTA+252A$ повышает экспрессию $TNF\alpha$ в присутствии стимулирующих факторов. Поскольку большинство пациентов с МВ перманентно находятся в состоянии толерантности к эндотоксину, то стимулирующий эффект аллеля $LTA+252A$ не реализуется. В этой ситуации влияние аллеля $LTA+252G$ на течение патологического процесса становится более выраженным.

Таким образом, полученные результаты показывают, что больные МВ, обладающие редким аллелем $LTA+252G$, характеризуются выраженной системной воспалительной реакцией, которая может быть одной из причин ранней гибели и развития сахарного диабета в детском возрасте. Для получения достоверных данных о рисках, связанных с носительством аллеля высокой продукции $LT\alpha$, необходимо существенно удлинить период наблюдений и увеличить количество обследованных пациентов.

Список литературы

1. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. Lancet. 2009; 373(9678):1891-1904.
2. Deakin JE, Papenfuss AT, Belov K, et al. Evolution and comparative analysis of the MHC Class III inflammatory region. BMC Genomics. 2006; 7:281-294.
3. Bazzoni F and Beutler B: The tumor necrosis factor ligand and receptor families. N Engl J Med. 1996; 334: 1717-1725.
4. Kelker HC, Oppenheim JD, Stone-Wolff D, et al. Characterization of human tumor necrosis factor produced by peripheral blood monocytes and its separation from lymphotoxin. Int J Cancer. 1985; 36(1):69-73.
5. Upadhyay V, Fu YX. Linking the microbiota and metabolic disease with lymphotoxin. Int Immunol. 2013; 25(7): 397-403.
6. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94: 3195-3199.
7. McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, et al. Variation in the $TNF\alpha$ promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. Nature. 1994; 371: 508-511.
8. Cabrera M, Shu MA, Shrpless C et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with cutaneous leishmaniasis. J Exp Med. 1995; 182: 1259-1264.
9. Moffatt MF, Cookson WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. Hum Mol Genet. 1997; 6: 551-554.
10. Shaw MA, Donaldson IJ, Collins A, et al. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. Genes Immun. 2001; 2: 196-204.

11. Babic Z, Pipinic IS, Varnai VM, et al. Association of *TNF α* — 308G>A, *TNF α* — 238G>A, *IL-1 α* — 889C>T and *IL-10* — 1082G>A genetic polymorphisms with atopic diseases: asthma, rhinitis, dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016; 169: 231-240.
12. Messer G, Spengler U, Jung MC, et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med.* 1991; 173: 209-219.
13. Shmarina G, Pukhalsky A, Petrova N, et al. TNF gene polymorphisms in cystic fibrosis patients: contribution to the disease progression. *J TranslMed.* 2013; 11: 19-26.
14. Hull J, Thomson AH. Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax.* 1998; 53: 1018-1021.
15. Bitam S, Pranke I, Hollenhorst M, et al. An unexpected effect of TNF- α on F508del-CFTR maturation and function. *F1000Research.* 2015; 4: 218-233.
16. Shmitt-Grohe S, Stuber F, Book M, et al. TNF-alpha polymorphism in relation to TNF-alpha production and clinical status in Cystic Fibrosis. *Lung.* 2006; 184: 99-104.
17. Arkwright PD, Pravica V, Geraghty PJ, et al. End-organ dysfunction in cystic fibrosis. *Am J Crit Care Med.* 2003; 167: 384-389.
18. Baghel K, Srivastava RN, Chandra A, et al. Tumor necrosis factor- β NcoI polymorphism and susceptibility to sepsis following major elective surgery. *Surg Infect.* 2014; 15(3): 213-220.
19. Kallaur AP, Oliveira SR, Simao ANC, et al. Tumor necrosis factor beta NcoI polymorphism is associated with inflammatory and metabolic markers in multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci.* 2014; 346(1-2): 156-163.
20. de Sousa Parreira J, Kallaur AP, Lehmann MF, et al. Tumor necrosis factor beta NcoI polymorphism (rs909253) is associated with inflammatory and metabolic markers in acute ischemic stroke. *Metab Brain Dis.* 2014; 30(1): 159-167.
21. Shakera OG, Alnoury AM, Hegazy GA, et al. Methylene tetrahydrofolate reductase, transforming growth factor- β 1 and lymphotoxin- α genes polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol.* 2016; 56(5): 414-420.
22. Lopez-Collazo E, del Fresno C. Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. *Crit Care.* 2013; 17(6): 242-252.
23. Sipka S, Bruckner G. The immunomodulatory role of bile acids. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014; 165(1):1-8.
24. del Campo R, Martinez E, del Fresno C, et al. Translocated LPS might cause endotoxin tolerance in circulating monocytes of cystic fibrosis patients. *PLoS One.* 2011; 6(12): e29577.
25. Yamada A, Ichihara S, Murase Y, et al. Lack of association of polymorphisms of the lymphotoxin α gene with myocardial infarction in Japanese. *J Mol Med.* 2004; 82: 477-483.
26. Hamid YH, Urhammer SA, Glumer C, et al. The common T60N polymorphism of the lymphotoxin- α gene is associated with type 2 diabetes and other phenotypes of the metabolic syndrome. *Diabetologia.* 2005; 48:445-451.
27. Nishimura M, Obayashi H, Mizuta I, et al. TNF, TNF receptor type 1, and allograft inflammatory factor-1 gene polymorphisms in Japanese patients with type 1 diabetes. *Hum Immunol.* 2003; 64(2):302-309.
28. Stayoussef M, AI-Jenaidi FA, AI-Abbasi A, et al. Modulation of type 1 diabetes susceptibility by tumor necrosis factor alpha -308 G/A and lymphotoxin alpha +249 A/G haplotypes and lack of linkage disequilibrium with predisposing DQB1-DRB1 haplotypes in Bahraini patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Feb; 15(2):379-381.
29. Stayoussef M, Zidi I, Mansour JB, et al. Association of lymphotoxin alpha polymorphism with type 1 diabetes in a Tunisian population. *Biochem Genet.* 2014; 52(1-2): 79-89.