

Выявление генетической предрасположенности к латентному течению туберкулезной инфекции

Бабушкина Н.П.*, Брагина Е.Ю., Гараева А.Ф., Гончарова И.А.,
Цитриков Д.Ю., Гомбоева Д.Е., Рудко А.А., Фрейдин М.Б.

ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» Научно-исследовательский институт медицинской генетики, г. Томск, Россия
nad.babushkina@medgenetics.ru

Туберкулез является значимой медико-социальной проблемой в связи с широкой распространенностью, высокой степенью инвалидизации и смертности населения. После инфицирования *M. tuberculosis* у подавляющего большинства развивается латентная туберкулезная инфекция (ЛТБИ), адекватно оценить истинную распространенность которой (по оценкам ВОЗ — это около 30% населения) практически невозможно, поскольку диагностику данного состояния проводят лишь у детей и ВИЧ-инфицированных. Целью настоящего исследования был поиск генетических маркеров, ассоциированных с ЛТБИ. У 70 пациентов с ЛТБИ и 445 индивидов из контрольной выборки изучено 62 однонуклеотидных полиморфизма (SNPs). Ассоциации с ЛТБИ выявлены для трех маркеров: rs2505675 ($p_{\text{perm}} = 0,020$), rs958617 ($p_{\text{perm}} = 0,019$), rs6676375 ($p_{\text{perm}} = 0,021$). С использованием MB-MDR выявлены информативные для оценки риска развития ЛТБИ межлокусные комбинации генотипов, характеризующие возможные межгенные (эпистатические) взаимодействия. Получено 4 двухлокусных ($p < 0,01$) и 5 трехлокусных статистически значимых моделей ($p < 0,001$), включающих 14 SNPs. Детальное рассмотрение полученных моделей позволило для каждой межлокусной комбинации получить от одного до трех сочетаний генотипов, предрасполагающих к развитию ЛТБИ, значения OR для которых составляют от 1,97 до 15,66. Полученные результаты указывают на выраженную роль эпистатических взаимодействий генов при ЛТБИ.

Ключевые слова: латентная туберкулезная инфекция, SNP, генетическая предрасположенность

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ №15-15-00074.

Identification of genetic predisposition to latent tuberculosis infection

Babushkina N.P.*, Bragina E.Yu., Garaeva A.F., Goncharova I.A.,
Tcitrikov D.Yu., Gomboeva D.E., Rudko A.A., Freidin M.B.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Institute of Medical Genetics, Tomsk
* Corresponding author: nad.babushkina@medgenetics.ru

Tuberculosis is a significant medical and social problem due to the high prevalence, high degree of disability and mortality. Latent tuberculosis infection (LTBI) develops in the majority of cases after infection of *M. tuberculosis*. It is almost impossible to estimate exactly the prevalence LTBI (according to WHO — it is about 30% of population), because this condition diagnoses only in children and HIV-infected people. The aim of our study was to determine the genes associated with LTBI. 62 SNPs were analyzed in 70 LTBI patients and 445 healthy donors. Associations with LTBI were identified for three markers: rs2505675 ($p_{\text{perm}} = 0.020$), rs958617 ($p_{\text{perm}} = 0.019$), rs6676375 ($p_{\text{perm}} = 0.021$). Interlocus combinations of genotypes characterizing possible intergenic (epistatic) interactions were revealed for the risk assessment of LTBI by MB-MDR. Four two-locus statistically significant models ($p < 0.01$) and 5 — three-locus models ($p < 0.001$) were obtained including 14 SNPs. Detailed consideration of obtained models allowed for each inter locus combination to get from one to three combinations of genotypes predisposing to the development of LTBI, the OR values for which are from 1.97 to 15.66. Our results indicate that epistatic interactions might play an important role in LTBI.

Key words: latent tuberculosis infection, SNP, genetic predisposition

Введение

Туберкулез (ТБ) является значимой медико-социальной проблемой в связи с широкой распространенностью, высокой степенью инвалидизации и смертности населения. После контакта с *M. tuberculosis* инфицирование происходит у 80—90% индивидов (причем наиболее часто — в детском возрасте). По оценкам ВОЗ в настоящее время ТБ инфицировано около трети населения Земли.

Развитие после инфицирования активной формы ТБ зависит от ряда факторов, наиболее важным из них является иммунный статус индивида. У подавляющего большинства инфицированных развивается латентная туберкулезная инфекция (ЛТБИ) — состояние, при котором бактерии в организме присутствуют, вызывая положительные реакции на туберкулезные аллергены, но полностью отсутствуют клинические и рентгенологические

признаки заболевания. То есть, ЛТБИ характеризуется наличием стойкого иммунного ответа на попавшие ранее в организм антигены *M. tuberculosis*. Примерно у 10% лиц с ЛТБИ в дальнейшем все же развивается активная форма ТБ, причем у 5% заболевание появляется в первый год после инфицирования, и еще у 5% — на протяжении всей жизни [1, 2]. У 90% лиц с ЛТБИ активная форма не развивается, то есть, возможно, что их индивидуальные иммунологические особенности, детерминируемые генетическими факторами, позволяют сдерживать развитие активной формы ТБ. Тем не менее, для профилактики развития клинических проявлений в группах высокого риска (дети до 5 лет и ВИЧ-инфицированные) проводится мониторинг появления новых случаев ЛТБИ с их дальнейшим лечением (с эффективностью 60–90%) [3]. Риск развития серьезных побочных эффектов от лекарственных препаратов (в частности, гепатотоксических эффектов), высокая стоимость лечения, невысокая надежность существующих тестов, этические проблемы делают нецелесообразными диагностику и лечение ЛТБИ у всего населения. Так, в нашей стране практически не проводят диагностику ЛТБИ у взрослых, и адекватно оценить истинную распространенность данной формы носительства *M. tuberculosis* практически невозможно [4–6]. Поэтому, несмотря на широкую распространенность в популяциях, ЛТБИ остается мало изученным состоянием, особенно с точки зрения генетической детерминации стойкого иммунного ответа к *M. tuberculosis*. Целью настоящего исследования был поиск генетических маркеров, ассоциированных с ЛТБИ.

Материалы и методы

Обследовано 70 индивидов с ЛТБИ, включая 38 мальчиков ($9,6 \pm 3,3$ года) и 32 девочки ($8,9 \pm 3,5$ года). Диагностика проводилась специалистами ОГБУЗ «Томский фтизиопульмонологический медицинский центр». У всех обследованных выявлен выраженный туберкулиновый реактивный, свидетельствующий об инфицировании *M. tuberculosis*; диаскинтест проводился троим. У 13 детей в анамнезе установлено наличие контакта с больными легочным ТБ, у 12 из них и еще у двоих обследованных имеют место случаи ТБ в семье. Со времени постановки диагноза у всех обследованных прошло не менее двух лет. Контрольная группа представлена 445 здоровыми индивидами без бронхолегочной патологии (средний возраст мужчин составил $41,5 \pm 16,7$ года, женщин — $38,3 \pm 17,2$ года). Специальных исследований на наличие ЛТБИ в контрольной группе не проводилось, что делает ее сопоставимой с популяционными выборками при исследовании широко распространенных заболеваний. Включенные в исследование индивиды из обеих выборок представляют славянское население г. Томска, преимущественно (>95%) русское. От всех обследованных получено информированное согласие.

Были проанализированы 62 SNP, для которых либо ранее было показано наличие ассоциаций с ТБ при про-

ведении GWAS, либо имеющих высокий прогностический потенциал в отношении ТБ, показанный с использованием биоинформационных подходов. Генотипирование осуществлялось методами MALDI-TOF масс-спектрометрии, ПЦР-ПДРФ-, SNaPshot-, и HRM-анализов с использованием оборудования ЦКП НИИ медицинской генетики ФГБНУ Томский НИМЦ РАН «Медицинская геномика».

Для анализа ассоциаций генетических маркеров с ЛТБИ использовали логистическую регрессию с включением пола в качестве коварианты. Возраст не включали в анализ в связи с коллинеарностью возраста и патологического состояния в регрессионной модели: все исследуемые пациенты с ЛТБИ были детьми, поэтому их сравнение с контрольной группой старшего возраста автоматически приводит к тому, что возраст становится сильным статистически значимым фактором, маскируя при этом реальный эффект генотипов. Учитывая, что фенотипические эффекты исследуемых генетических вариантов *a priori* неизвестны, анализ проведен для трех вариантов: аддитивного, доминантного и рецессивного. Для выбора наилучшей модели использовали информационный критерий Акаике (AIC), модель с минимальным значением принимали за наилучшую. Анализ проводили в программной среде R.

Из анализа были исключены варианты с частотой редкого аллеля <5%, уровнем генотипирования индивидов <80% и отклонением от равновесия Харди–Вайнберга в группе контроля (с поправкой Бонферрони). После применения этих фильтров из анализа были исключены 17 из 62 полиморфных вариантов. Для исключения ложноположительных результатов использовали пермутационный тест ($N = 1000$); регрессионные модели считали статистически значимыми при $p < 0,05$ для пермутационного p -значения.

Для выявления наиболее информативных комбинаций полиморфных вариантов проводили анализ эпистатических взаимодействий между сочетаниями SNPs методом Model-based Multifactor Dimensionality Reduction (MB-MDR) с последующей оценкой диагностической ценности полученных комбинаций путём расчета величин отношения шансов, чувствительности и специфичности, показателя AUC (площадь под ROC-кривой) [7]. Были протестированы двух- и трехлокусные комбинации. Для двухлокусных комбинаций далее анализировали модели с величиной $p \leq 0,01$, для трехлокусных — с $p \leq 0,0001$. Для каждой тестируемой комбинации выбирали вариант, соответствующий максимальному значению статистики Вальда, и затем определяли экспериментальный p -уровень с использованием пермутационного теста.

Отношение шансов (с 95%-ным доверительным интервалом) для ассоциированных аллелей, генотипов и сочетаний генотипов рассчитывалось стандартными методами, для низкополиморфных локусов — с использованием критерия Фишера.

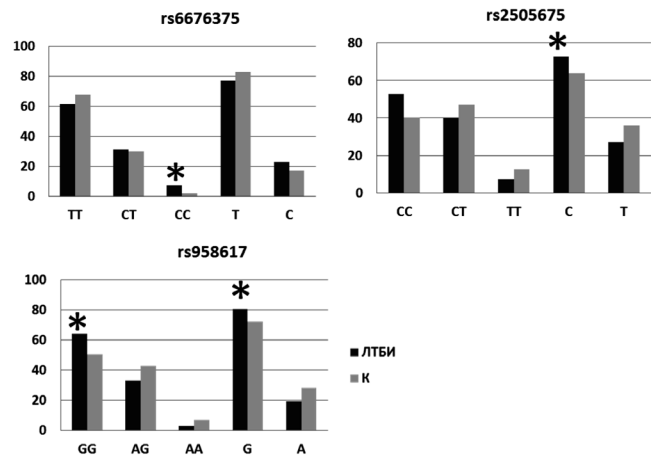
Результаты и обсуждение

Анализ ассоциаций был проведен для 45 SNPs, прошедших фильтры (частота редкого аллеля $>5\%$, уровень генотипирования индивидов $>80\%$, соответствие равновесию Харди—Вайнберга). Ассоциации с ЛТБИ выявлены для трех маркеров: rs2505675 ($p_{\text{perm}} = 0,020$), rs958617 ($p_{\text{perm}} = 0,019$), rs6676375 ($p_{\text{perm}} = 0,021$). Ассоциированными с риском ЛТБИ в томской выборке являются генотип CC rs6676375 ($OR = 3,84$ ($CI: 1,30-11,33$), $\chi^2 = 4,18$, $p = 0,041$, для критерия Фишера $p_f = 0,031$); аллель C rs2505675 ($OR = 1,52$ ($CI: 1,00-2,31$), $\chi^2 = 3,93$, $p = 0,047$), а также аллель G ($OR = 1,63$ ($CI: 1,02-2,60$), $\chi^2 = 4,24$, $p = 0,040$) и генотип GG ($OR = 1,76$ ($CI: 1,01-3,07$), $\chi^2 = 4,03$, $p = 0,045$) rs958617 (рисунок). Ранее были показаны ассоциации данных SNPs с ТБ в группе больных из ЮАР (капские малайцы) [8]. Все три маркера находятся в некодирующей ДНК: rs2505675 является интронным вариантом в гене некодирующей РНК *GMDS-AS1* (*LOC100508120*) в хромосомном регионе 6p25.2, два других SNPs локализованы в межгенных последовательностях: rs6676375 в хромосомном регионе 1q43 и rs958617 — в 4q21.1.

Для выявления информативных для оценки риска развития ЛТБИ межлокусных комбинаций генотипов, характеризующих возможные межгенные (эпистатические) взаимодействия, был использован непараметрический метод MB-MDR.

Для ЛТБИ получено 4 двухлокусных ($p < 0,01$) и 5 — трехлокусных ($p < 0,001$) статистически значимых моделей, включающих как два из ассоциированных с ЛТБИ полиморфных варианта, так и 12 SNPs, ассоциаций которых с ЛТБИ методом логистической регрессии выявлено не было (табл. 1). Значения AUC для полученных моделей не превышают 0,61, во всех случаях получены высокие величины показателя специфичности (от 0,76 до 1) и низкие (от 0,032 до 0,46) величины показателя чувствительности.

Детальное рассмотрение полученных моделей позволило для каждой межлокусной комбинации получить от



Распределение частот аллелей и генотипов ассоциированных с ЛТБИ полиморфных вариантов. * — аллели/генотипы риска.

одного до трех сочетаний генотипов, predisposing к развитию ЛТБИ (табл. 2). Обращает на себя внимание, что два (rs6455894 и rs12211969) из 14 SNPs, образующих ассоциированные с ЛТБИ межлокусные комбинации генотипов, локализованы в одном гене (*PACRG*), а еще шесть полиморфных вариантов участвуют в формировании более чем одного межгенного сочетания генотипов. Так, rs2273061 задействован в двух двухлокусных моделях и одной трехлокусной, rs2837857 и rs3915165 — в трех трехлокусных, rs10956514 — в двух трехлокусных, rs6676375 и rs17217757 в двухлокусной и в трехлокусной моделях.

Из этих SNPs rs6676375 локализован в межгенном регионе, rs2837857 — в гене *DSCAM*, кандидате для синдрома Дауна (кодирует клеточную адгезивную молекулу Ig-надсемейства) и экспрессирующимся исключительно в тканях головного мозга и в сердце на ранних этапах его развития [9]. Соответственно, можно предположить, что каждый из этих полиморфных вариантов не маркирует ген, непосредственно вовлеченный в развитие разных

Таблица 1

Статистически значимые MDR-модели для ЛТБИ

Модель	OR	SE	SP	AUC	p_{perm}
rs958617 / rs2273061	2,7	0,46	0,76	0,61	0,007
rs6676375 / rs17217757	16,9	0,071	1	0,53	0,007
rs6455894 / rs12211969	3,77	0,17	0,95	0,56	0,008
rs1819084 / rs2273061	2,65	0,41	0,79	0,6	0,009
rs3915165 / rs712039 / rs1799983	5,23	0,23	0,95	0,59	<0,001
rs3915165 / rs2837857 / rs160441	5,43	0,25	0,94	0,59	<0,001
rs3915165 / rs2837857 / rs10956514	3,24	0,22	0,92	0,57	<0,001
rs7821565 / rs2837857 / rs2273061	0,263	0,032	0,89	0,46	<0,001
rs6676375 / rs17217757 / rs10956514	4,97	0,26	0,93	0,6	<0,001

Примечание. OR — отношение шансов; SE — чувствительность; SP — специфичность; AUC, площадь под диагностической кривой; p_{perm} — p -значение для пермутационного анализа.

Предрасполагающие к развитию ЛТБИ межлокусные комбинации генотипов

Межлокусная комбинация	Рисковое сочетание	OR	95% CI	χ^2	p	p _f
rs6455894/rs12211969	CC/AG	3,67	1,36–9,70	7,32	0,007	0,007
rs6676375/rs17217757	CC/GC	13,04	2,18–99,34	11,25	0,0008	0,002
rs6676375/rs17217757/rs10956514	CT/GG/AA	3,3	1,48–7,28	9,45	0,002	—
	CC/GC/AG	15,66	2,27–108,02	8,38	0,0038	0,008
rs3915165/rs712039/rs1799983	GT/CT/GG	4,68	1,67–12,91	10,19	0,0014	0,0025
	GG/TT/GT	3,5	1,21–10,14	—	—	0,04
rs3915165/rs2837857/rs160441	GT/CC/CC	3,99	1,46–10,68	8,27	0,004	0,0051
	GT/CT/CT	5,31	1,57–17,6	8,53	0,0035	0,0054
rs3915165/rs2837857/rs10956514	GT/CC/AA	4,17	1,69–10,14	11,25	0,0008	0,0015
	GT/CT/AG	4,6	1,54–13,48	8,64	0,0033	0,0048
rs7821565/rs2837857/rs2273061	TT/CC/CT	1,97	1,04–3,71	4,37	0,037	—
	CT/CC/CC	2,7	1,09–6,52	4,76	0,029	0,028
	CT/CT/CT	2,83	1,14–6,87	5,23	0,022	0,025
rs1819084/rs2273061	CC/CT	2,65	1,46–4,79	11,29	0,0008	—
rs958617/rs2273061	GG/CT	2,7	1,51–4,83	12,3	0,00045	—

форм ТБ, а, вероятно, находится в одной группе сцепления с геном, задействованным в механизмах иммунного ответа. Остальные SNPs находятся в генах, для которых показана вовлеченность в иммунные процессы — напрямую или опосредованно. Так, продукт гена *ASAP1* (rs10956514) участвует в формировании цитоскелета, в дендритных клетках с пониженным уровнем экспрессии этого гена показаны нарушения как структуры внутриклеточного матрикса, так и миграции этих клеток [10]. В определении пути клеточной дифференцировки Т-лимфоцитов триггерами являются белки Notch-1 и GATA-3 [11], а, следовательно, вовлечены и гены *JAG1* (rs2273061), кодирующий лиганд Notch1-рецептора [12], и *ZFPM2* (rs17217757), кодирующий транскрипционный фактор, модулирующий активность GATA-1 и других транскрипционных факторов семейства GATA [13].

Ген *CD80* кодирует мембранный рецептор В-лимфоцитов, моноцитов, дендритных клеток, индуцирующий пролиферацию Т-лимфоцитов и продукцию цитокинов в ответ на стимуляцию микробными компонентами [14]. Функция гена *PACRG* не вполне ясна, он включен в большие шаперонные комплексы, связан с убиквитин-зависимой системой протеолиза. Промоторный регион, регулирующий экспрессию локализованных «голова к голове» генов *PACRG* и *PARK2* (мутации в котором приводят к болезни Паркинсона в молодом возрасте), ассоциирован с лепрой [15].

Таким образом, полученные результаты указывают на выраженную роль эпистатических взаимодействий генов при ЛТБИ, потенциально определяющих специфический статус иммунной системы, позволяющий сдерживать активность *M. tuberculosis*, что выражается в отсутствии выраженных клинических проявлений ТБ при наличии бактерий в организме.

Список литературы

1. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению латентной туберкулезной инфекции у детей // под редакцией профессора Аксеновой ВА. 2013. 10 с.
2. Руководство по ведению пациентов с латентной туберкулезной инфекцией. ВОЗ. 2015. 40 с.
3. Lobue P, Menzies D Treatment of latent tuberculosis infection: an update. *Respirology* 2010;(15):603–622.
4. Зорина ММ, Филимонов ПН, Фелькер ИГ, Мальцев АВ Оценка распространенности латентной туберкулезной инфекции у сотрудников противотуберкулезного учреждения Туберкулез и болезни легких. 2014;(5):66–68.
5. Истомина ЕВ Диагностика латентной туберкулезной инфекции у сотрудников противотуберкулезного учреждения. Медицинский альянс. 2015;(2):47–55
6. Слащева ДМ, Брынза НС, Решетникова ЮС Обоснование актуальности изучения течения латентной туберкулезной инфекции у детского населения Тюменской области. Университетская медицина Урала. 2016;(3):38–40.
7. Mahachie JJM, Van Lishout F, Van Steen K Model-Based Multifactor Dimensionality Reduction to detect epistasis for quantitative traits in the presence of error-free and noisy data. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(6):696–703. doi: 10.1038/ejhg.2011.17.
8. Chimusa ER, Zaitlen N, Daya M et al. Genome-wide association study of ancestry-specific TB risk in the South African Coloured population. *Hum Mol Genet*. 2014;23(3):796–809. doi: 10.1093/hmg/ddt462
9. Barlow GM, Chen X-N, Shi ZY et al. Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. *Genet. Med*. 2001;(3):91–101.
10. Curtis J, Luo Y, Zenner HL et al. Susceptibility to tuberculosis is associated with variants in the *ASAP1* gene encoding a regulator of dendritic cell migration. *Nat Genet*. 2015;47(5):523–527. doi:10.1038/ng.3248
11. Вшивкова ОС, Мелешко АН Роль транскрипционного фактора Ikaros в нормальном гемопоэзе и лейкогенезе: биологические и клинические аспекты. Успехи молекулярной онкологии. 2015;2(1):013–026. doi:10.17650/2313-805X.2015.2.1.013-026

12. Fernandez-Sanchez V, Pelayo R, Flores-Guzman P et al. In vitro effects of stromal cells expressing different levels of Jagged-1 and Delta-1 on the growth of primitive and intermediate CD34(+) cell subsets from human cord blood. *Blood Cells Mol Dis.* 2011;47(4):205-213. doi: 10.1016/j.bcmd.2011.08.003.
13. Holmes M, Turner J, Fox A et al. hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the co-repressor mCtBP2 and modulates GATA-mediated activation. *J. Biol. Chem.* 1999;(274):23491-23498.
14. Takeda K, Kaisho T, Akira S Toll-Like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21:335-76. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126
15. Mira MT, Alcais A, Van Thuc N et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature.* 2004;427:636-640. doi:10.1038/nature02326