

Обзорные статьи

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2011

УДК 616-002.5-055.5/7

НАСЛЕДСТВЕННАЯ ПОДВЕРЖЕННОСТЬ ТУБЕРКУЛЕЗУ*

А. А. Рудко, М. Б. Фрейдin, В. П. Пузырев

Учреждение РАМН НИИ медицинской генетики Сибирского отделения РАМН, Томск

Генетика многофакторных заболеваний — одно из основных направлений современной медицинской генетики и клинической медицины. Успехи геномных исследований многофакторных заболеваний повысили интерес к изучению генетики подверженности инфекционным заболеваниям, включая туберкулез. В статье представлен обзор современных достижений в изучении генетической подверженности туберкулезу. Дан краткий исторический экскурс в проблему генетики туберкулеза, представлены результаты изучения генетических ассоциаций и данные полногеномных ассоциативных исследований. Обсуждается гипотеза менделевского наследования некоторых тяжелых форм микобактерийной инфекции.

Ключевые слова: туберкулез, многофакторное заболевание, подверженность, гены-кандидаты

INHERITED PREDISPOSITION TO TUBERCULOSIS. *Rudko A. A., Freidin M. B., Puzyrev V. P.*

Genetics of multifactorial diseases (MFD) is one of the mainstream directions of modern medical genetics and clinical medicine. Advances in genomic research on MFD enforced interest in studying the genetics of susceptibility to infectious diseases, including tuberculosis (TB). This paper is a review of recent achievements in studying genetic susceptibility to TB. This article is a review of recent achievements in studying genetic susceptibility to TB. A brief historical overview of the genetics of tuberculosis is reported; the results of candidate gene and genome-wide association studies are presented. The hypothesis of Mendelian inheritance of some severe forms of mycobacterial infection is discussed.

Key words: tuberculosis, multifactorial diseases, predisposition, candidate genes.

Исторический экскурс в изучение генетики туберкулеза

Туберкулез (ТБ) — распространенное социально зависимое инфекционное заболевание, вызываемое *Mycobacterium tuberculosis* и другими микобактериями, при котором могут быть поражены любые органы и ткани человеческого тела [6]. Несмотря на все предпринимаемые меры борьбы с ТБ, эта инфекция остается одной из наиболее распространенных и опасных: *M. tuberculosis* инфицировано 1/3 жителей планеты, ежегодно в мире регистрируют около 9 млн новых случаев ТБ и более 2 млн смертей от этого заболевания. Кроме того, растет доля полирезистентных форм ТБ, трудно поддающихся лечению антимикобактерийными препаратами. В 1993 г. ВОЗ объявила ТБ глобальной проблемой здравоохранения [36].

Традиционно внимание исследователей, занимающихся проблемами этой инфекции, было ориентировано главным образом на изучение патогенных характеристик возбудителя заболевания. Однако развитие генетики в XX веке стимулировало врачей и ученых к изучению ТБ с точки зрения наследственной предрасположенности самого человека, "хозяина" инфекции. Ключевым стимулом движения в этом направлении послужил выдвинутый Д. Холдейном постулат, согласно которому микроорганизмы последние 5000 лет являлись главными агентами естественного отбора у челове-

ка. Огромное генетическое разнообразие человеческих популяций во многом обусловлено влиянием инфекций, в течение многих сотен лет являвшихся одной из основных причин смертности людей. Д. Холдейн предполагал, что основным фактором отбора у негроидов являлась малярия, а у европеоидов — ТБ [28].

Доказательства влияния генетической компоненты человека на развитие ТБ первоначально основывались на многочисленных эпидемиологических и семейно-близнецовых исследованиях. Были зафиксированы повышенная встречаемость ТБ у родственников больных пациентов, не проживающих совместно, а также различные частоты распространенности ТБ в этнически разных популяциях, проживающих в сходных социально-экономических условиях [10].

Важное значение в выявлении роли генетической компоненты в развитии инфекционного заболевания у человека имеют близнецовые исследования, в ходе которых сравнивают, как часто монозиготные и дизиготные близнецы страдают одним и тем же заболеванием (конкордантность). Более высокий уровень конкордантности по клиническому ТБ среди монозиготных близнецов по сравнению с дизиготными (Россия 52 и 22%, Германия 65 и 25%, США 62 и 18%, Великобритания 32 и 14% соответственно) указывает на значимость генетической компоненты в развитии этого заболевания

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта ФЦП № НК-116П/5, гранта Президента РФ МК-2115.2009.7, гранта РФФИ № 09-04-00558-а.

Рудко А. А. — канд. мед. наук, главврач (aleksey.rudko@medgenetics.ru); Фрейдin М. Б. — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. (mfreidin@ Rambler.ru); Пузырев В. П. — д-р мед. наук, проф., акад. РАМН, дир. (valery.puzyrev@medgenetics.ru)

[4, 10, 18]. В России это направление активно разрабатывалось в 30-е годы прошлого века под руководством С. Г. Левита. Им были организованы широкомасштабные медико-генетические исследования различных болезней многофакториальной природы, в том числе и с применением близнецового метода. Работы по изучению ТБ велись совместно с патоморфологом В. Г. Штефко и также позволили оценить вклад наследственности в развитие заболевания [3].

Среда генетических локусов одним из первых при ТБ начали изучать систему генов главного комплекса гистосовместимости (HLA-комплекса). Выявлена высокая популяционная специфика полученных ассоциаций антигенов HLA-комплекса, однако ряд маркеров проявил связь с заболеванием в различных популяциях (B15, B5, B12, Cw1) [3]. В многочисленных исследованиях выявлены ассоциации антигена DR2 с восприимчивостью к ТБ, хронизацией и более тяжелым его течением [1, 7].

На основании экспериментальных исследований была выдвинута гипотеза мультифакториального типа наследования предрасположенности к ТБ легких, согласно которой заболевание возникает в результате сложного взаимодействия неблагоприятных внешних факторов, свойств микобактерии и макроорганизма и во многом зависит от генетических особенностей последнего, определяющих силу, специфичность и эффективность иммунного ответа [32, 33].

В настоящее время при изучении генетической подверженности ТБ, как и для других мультифакториальных заболеваний (МФЗ), используют два основных подхода: анализ генов-кандидатов (ассоциативные исследования) и полногеномное картирование. Новым направлением является изучение индивидов с высокой чувствительностью к непатогенным микобактериям, характеризующейся моногенным характером наследования. В связи с развитием молекулярно-генетических технологий и широким применением обозначенных выше подходов во всемирной базе данных HuGE Navigator (www.hugenavigator.net) накоплены данные о более чем 160 генах, исследованных на предмет ассоциации с ТБ. 30% этих генов изучено в трех популяциях и более. В табл. 1 приведены наиболее активно исследуемые гены-кандидаты подверженности ТБ.

Активно изучают и геном возбудителя — *M. tuberculosis* главным образом в связи с поиском молекулярных механизмов лекарственной устойчивости, разработкой экспресс-диагностики заболевания с использованием ДНК-маркеров, поиском новых мишеней для создания более эффективных вакцин. Эти работы также широко представлены в научных периодических изданиях [43, 49].

Гены-кандидаты подверженности ТБ

Ген *SLC11A1 (NRAMP1)* — первый ген-кандидат подверженности ТБ, выявленный в исследованиях на мышах и впоследствии картированный у человека методом позиционного клонирования; один из наиболее активно исследуемых генов при инфекционных заболеваниях — его изучение ведется

уже более 30 лет. У мышей мутация гена способствует развитию ряда инфекций, в том числе *Mycobacterium bovis (BCG)*, *M. lepreum*, *M. avium* и др. Гену было присвоено название Natural resistance-associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) — ген макрофагального белка мыши, ассоциированного с естественной резистентностью 1. *Nramp1* кодирует высокогидрофобный интегрированный мембранный белок с молекулярной массой около 60 кД, состоящий из 12 трансмембранных доменов и выступающий по структуре ионный канал [2, 7]. В 1994 г. клонирован и охарактеризован человеческий гомолог гена *Nramp1*, локализованный в участке 2q35 [17]. Современное название гена — *SLC11A1*.

Функция белка *Nramp1* — H^+ /АТФ-зависимый дивалентный катионный транспорт ионов Fe^{2+}/Mn^{2+} , реализующийся на мембранах фагосом [24]. Ионы металлов играют важную роль в жизнедеятельности как макро-, так и микроорганизмов, являясь кофактором многих ферментов, в том числе и супероксиддисмутазы, синтезируемой *Salmonella*, *Leishmania* и *Mycobacterium* и оказывающей ключевую роль в противодействии супероксиданионам и гидроксильным радикалам, вырабатываемым NADPH-оксидазами макрофагов [14].

Существует несколько теорий антибактериального действия NRAMP1. Согласно одной из них белок закачивает ионы железа внутрь фагосом, где они катализируют реакции, направленные на синтез гидроксильных радикалов [50]. По другой гипотезе, роль NRAMP1, встроенного в стенку фагосомы, содержащей микобактерию, заключается в выкачивании ионов металлов из внутрифагосомного пространства, что нарушает жизнедеятельность микроорганизма [23, 24].

Выявлена специфичность тканевой экспрессии гена *NRAMP1*: наиболее сильная экспрессия гена отмечается в гранулоцитах и в легких, что, вероятно, обусловлено эволюционным давлением *M. tuberculosis*, паразитирующей у человека главным образом именно в легочной ткани [15].

Сейчас в базах данных Научного центра биотехнологических исследований США (NCBI) накоплена информация о 58 однонуклеотидных полиморфизмах (SNPs) гена *NRAMP1* человека, из них в ассоциативных исследованиях активно изучают около 10 SNPs. Поиск ассоциаций полиморфизмов гена с ТБ проведен более чем в двух десятках популяций, но полученные результаты весьма противоречивы. В большой родословной индейцев Канады с множественными случаями ТБ выявлен эффект главного гена; многочисленные ассоциации полиморфизмов гена с ТБ обнаружены в популяциях США, Китая, Кореи, Танзании, Гамбии, Гвинеи и др.; не найдено связи с заболеванием полиморфизмов *NRAMP1* в Бразилии, Марокко и ряде других популяций [15, 36]. В России также отмечена популяционная специфика ассоциаций гена *NRAMP1* с ТБ легких: у славянского населения Томской области выявлена ассоциация с полиморфизмом 274С/Т, тогда как у коренного населения Республики Тыва ассоциация не установлена, несмотря на значительно большую распространенность заболевания [5].

Гены-кандидаты подверженности ТБ

Ген	МIM	Хромосомная локализация	Полиморфизм (rs)	Положение в гене	Характер ассоциаций
<i>NRAMP1</i>	600266	2q35	17235416	3'-UTR	П
			17235409	Экзон 15	П
			3731865	Инtron 4	П
			2276631	Экзон 3	П
			5'(GT)n	5'	П
<i>VDR</i>	601769	12q12—q14	731236	Экзон 9	П
			10735810	Экзон 2	П
			1544410	Инtron 8	П
<i>MBL</i>	154545	10q11.2—q21	5030737	Экзон 1	У
			1800450	Экзон 1	У
			1800451	Экзон 1	У
<i>NOS2A</i>	163730	17cen—q11.2	8078340	5'	П
			9282799	5'	П
<i>IL1B</i>	147720	2q14	1800587	5'	П
			1143634	Экзон 5	П
<i>IL1RN</i>	147679	2q14.2	Микросателлит	Инtron 2	П
<i>IL12B</i>	161561	5q31.1—q33.1	3212227	3'-UTR	П
<i>IFNγ</i>	147570	12q14	2430561	Инtron 1	П
<i>IL10</i>	124092	1q31—q32	1800896	5'	П
			1800872	5'	П
<i>CD209</i>	604672	19p13.3	4804803	5'	У
			735239	5'	П
<i>TNFα</i>	191160	6p21.3	1800629	5'	У
			1799724	5'	У
<i>SP110</i>	604457	2q37.1	2114592	Инtron 6	П
			3948464	Экзон 6	П
<i>CCL2</i>	158105	17q11.2—q12	1024611	3'-UTR	У
			2857656	промотор	У
<i>TLR2</i>	603028	4q32	Микросателлит	Инtron 2	П
<i>TLR4</i>	603030	9q32—q33	5743708	Экзон 9	П
			4986790	Экзон 3	П

Примечание. П — предрасположенность к заболеванию, У — устойчивость.

Такая гетерогенность ассоциаций полиморфизмов с ТБ в различных исследованиях и степени их проявления может быть объяснена влиянием окружающих генетических систем — генетическим фоном, на котором действует ген *NRAMP1*. В одних популяциях это окружение способствует сильному проявлению антибактериального эффекта *NRAMP1*, в других этот эффект может нивелироваться. С другой точки зрения, ассоциации гена *NRAMP1* с ТБ, возможно, обусловлены не его полиморфизмом, а полиморфизмом близко расположенных и тесно сцепленных с ним генов. Влияние на степень проявления ассоциации могут оказывать гетерогенность выборок и тщательность сбора клинического материала. В целом согласно результатам проведенного метаанализа ген *NRAMP1*, несомненно, влияет на подверженность ТБ [31].

Ген рецептора к витамину D (*VDR*). Около 25 лет назад установлено, что биологически активная форма витамина D, известная как регулятор кальций/фосфорного метаболизма и отвечающая за минерализацию костей, может давать эффект и на клетки иммунной системы [26]. Эффект 1,25-дигидроксивитамина D₃ (1,25(OH)₂D₃) проявляется в активации моноцитов, стимуляции клеточного звена иммунитета, супрессии пролиферации лимфоцитов, продукции иммуноглобулинов и синтеза цитокинов путем взаимодействия с рецептором к

витамину D, кодируемым геном *VDR* [11, 26]. У человека ген расположен на хромосоме 12q12—q14; известны его полиморфные варианты, ассоциированные с различными, в том числе и инфекционными, заболеваниями. Наиболее часто исследуют четыре полиморфизма этого гена: A/a, F/f, T/t, B/b, получившие название от первой буквы ферментов рестрикции, используемых для их детекции при ПДРФ-анализе (AraI, FokI, TaqI, BsmI).

Результаты исследований по поиску ассоциаций полиморфизмов гена с ТБ также весьма противоречивы с проявлениями популяционной специфики. В ходе метаанализа ассоциативных исследований полиморфизмных вариантов гена *VDR* с ТБ выявлены многочисленные ассоциации с заболеванием генотипа ff и протективная роль генотипа bb в азиатских популяциях, отсутствие ассоциаций в африканских и южноамериканских странах [25].

Ген маннозосвязывающего лектина (*MBL*). Ген размером примерно 7 kb, расположенный на длинном плече 10-й хромосомы (10q11.2), также является геном-кандидатом подверженности ТБ [37]. Белковый продукт этого гена — Са-зависимый лектин плазмы крови, принадлежащий к семейству белков, найденных у млекопитающих и птиц. Исследования *MBL* человека и грызунов выявили, что этот белок является активатором системы комплемента и, таким образом, значимым компонентом

системы врожденного иммунитета. Кроме того, он действует непосредственно как опсонин, взаимодействуя с C1q-рецептором макрофагов [27]. Недостаток MBL обычно ассоциирована с частыми повторными инфекционными заболеваниями у детей и, вероятно, предрасполагает к возникновению инфекций у взрослых [10]. Накоплены данные о том, что недостаток MBL предрасполагает и к аутоиммунным заболеваниям (системная красная волчанка, ревматоидный артрит), значительно ускоряет прогрессию СПИДа и муковисцидоза [38, 47].

Дефицит MBL обусловлен главным образом одонуклеотидными заменами 52, 54, 57-го кодонов первого экзона гена *MBL* (известными как варианты D, B и C соответственно), каждая из которых, вероятно, влияет на олигомеризацию белка [37].

Несмотря на частые случаи преждевременной смерти от инфекционных заболеваний (особенно в Африке), которые должны приводить к жесткому отбору против аллелей, проявляющихся понижением концентрации MBL и соответственно ослаблением иммунитета, их популяционная частота остается довольно высокой (до 30%), особенно у жителей Суб-Сахарной Африки [37]. Межпопуляционные различия в частотах аллелей гена *MBL* подтверждены и результатами анализа концентрации MBL в крови: у африканцев она в 2 раза ниже, чем у европейцев, и в 4 раза ниже по сравнению с эскимосами [37].

Высокие частоты мутантных вариантов MBL (особенно B и C) в африканских популяциях навели на предположение об их вероятном биологическом преимуществе. По одной из гипотез при недостаточности MBL повышается устойчивость к инфекциям, вызванным внутриклеточными паразитами, такими как микобактерии и лейшмании, которые используют опсонизацию C3b и при помощи рецептора C3 проникают в клетки хозяина, где и паразитируют [47]. Доказательством этого служит и тот факт, что для вариантных аллелей B и C выявлены ассоциации с резистентностью к ТБ, а нормальный аллель А повышает чувствительность к заболеванию [37]. Существует также предположение о том, что высокая частота мутаций, накопленных в тропических регионах, может уменьшить повреждающий эффект чрезмерной активации комплемента [47].

Гены Toll-подобных белков. В настоящее время огромный интерес для исследователей представляют гены Toll-подобных белков. При изучении иммунного ответа у насекомых, проводимого на мушке *Drosophila melanogaster*, выявлено множество новых сигнальных путей, активирующих экспрессию генов антибактериальной защиты. Один из этих механизмов включает Toll-рецепторы на поверхности клетки и компоненты пути передачи сигнала от рецепторов к клеточному ядру. Позже гомологи Toll-рецепторов были найдены у млекопитающих и названы Toll-подобные рецепторы (TLR) [30, 41]. У человека первый гомолог TLR был обнаружен в 1997 г., и к настоящему времени известно как минимум 13 их разновидностей, каждый из которых играет свою особую роль в активации врожденного иммунитета [45].

Активация белков семейства TLR микробными

лигандами приводит к запуску сложной цепи передачи сигнала, реализующейся в активации ядерного фактора транскрипции NF-κB, который в свою очередь включает транскрипцию генов провоспалительных цитокинов (*TNFα*, *IL1B*, *IFNγ* и др.), хемокинов и молекул адгезии, важных при воспалении [8, 39, 48]. Таким образом, TLR человека являются частью системы рецепции патогена и играют огромную роль во врожденном иммунитете, раннем распознавании возбудителя, включая микобактерию, провоспалительном ответе, индуцировании Th1-звена иммунитета [48].

Наибольший интерес при микобактериальной инфекции представляют гены *TLR2* и *TLR4*. *TLR4* активируется главным образом липополисахаридами, тогда как *TLR2* играет основную роль в распознавании пептидогликанов, микобактериальных липопротеинов и других компонентов бактериальной клетки [29, 48].

Доказано, что изменчивость генов *TLR2* и *TLR4* может приводить к понижению способности макрофагов активироваться в ответ на компоненты бактерий. В опытах на клеточных культурах выявлено, что *M. tuberculosis* активирует макрофаги человека через *TLR2* и *TLR4*. У мышей, нокаутированных по *TLR2*, снижается продукция фактора некроза опухоли TNFα, IL-6 и NO в ответ на грамположительные бактерии [45].

У человека выявлена связь полиморфных вариантов генов *TLR1*, *TLR2*, *TLR4* и *TLR8* с ТБ и ухудшением иммунного ответа при внедрении *M. tuberculosis* и других внутриклеточных паразитов [39, 48]. При этом не исключена и вероятная связь других рецепторов этого семейства с ТБ.

Таким образом, учитывая роль TLR в активации антимикобактериального иммунитета, полиморфизм этих генов может быть одним из значимых факторов, повышающих чувствительность к инфекционным заболеваниям.

Результаты полногеномного скрининга при ТБ

Помимо изучения генов-кандидатов подверженности к ТБ, идет поиск новых генов, вовлеченных в развитие заболевания, в том числе и с помощью полногеномного сканирования. Этот метод, с успехом применяемый в картировании генов менделирующих заболеваний, в настоящее время применяют и для поиска генов, оказывающих влияние на развитие МФЗ, в том числе инфекций.

Опубликованы результаты шести полногеномных исследований при ТБ, выполненных в различных популяциях (табл. 2).

В первом подобном исследовании ТБ изучена Гамбийская популяция [12]. На первом этапе было обнаружено 7 маркеров на хромосомах 3, 5, 6, 8, 9, 15 и X, доказавших сцепление с заболеванием (LOD > 1,0). На втором этапе было исследовано 22 маркера из этих 7 регионов, и сцепление с ТБ подтверждено для локусов 15q11—13 и Xq26: LOD составил 1,82 и 2,18 соответственно. По мнению авторов [12], генами-кандидатами на хромосоме 15 можно считать гены Р-белка и HERC2, а для локуса Xq26 — несколько генов и в первую очередь ген лиганда CD40.

Результаты полногеномного картирования генов подверженности ТБ

Популяция	Изученные выборки	Локусы, сцепленные с ТБ	LOD-балл	Источник
Гамбия	Гамбия, 67 семей с ТБ (73 sibсовы пары); КуаЗулу-Натал, 16 семей с ТБ (19 sibсовых пар)	Xq26	1,82	[2]
		15q11—13	2,18	
Бразилия	16 семей с ТБ (178 человек)	10q26.13	1,31	[35]
		11q12.3	1,85	
		20p12.1	1,78	
Марокко	96 семей с ТБ (227 sibсов)	1q22	2,00	[21]
		3q27—q28	1,93	
		8q12—q13	3,38	
		6p21—q23	1,90	
ЮАР	ЮАР, 81 семья с ТБ (131 sibсовая пара); Малави, 24 семьи (24 sibсовы пары)	20q13.31—33	2,00	[19]
Уганда	193 семьи с ТБ (803 человека)	2q21—q24**	$p < 10^{-3*}$	[44]
		5p13—q22**	$p < 10^{-3*}$	
		7p22—p21	$p < 10^{-3*}$	
		20q13	$p = 0,002^*$	
Таиланд	95 семей с ТБ (199 пациентов)	5q23.2—31.3	2,29	[34]
		17p13.3—13.1	2,57	
		20p13—12.3	3,33	

Примечание. * — расчет LOD-балла не проводили, ** — выявлено сцепление локусов с резистентностью к микобактерии, проявляющейся отрицательными кожными пробами с туберкулином.

В результате исследования, выполненного в Бразильской популяции, выявлены три хромосомных региона (10q26.13, 11q12.3, 20p12.1) также с умеренными доказательствами сцепления с ТБ (значения LOD составили соответственно 1,31, 1,85 и 1,78) [35].

После первого этапа исследования в Марокко выявлено 5 хромосомных участков (1q22, 3q27—q28, 8q12—q13, 10p15 и 19p12) с LOD > 1,17 ($p < 0,01$); в ходе второго этапа были отобраны 3 локуса, для которых значения LOD-балла были выше или близкими к 2 (1q22, 3q27—q28, 8q12—q13; см. табл. 2). При этом впервые при полногеномных исследованиях ТБ был выявлен локус (8q12—q13) с высоким значением коэффициента сцепления: LOD = 3,38, $p = 4 \cdot 10^{-5}$ [21]. В настоящее время активно ведется поиск генов-кандидатов, расположенных в этом хромосомном участке, и оценка их связи с заболеванием.

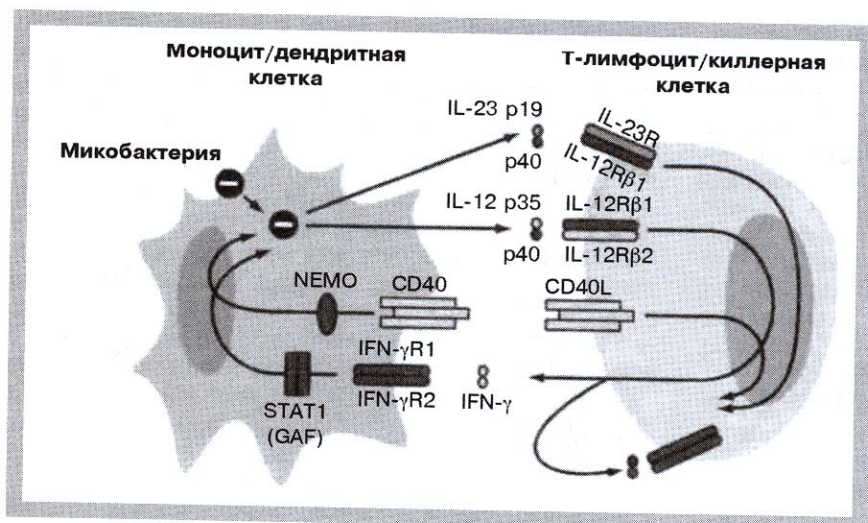
В исследовании G. Cooke и соавт. [19] сцепление с ТБ впервые выявлено для локусов на 6-й (6p21—23; LOD = 1,9, $p = 0,002$) и 20-й (20q13.31—33; LOD = 3,1, $p = 0,00008$) хромосомах. В дальнейшем авторами выполнено детальное (тонкое) картирование ассоциации в локусе 20q13.31—33 с использованием 40 SNP. Это привело к идентификации двух новых генов-кандидатов подверженности ТБ: рецептор 3 меланокортина (*MC3R*) и ген катепсина Z (*CTSZ*) [19].

В самом масштабном полногеномном исследовании ТБ изучены семьи больных ТБ из Уганды [44]. Авторы выделили для изучения три фенотипа: ТБ, подтвержденный культуральными исследованиями; резистентность к микобактерии (люди, находящиеся в длительном контакте с больными ТБ, с отрицательными кожными пробами и тестом на ИФН γ ; продукция TNF α (ключевого фактора антимикобактериального иммунитета) в ответ на стимуляцию клеточных культур растворимыми лигандами микобактерии. В ходе исследования выявлено

сцепление с резистентностью к ТБ локусов 2q21—2q24 и 5p13—5q22; с самым заболеванием обнаружена связь локуса 7p22—p21, содержащего ген *IL-6*, а также 20q13, проявившего ранее сцепление с ТБ в полногеномном исследовании G. Cooke и соавт. [19]. Кроме того, выявлен ряд ассоциаций локусов, расположенных рядом с известными генами-кандидатами подверженности ТБ: *IFN γ R2* ($p = 0,002$) и *IL12BR2* ($p = 0,006$) с продукцией TNF α , *IL1* ($p = 0,01$) и *IL12A* ($p = 0,02$) с ТБ, *SLC11A1* с резистентностью к ТБ ($p = 0,02$).

В ходе полногеномного исследования у больных ТБ из Таиланда выявлено сцепление с ТБ трех локусов (см. табл. 2). Впервые при ТБ найдено сцепление с локусом 5q23.2—31.3, содержащим множество генов цитокинов Th2-типа иммунного ответа (*IL12B*, *GM-CSF*, *IL3*, *IL4*, *IL5*, *IL13* и др.), которые также могут играть важную роль в антимикобактериальном иммунитете [34]. Ранее была выявлена связь локуса 20p13—12.3 с лепрой, заболеванием, близким по патогенезу к ТБ.

В результате проведенных полногеномных исследований выявлено лишь одно совпадение локуса, сцепленного с ТБ (20q13). Несовпадение результатов может быть проявлением генетической гетерогенности чувствительности к ТБ в различных популяциях человека. Кроме того, теоретически результатом таких систематических исследований должно быть выявление всех геномных локусов, оказывающих значительное влияние на риск развития заболевания. Однако полученные данные в большинстве случаев не подтверждают этот тезис. Например, в Гамбийской выборке методом случай—контроль выявлены ассоциации с ТБ полиморфных вариантов генов *NRAMP1* и *VDR* [10, 11]. В ходе представленного полногеномного скрининга, проведенного в этой популяции, микросателлитные маркеры, расположенные рядом с генами *NRAMP1* и *VDR*, не показали сцепления с ТБ, что может свидетельствовать об их незначительном



Белки цитокинового каскада I-го типа, обуславливающие МПМЗ [24].

вкладе в общую компоненту предрасположенности этому заболеванию, по крайней мере по сравнению с локусами, для которых было доказано сцепление [12].

Согласно расчетам для обеспечения в ходе полногеномного скрининга 80% мощности выявления аллеля чувствительности, повышающего риск развития заболевания в 2 раза и встречающегося в популяции с частотой, близкой к 50%, необходимо участие в исследовании более 2000 sibсовых пар [42]. В настоящее время в подобных исследованиях используют от 100 до 300 семей, что в основном обусловлено сложностями набора первичного материала и трудоемкостью методик. Это значительно снижает мощность проводимых исследований и частично объясняет отсутствие сцепления с маркерами, проявившими ассоциацию с ТБ в исследованиях случай—контроль [13].

Тем не менее в целом подобный современный подход наряду с имеющимися данными о полной последовательности генома человека, быстро пополняющимися базами данных SNP и картированных генов, развитием биоинформатики, позволяет идентифицировать новые гены-кандидаты на основе их геномной локализации без обязательного знания о биологическом эффекте или типе наследования этих генов.

Менделевская подверженность микобактерийным заболеваниям

Большой интерес ученых, исследующих генетику ТБ, вызывает изучение менделевской подверженности микобактерийным заболеваниям (МПМЗ), связанной с мутациями генов цитокинов. Открытие этого класса заболеваний связано с вакцинацией BCG. С момента внедрения вакцины BCG в медицинскую практику изредка фиксировали случаи осложнений после вакцинации (БЦЖиты), вплоть до развития генерализованной BCG-инфекции, не поддающиеся лечению и в большинстве случаев заканчивающиеся ранней смертью. Однако эти случаи были столь редки, что им долгое время не уделяли должного внимания. Первый официально зарегистрированный случай генерализованной ин-

фекции, вызванной непатогенными микобактериями, датирован 1956 г. во Франции. Нетипичные формы сальмонеллезной, микобактерийной, в том числе BCG, инфекции у человека, проявляли моногенный (менделевский) характер наследования. У пациентов с подобным состоянием не определялся ни первичный, ни вторичный иммунодефицит. К началу 90-х годов прошлого века было зарегистрировано уже более 100 подобных случаев, при этом заболевание развивалось при инфицировании такими непатогенными или слабопатогенными бактериями, как *M. bovis* BCG, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. avium*, *Salmonella enterica* и др. В 1994 г. с целью определения генетических основ различия в подверженности ТБ и выяснения

природы случаев инфекции, вызванных непатогенными бактериями, был применен подход кандидатных генов в выборке детей с БЦЖитами. В 1996 г. выявлен первый генетический дефект (мутация гена *IFNγR1*), реализующийся в патологический фенотип.

В настоящее время известно 6 генов, мутации в которых приводят к подобным состояниям: *IL12B* (ген субъединицы p40 ИЛ-12), *IL12RB1* (субъединицы β1 рецептора к ИЛ-12), *IFNγR1*, *IFNγR2* (кодирующие первый и второй домены рецептора к ИФН-γ), *STAT1* (сигнального трансдуктора и активатора транскрипции, ассоциированного с ИФН-γ), а также ген *IKBK* (*NEMO*) — основной модулятор NF-κB [21, 22, 40]. Мутации этих генов проявляются в ослаблении сигнала ИФН-γ — ключевого активатора антимикобактерийной активности макрофагов и следовательно имеют общий патогенетический механизм (см. рисунок).

Принципиальная роль ИЛ-12 заключается в индукции синтеза ИФН-γ — ИЛ-12 — сигнальный цитокин, секретируемый фагоцитарными и дендритными клетками, первыми встретившими возбудителя, а ИФН-γ — эффекторный цитокин, секретируемый натуральными киллерными клетками и Т-лимфоцитами, играющий ключевую роль в иммунном ответе Th1-типа, усиливающий антимикобактерийную активность макрофагов и способствующий образованию гранулемы [9, 46]. С иммунологической точки зрения образование ИФН-γ играет важнейшую роль в контроле микобактериальной и сальмонеллезной инфекций, схожих по патогенезу.

Сейчас известно более 60 мутаций генов *IL12B*, *IL12RB1*, *IFNγR1*, *IFNγR2*, *STAT1*, *IKBK*; они проявляются по аутосомному типу (за исключением X-сцепленного дефекта гена *IKBK*) с полной или частичной пенетрантностью. Предлагают выделить 12 генетически различных заболеваний (рецессивные, доминантные, полные, частичные, X-сцепленные), характеризующихся синдромом МПМЗ [40].

Сегодня в мире известно более 300 случаев МПМЗ, и все они связаны с дефектами синтеза и сигнальной функции ИФН-γ [24]. Абсолютный не-

достаток ИФН- γ R1 и ИФН- γ R2 предопределяет необратимый инфекционный процесс с ослабленным гранулемообразованием в раннем детстве, тогда как частичный недостаток ИФН- γ R1 и абсолютная нехватка ИЛ-12p40 и ИЛ12-R β 1 обуславливают курательное течение инфекции [20].

Помимо мутаций, приводящих к тяжелым нарушениям цитокинового ответа Th1-типа, известны и многочисленные полиморфизмы этих генов, проявившие ассоциации с ТБ в различных популяциях.

Заключение

На сегодняшний день нет сомнений в том, что ТБ является МФЗ и в его развитии достаточно значимую роль играют наследственные факторы. Количество выявляемых генов-кандидатов подверженности МФЗ, в том числе и ТБ, быстро растет. За последнее десятилетие достигнуты значительные успехи в расшифровке молекулярно-генетических основ патогенеза ТБ, что вселяет определенные надежды на улучшение методов борьбы с этим заболеванием. Накапливающиеся знания о генетике подверженности ТБ привели к формированию концепции о существовании своеобразного континуума подверженности ТБ от единичных генов с сильным эффектом (менделевская модель) к полигенной системе со слабым индивидуальным эффектом каждого из генов (гальтоновская модель подверженности заболеванию) [16]. Подобный взгляд на проблему генетики ТБ является новым и нуждается в развитии.

Полученные в результате таких исследований данные позволили раскрыть не известные ранее звенья патогенеза ТБ и способы противодействия макроорганизма экспансии микобактерии.

Изучение ассоциаций известных полиморфизмов генов-кандидатов с клиническим ТБ важная на сегодняшний день задача. Актуальным также является изучение функционального полиморфизма этих генов среди популяций разного этнического состава с различной частотой заболевания. Такие исследования могут способствовать более глубокому пониманию патогенетических и генетико-иммунологических процессов, лежащих в основе различия показателей заболеваемости в этих этносах. Достаточно обоснованными выглядят и перспективы практического применения подобных исследований. В первую очередь на основании результатов генотипирования лиц из группы риска возможно более точное предсказание возникновения, течения заболевания и его исхода. В дальнейшем на базе таких исследований возможна разработка более совершенных методов профилактики и генотип-специфического лечения ТБ, новых, более эффективных ДНК-вакцин и фармакологических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Поспелов Л. Е., Серова Л. Д., Маленко А. Ф. и др. Изучение связи распределения антигенов локуса HLA-DR и туберкулеза в различных популяциях // Пробл. туб. — 1987. — № 10. — С. 54-56.

2. Пузырев В. П., Никитин Д. Ю., Напалкова О. В. Ген NRAMP1: структура, функция и инфекционные болезни человека // Молекул. генетика. — 2002. — № 3. — С. 34-40.
3. Проблемы наследственности при болезнях легких / Под ред. А. Г. Хоменко. — М., 1990.
4. Туберкулез / Под ред. А. Г. Хоменко. — М., 1996.
5. Фрейлин М. Б., Ондар Э. А., Рудко А. А. и др. Семейный анализ ассоциации полиморфизма генов SLC11A1, VDR, IL12B, IL1B, IL1RA с туберкулезом у тувинцев и русских // Мед. генетика. — 2006. — Т. 5, № 10. — С. 13-15.
6. Фтизиатрия: Национальное руководство / Под ред. М. И. Перельмана. — М., 2007.
7. Abel L., Dessein A. J. The impact of host genetics on susceptibility to human infectious diseases // Curr. Opin. Immunol. — 1997. — Vol. 9. — P. 509-516.
8. Akira S., Takeda K., Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity // Nat. Immunol. — 2001. — Vol. 2, N 8. — P. 675-680.
9. Barnes P. F., Wozel B. Type 1 cytokines and the pathogenesis of tuberculosis // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2000. — Vol. 161. — P. 1773-1774.
10. Bellamy R. Genetic susceptibility to tuberculosis in human population // Thorax. — 1998. — Vol. 53. — P. 588-593.
11. Bellamy R., Ruwende C., Corrah T. et al. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene // J. Infect. Dis. — 1999. — Vol. 179. — P. 721-724.
12. Bellamy R. Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in Africans: a combined approach using a candidate gene study and a genome-wide screen // Clin. Sci. — 2000. — Vol. 98. — P. 245-250.
13. Bellamy R. Genome-wide approaches to identifying genetic factors in host susceptibility to tuberculosis // Microb. Infect. — 2006. — Vol. 8. — P. 1119-1123.
14. Brown J. S., Holden D. W. Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens // Microb. Infect. — 2002. — Vol. 4. — P. 1149-1156.
15. Buschman E., Skamene E. From Bcg/Lsh/Ity to NRAMP1: three decades of search and research // Drug Metab. Dispos. — 2001. — Vol. 29, N 4. — P. 471-473.
16. Casanova J.-L. Human genetics of infectious diseases: a unified theory // EMBO J. — 2007. — Vol. 26. — P. 915-922.
17. Cellier M., Gonovani G., Vidal S. et al. Human Natural Resistance — Associated Macrophage Protein: cDNA, cloning, chromosomal mapping, genomic organization and tissue-specific expression // J. Exp. Med. — 1994. — Vol. 180. — P. 1741-1752.
18. Cooke G. S., Hill A. V. S. Genetics of susceptibility to human infectious disease // Nat. Rev. — 2001. — Vol. 2. — P. 967-977.
19. Cooke G. S., Campbell S. J., Bennett S. et al. Mapping of a novel susceptibility locus suggests a role for MC3R and CTSZ in human tuberculosis // Am. J. Crit. Care Med. — 2008. — Vol. 178. — P. 203-207.
20. Dorman S. E., Holland S. M. Interferon- α and interleukin-12 pathway defects and human disease // Cytokine Growth Factor Rev. — 2000. — Vol. 11. — P. 321-333.
21. El Baghdadi J., Orlova M., Alter A. et al. An autosomal dominant major gene confers predisposition to pulmonary tuberculosis in adults // J. Exp. Med. — 2006. — Vol. 203, N 7. — P. 1679-1684.
22. Filipe-Santos O., Bustamante J., Haverkamp M. H. et al. X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production // J. Exp. Med. — 2006. — Vol. 203. — P. 1745-1759.
23. Forbes J. R., Gross P. Divalent-metall transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions // Trends Microbiol. — 2001. — Vol. 9, N 8. — P. 397-403.
24. Fortin A., Abel L., Casanova J. L., Gros P. Host genetics of mycobacterial diseases and men: forward genetic studies of BCG-osis and tuberculosis // Annu. Rev. Genom. Hum. Genet. — 2007. — Vol. 8. — P. 163-192.
25. Gao L., Tao Y., Zhang L., Jin Q. Vitamin D receptor genetic polymorphisms and tuberculosis: updated systematic review and meta-analysis // Int. J. Tuberc. Lung Dis. — 2010. — Vol. 14, N 1. — P. 15-23.
26. Griffin M. D., Xing N., Kumar R. Vitamin D and its analogs as regulators of immune activation and antigen presentation // Annu. Rev. Nutr. — 2003. — Vol. 23. — P. 117-145.
27. Hill A. V. S. The immunogenetics of human infectious diseases // Ann. Rev. Immunol. — 1998. — Vol. 16. — P. 593-617.

28. *Holdane J. B. S.* Disease and evolution // *Ricercha Sci.* — 1949. — Vol. 19 (suppl.). — P. 68–76.
29. *Jankovic D., Liu Z., Gause W. C.* Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways // *Trends Immunol.* — 2001. — Vol. 22, N 8. — P. 450–457.
30. *Khush R. S., Lemaitre B.* Genes that fight infection. What the *Drosophila* genome says about animal immunity // *Trends in Genetics.* — 2000. — Vol. 16, N 10. — P. 442–449.
31. *Li H. T., Zhang T. T., Zhou Y. Q.* et al. SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* — 2006. — Vol. 10, N 1. — P. 3–12.
32. *Lurie M. B., Zappasodi P., Dannenberg A. M., Weiss G. H.* On the mechanism of genetic resistance to tuberculosis and its mode of inheritance // *Am. J. Hum. Genet.* — 1952. — Vol. 4. — P. 302–314.
33. *Lynch C. J., Pierce-Chase C. H., Dubos R.* A genetic study of susceptibility to experimental tuberculosis in mice infected with mammalian tubercle bacilli // *J. Exp. Med.* — 1965. — Vol. 121. — P. 1051–1070.
34. *Mahasirimongkol S., Yanai H., Nishida N.* et al. Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais // *Genes Immun.* — 2009. — Vol. 10. — P. 77–83.
35. *Miller E. N., Jamieson S. E., Joberty C.* et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians // *Genes Immun.* — 2004. — Vol. 5, N 1. — P. 63–67.
36. *Möller M., de Wit E., Hoal E. G.* Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* — 2010. — Vol. 58. — P. 3–26.
37. *Mombo L. E., Lu C. Y., Ossary S.* et al. Mannose-binding lectin alleles in sub-Saharan Africans and relation with susceptibility to infections // *Genes Immun.* — 2003. — Vol. 4. — P. 362–367.
38. *Mullighan C. G., Marshall S. E., Welsh K. I.* Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency // *Scand. J. Immunol.* — 2000. — Vol. 51. — P. 111–122.
39. *Ogus A. C., Yoldas B., Ozdemir T.* et al. The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease // *Eur. Respir. J.* — 2004. — Vol. 23. — P. 219–223.
40. *Picard C., Casanova J. L., Abel L.* Mendelian traits that confer predisposition or resistance to specific infections in human // *Curr. Opin. Immunol.* — 2006. — Vol. 18. — P. 383–390.
41. *Qureshi S. T., Medzhitov R.* Toll-like receptors and their role in experimental models of microbial infection // *Genes Immun.* — 2003. — Vol. 4. — P. 87–94.
42. *Risch N., Merikangas K.* The future of genetic studies of complex human diseases // *Science.* — 1996. — Vol. 273. — P. 1516–1517.
43. *Smith I.* Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2003. — Vol. 16. — P. 463–496.
44. *Stein C. M., Zalwango S., Malone L. L.* Genome scan of *M. tuberculosis* infection and disease in Ugandans // *PLoS ONE.* — 2008. — Vol. 3, N 12. — P. 1–10.
45. *Takeuchi O., Akira S.* Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function // *Microb. Infect.* — 2002. — Vol. 4. — P. 887–895.
46. *Trinchieri G.* Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity // *Nat. Rev.* — 2003. — Vol. 3. — P. 133–146.
47. *Turner M. W., Dinan L., Heatley S.* et al. Restricted polymorphism of the mannose-binding lectine gene of indigenous Australian // *Hum. Mol. Genet.* — 2000. — Vol. 9, N 10. — P. 1481–1486.
48. *Yim J.-J., Ding L., Schaffer A. A.* et al. A microsatellite polymorphism in intron 2 of human Toll-like receptor 2 gene: functional implications and racial differences // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* — 2004. — Vol. 40. — P. 163–169.
49. *Zhang Y., Young D.* Molecular genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Antimicrob. Chemother.* — 1994. — Vol. 34. — P. 313–319.
50. *Zwilling B. S., Kuhn D. E., Wikoff L.* et al. Role of Iron in Nramp1-mediated inhibition of Mycobacterial Growth // *Infect. Immun.* — 1999. — Vol. 67, N 3. — P. 1386–1392.

Поступила 11.10.10

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2011

УДК 615.273.55.012

РЕЦЕПТОРЫ ТРОМБОЦИТОВ — МИШЕНЬ ДЛЯ АНТИАГРЕГАЦИОННОЙ ТЕРАПИИ

Н. Н. Белушкина¹, О. Г. Дегтярева¹, А. А. Махлай¹, Д. С. Лоторев¹, Г. В. Авраменко², И. В. Кулыгина¹, Л. А. Павлова¹

¹ГОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздравсоцразвития России; ²ГОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва

В последние годы была установлена ключевая роль тромбоцитов в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Это послужило основой для разработки новых классов пептидных лекарственных препаратов. В статье представлена структурно-функциональная характеристика основных рецепторов тромбоцитов, рассмотрены механизмы антиагрегационного действия лекарственных препаратов, основанные на взаимодействии со специфическими тромбоцитарными рецепторами. Продемонстрированы современные стратегии дизайна пептидных препаратов на основе лигандов интегриновых рецепторов — RGD-пептидов, представлена стратегия разработки оригинальных лекарственных препаратов на основе RGD-пептида, дающих выраженный антиагрегационный эффект.

Ключевые слова: рецепторы тромбоцитов, RGD-пептид, агрегация тромбоцитов, сердечно-сосудистые заболевания

PLATELET RECEPTORS - THE TARGET FOR ANTI-AGGREGATORY THERAPY. *Belushkina N. N., Degtyareva O. G., Makhlay A. A., Lotorev D. S., Avramenko G. V., Kulygina I. V., Pavlova L. A.*

In recent years the key role of platelets in the development of cardiovascular disease has been established. This served as the basis for developing new classes of peptide drugs. IN this paper the structural and functional characteristics of the main platelet receptors are presented and the mechanisms of the antiaggregatory action of drugs, based on interaction with specific platelet receptors are considered. Modern design strategies of peptide drugs based on ligands of integrin receptors - RGD-peptides are demonstrated, strategy to develop original drugs on the basis of RGD-peptide with pronounced antiaggregatory effect is presented.

Key words: platelet receptors, RGD-peptide, platelet aggregation, cardiovascular diseases.

Белушкина Н. Н. — ученый секретарь НИИ молекулярной медицины, д-р биол. наук, проф. (belushkina@mmascience.ru); Дегтярева О. Г. — лаборант-исследователь лаб. биологически активных соединений; Махлай А. А. — гл. науч. сотр. лаб. биологически активных соединений, д-р биол. наук, проф. (8-495-708-39-71); Лоторев Д. С. — лаборант-исследователь лаб. биологически активных соединений; Авраменко Г. В. — проф., д-р хим. наук, зав. каф. технологии химико-фармацевтических и косметических средств; Кулыгина И. В. — аспирант (8-499-248-66-83); Павлова Л. А. — зав. лаб. биологически активных соединений, канд. фарм. наук (8-495-708-39-71)

ISSN 1728-2918

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ

2011

3

МЕДИЦИНА

ИЗДАТЕЛЬСТВО
«МЕДИЦИНА»