
**ПОЛИМОРФИЗМ FOKI, TAQI, BSMI, APAI И CDX2 РЕЦЕПТОРА
ВИТАМИНА Д (VDR) С ВОСПРИИМЧИВОСТЬЮ
К ТУБЕРКУЛЕЗУ ЛЕГКИХ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ**

А.А. Ахметова

АО «Научный центр противомикробных препаратов»,
г. Алматы, Республика Казахстан

Резюме. Основной целью исследования была определить частоту ApaI, TaqI, FokI, BsmI и Cdx2 в казахском населении. Целью данного исследования является выявление ассоциации замен нуклеотидов в VDR гене с предрасположенностью к туберкулезу легких для популяции Казахстана. В качестве материала для исследований использовали коллекции образцов ДНК, выделенной из периферической крови больных ТБЛ и здоровых лиц первичной кроводачи. Статистическую обработку проводили с использованием критерия χ^2 . Витамин D модулирует активность моноцитов и макрофагов в организме и играет важную роль во врожденном иммунитете к некоторым инфекциям, в том числе и к *M. tuberculosis*. В проведенном мета-анализе было показано, что низкий уровень витамина D коррелирует с высоким риском развития туберкулеза. В ходе работы были выявлены статистически значимые различия по частоте аллелей и генотипов полиморфизма ApaI (rs7975232) с заболеваемостью туберкулезом у этнических казахов. Было показано, что присутствие аллеля ApaI существенно снижает риск развития туберкулеза.

Ключевые слова: ген рецептора витамина D, полиморфизм FokI, TaqI, BsmI, ApaI и Cdx2, VDR, туберкулез легких.

**POLYMORPHISM OF FOKI, TAQI, BSMI, APAI AND CDX2 RECEPTOR
VITAMIN D (VDR) WITH SUSCEPTIBILITY TO PULMONARY
TUBERCULOSIS: COMPARATIVE ANALYSIS**

A. Akhmetova

JSC "Scientific Center of Anti-Infective Drugs"
Almaty, Republic of Kazakhstan

Abstract. The main goal of the study was to determine the frequency of ApaI, TaqI, FokI, BsmI and Cdx2 in the Kazakh population. The purpose of this study is to identify the association of nucleotide substitutions in the VDR gene with a predisposition to pulmonary tuberculosis for the population of Kazakhstan. As a material for research, collections of DNA samples isolated from the peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis and healthy individuals of primary blood-grooming were used. Statistical processing was carried out using the χ^2 criterion. Vitamin D modulates the activity of monocytes and macrophages in the body and plays an important role in the innate immunity to certain infections, including *M. tuberculosis*. In a meta-analysis, it was shown that a low level of vitamin D correlates with a high risk of tuberculosis. The work revealed statistically significant differences in the frequency of alleles and genotypes of the ApaI polymorphism (rs7975232) with the incidence of tuberculosis in ethnic Kazakhs. The presence of the ApaI allele has been shown to significantly reduce the risk of developing tuberculosis.

Key words: A gene vitamin D receptor, polymorphism FokI, TaqI, BsmI, ApaI and Cdx2, VDR, pulmonary tuberculosis.

Введение. Роль полиморфизмов генома человека в формировании восприимчивости человека к туберкулезу. Восприимчивость организма человека после заражения микобактериями зависит от большого числа факторов внешней среды - от экологических, социальных и т.д. Отдельно должны рассматриваться генетические особенности индивидуумов. Поэтому вариабельность клинического течения и исходов заболевания является результатом совокупности факторов, включая наличие мутаций в генах человека, которые участвуют в регуляции иммунной защиты. Актуальным направлением является изучение ассоциативной связи между полиморфизмами генов-кандидатов и восприимчивостью организма, клинической картины и исходов заболевания.

Одним из таких генов-кандидатов является витамин D, который участвует в регуляции иммунитета посредством связывания с рецептором витамина D (*VDR*) расположенным на поверхности моноцитов, макрофагов и лимфоцитов [1,2]. Названия полиморфизмов *FokI*, *TaqI*, *ApaI*, *BsmI*, *Cdx2* гена *VDR* произошли от названия рестриктаз, специфические сайты которых содержат SNP.

Целью данного исследования является выявление ассоциации замен нуклеотидов в *VDR* гене с предрасположенностью к туберкулезу легких для популяции Казахстана.

Ген *VDR* расположен на длинном плече хромосомы 12 (12q12-14) и состоит из 10 экзонов, первые из которых не транскрибируются [3]. Ген *VDR* является кандидатным локусом восприимчивости к различным воспалительным заболеваниям пищеварительного тракта, остеопорозу и в

том числе к туберкулезу [4]. Это связано с аллельными вариациями, которые влияют на активность рецепторов и последующей витамин D-опосредованных эффектов, таких как поглощение кальция, выделение и модуляция клеточной пролиферации и дифференцировки. Изменения в способности синтезировать витамин D, в том числе полиморфизмы гена *VDR*, могут быть факторами, способствующим увеличению чувствительности к туберкулезу. Полиморфизмы в гене рецептора витамина D (*VDR*) – rs731236 *TaqI* (T/C) расположен в экзоне 9, rs7975232 *ApaI* (G/Ttransversion) и rs1544410 *BsmI* (A/Gtransition) находятся в интроне 8. Четвертый полиморфизм *FokI* (C→Ttransition), создает альтернативный старт-кодон (ATG), три кодона после стартового кодона. Генотип tt (*TaqI*) ассоциирован с уменьшением риска заболевания туберкулезом [5].

Материалы и методы

В исследование было включено 200 человек, основную группу составили 106 пациентов, в анамнезе - заболевание туберкулез легких, контрольная группа – здоровое население. Критерии включения: казахская национальность, возраст – старше 18 лет и выше, пол – мужчины и женщины, заболевание – туберкулез легких, здоровые лица. Критерии не включения: иная национальная принадлежность (кроме казахов). Все участники дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. У всех участников исследования был проведен забор венозной крови с хранением при (-20°C) до анализа. В работе использовались праймеры (олигонуклеотиды), последовательность которых приведена в таблице 1.

Таблица 1
Последовательности праймеров, использованных в работе

Генетический локус	Название праймера	Последовательность праймера, 5'-3'
FokI_rs2228570	VDR_FokI_F	F5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGGCTCT-3'
	VDR_FokI_R	R5'-ATGGAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'
BsmI_rs1544410	VDR_BsmI_F	F5'-GCATCGTCTCCCCAGGTATG-3'
	VDR_BsmI_R	R5'-ACCAGCGGAAGAGGTCAAG-3'
ApaI_rs7975232	VDR_ApaI_F	F5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3'
	VDR_ApaI_R	R5'-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAGC-3'
TaqI_rs731236	VDR_TaqI_F	F5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3'
	VDR_TaqI_R	R5'-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAGC-3'
Cdx2_rs1568820	VDR_Cdx2_G	F1: 5' -AGGATAGAGAAAATAATAGAAAACATT-3' R1: 5' -AACCCATAATAAGAAATAAGTTTTTAC-3'
	VDR_Cdx2_A	F2: 5' -TCCTGAGTAAACTAGGTCACAA-3' R2: 5' -ACGTTAAGTTCAGAAAGATTAATTC-3'

Полученные нами данные при изучении распределения частот в гене VDR у больных туберкулезом легких (далее – ТБЛ) и здоровых лиц, представлены в таблице 2. При сравнении распределений генотипов в выборках больных и здоровых лиц статистически значимых различий показало по частоте аллелей и генотипов полиморфизма *ApaI* (rs7975232) с заболеваемостью туберкулезом. Это

демонстрирует существенную ассоциацию между распространенностью аллеля А и большей устойчивостью к заболеванию туберкулезом. Следовательно, присутствие аллеля *ApaI* (rs7975232) (А) в гене VDR значительно снижает риск развития туберкулеза. Анализ выявил значимые различия распределения генотипов между этими двумя группами ($\chi^2_{\text{эмп}} = 9.24$, $p = 0,01$).

Таблица 2

Частота генотипов VDR гена (rs7975232, rs731236, rs10735810, rs1544410)
у больных ТБЛ и здоровых лиц

Генотип	Больные ТБЛ (106 образца)		Контрольная группа (94 образца)		Значение χ^2
	n	%	N	%	
VDR rs7975232 (ApaI)					
AA	10	9,4%	12	12,8%	9,24
Aa	42	39,6%	54	59,6%	
aa	54	50,9%	28	27,7%	
VDR rs 731236 (TaqI)					
TT	80	75,5%	66	70,2%	2,72
Tt	24	22,6%	22	23,4%	
tt	2	1,9%	6	6,4%	
VDR rs 2228570 (FokI)					
FF	60	56,6%	44	46,8%	2,37
Ff	32	30,2%	42	44,7%	
ff	14	13,2%	8	8,5%	
VDR rs 1544410 (BsmI)					
BB	4	3,8%	6	6,4%	0,55
Bb	26	24,5%	26	27,7%	
bb	76	71,7%	62	66,0%	
VDR rs 11568820 (Cdx2)					
GG	35	33,0%	31	33%	0,11
GA	13	12,2%	12	12,8%	
AA	4	3,8%	4	4,2%	

Выделение геномной ДНК, определение ее концентрации и чистоты. Из всех образцов венозной крови была выделена ДНК. ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови с помощью комплекта реагентов для экстракции ДНК из клинического материала «АмплиПрайм ДНК-сорб-В», Москва. Электрофорез на наличие ДНК проводили в электрофоретическом аппарате Bio Rad Electrophoreticbath при напряжении 120 V в течение 20 минут. Для электрофореза использовали 1,5 % агарозный гель в 1xTAE-буфере. Гели агарозы окрашивали бромистым этидием в концентрации 1 мг/см³ и документировали в УФ-свете на аппарате GelDocXR, BioRad, USA. Концентрацию выделенной ДНК и отношение OD₂₆₀/280 определяли на спектрофотометре Nanodrop 2000.

Real-time генотипирование образцов

проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени на амплификаторе 7900HT (Applied Biosystems) с набором Taq Man зондов на SNP маркеры – FokI/rs2228570, ApaI/rs7975232, TaqI/rs731236. ПЦР проводили в реакционной смеси (10 мкл), содержащей 5 мкл буфера, 0,25 мкл праймер зонда, и 1,5 мкл ДНК, 3,25 мкл H₂O по программе 50 °C – 2 мин, 95 °C – 10 мин, и 40 циклов по 92 °C – 15 мин, 60 °C – 1 мин.

Результаты и обсуждение

Вопросы диагностики и лечения туберкулеза по сей день являются весьма острыми и по праву данное инфекционное заболевание считается одной из серьезнейших глобальных проблем здравоохранения. По последним оценкам Всемирной организации здравоохранения ежегодно продолжает регистрироваться

более 8,6 млн. новых случаев туберкулеза и 1,3 млн. больных ежегодно умирает от туберкулеза [6]. Что особенно примечательно, что даже до открытия этиологической причины туберкулеза Робертом Кохом в 1903 году – *M. tuberculosis*, туберкулез лечили с помощью витамина D, полученного из печени трески и с помощью солнечных ванн [7, 8]. Так был проведен ряд исследований в различных популяциях, в которых было показано, что дефицит витамина D ассоциирован с повышенным риском развития туберкулеза [9, 10, 11, 12].

Известно, что витамин D модулирует активность моноцитов и макрофагов в организме и играет важную роль во врожденном иммунитете к некоторым инфекциям, в том числе и к *M. tuberculosis*. В недавно проведенном мета-анализе было показано, что низкий уровень витамина D коррелирует с высоким риском развития туберкулеза [13].

В мета-анализе проведенном Нхоахамом и Кларком суммарный эффект от витамина D был равен 0,68 (95% CI 0,43–0,93), это значит, что уровень витамина D был значительно ниже в группе пациентов с туберкулезом чем в группе контроля [13]. Тем не менее, эти данные не могут считаться окончательными, поскольку в анализе не были учтены такие важные переменные параметры как: курение и воздействие солнечного света. Также значительный интерес представляют работы по изучению 1,25-ОН₂D и тому как данный агент регулирует антимикобактериальную активность *in vitro* в моноцитах и макрофагах [14, 15]. Известно, что 1,25-ОН₂D значительно увеличивает фагоцитарный потенциал макрофагов [16], способствует образованию фаголизосомы через фосфатидилинозитол-3-киназа-опосредованный сигнальный путь, усиливает экспрессию кателицидина в макрофагах [16, 17], и защищает фаголизосому от ингибирования в макрофагах, инфицированных микобактерией [18]. Учеными также была

показана важная роль витамина D в дифференциальной модуляции синтеза цитокинов в ответ на антигены *M. tuberculosis* [19].

Необходимо отметить, что в 2005 году Льюис с соавторами провели мета-анализ, в котором оценили корреляцию легочной формы туберкулеза с наличием полиморфизмов гена *VDR FokI* (rs2228570) и *TaqI* (rs731236) [92], а в 2006 году Ян и Хань обобщили известные данные по полиморфизму *FokI* [20]. Но к сожалению, ни в одном из указанных исследований не было найдено убедительной взаимосвязи между изученными полиморфизмами гена *VDR* и легочной формой туберкулеза. Тем не менее, стоит учесть, что только шесть исследований были обобщены для каждого из полиморфизмов, которые были рассмотрены в двух мета-анализах, эти результаты не обладают необходимой научной мощностью, чтобы обнаружить даже значимый вклад в восприимчивость к туберкулезу того или иного генотипа, аналогичные работы были проведены и для мутаций *ApaI* (rs7975232) и *BsmI* (rs1544410) [21].

В результате изучения ассоциации между полиморфизмами гена *VDR* и легочной формы туберкулеза при проведении мета-анализа S.Qianetal. (2011) обнаружили связь между аллельным вариантом *FokI*, однако не выявили значимой корреляции с полиморфизмами *TaqI*, *ApaI*, *BsmI* данного гена [22]. Они установили, что рецессивный аллель – мутантная гомозигота (ff) значительно повышала риск развития легочной формы туберкулеза (в 1,39 раза) по сравнению с другими аллельными вариантами (Ff+FF) полиморфизма *FokI*. Однако полностью исключить вклад полиморфизмов *TaqI*, *ApaI*, *BsmI* гена *VDR* в формирование восприимчивости к заболеванию нельзя.

Заключение

Мы провели генетическое тестирование по пяти полиморфизмам гена *VDR* – *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* и *Cdx2* и поиск ассоциации данных полиморфизмов с заболеваемостью туберкулезом. Частоты аллелей

полиморфизма Cdx2 гена VDR у казахов определены впервые. В ходе работы были выявлены статистически значимые различия по частоте аллелей и генотипов полиморфизма ApaI (rs7975232) с заболеваемостью туберкулезом у этнических казахов. Было показано, что присутствие аллеля ApaI существенно снижает риск развития туберкулеза. Использование современных молекулярно-генетических методов, системный персонализированный подход в изучении характеристик пациента, даст возможность оценить восприимчивость к туберкулезу, возможное клиническое течение, ответ на лечение и тяжесть инфекции. Дальнейшие исследования в этом направлении, дадут возможность установить причинные связи между движущими факторами риска, определяющими бремя туберкулеза в различных географических районах внутри страны и обосновать эффективные стратегии борьбы с туберкулезом. Внедрение подходов основанных на персонализированной медицине в систему текущего эпидемиологического надзора позволит определить рациональные пути и меры борьбы с эпидемией и повышения эффективности профилактических мероприятий.

Литература

1. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study / [E. Giovannucci, Y. Liu, B.W. Hollis et al.] // *Arch Intern Med.* -2008. -T.168. -P.1174-1180.
2. Glossmann, H.H. Origin of 7-dehydrocholesterol (provitamin D) in the skin / H.H. Glossmann // *J. Invest. Dermatol.* -2010. -T. 130. -№8. -P. 2139-2141.
3. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women / [C. Gross, T.R. Eccleshall, P.J. Malloy et al.] // *J Bone Miner Res.* -1996. -T. 11(12). -P. 1850-1855.
4. Halsall, J.A. Vitamin D receptor gene polymorphisms, particularly the novel A-1012G promoter polymorphism, are associated with vitamin D3 responsiveness and nonfamilial susceptibility in psoriasis / J.A. Halsall, J.E. Osborne, J.H. Pringle // *Pharmacogenet Genomics.* -2005. -T.15(5). -P.349-355.
5. Han, J. Polymorphisms in the MTHFR and VDR genes and skin cancer risk / J. Han, G.A. Colditz, D.J. Hunter // *Carcinogenesis.* -2007. -T.28. -P.390-397.
6. World Health Organization. Global tuberculosis report 2013. WHO Report 2013. Geneva: World Health Organization, 2013.
7. Schlingmann, K.P. Mutations in CYP24A1 and idiopathic infantile hypercalcemia / K.P. Schlingmann, M. Kaufmann, S. Weber // *N Engl J Med.* -2011. -T.365. -P. 410-421.
8. Wolf, M. Vitamin D in patients with renal failure: a summary of observational mortality studies and steps moving forward / M. Wolf, R. Thadhani // *J Steroid Biochem Mol Biol.* -2007. -T.103. -P.487-490.
9. Nuclear vitamin D receptor: natural ligands, molecular structure-function, and transcriptional control of vital genes / [M.R. Haussler, G.K. Whitfield, C.A. Haussler et al.] // *Academic Press.* -2011. -T.11. -P.137-170.
10. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and nephrolithiasis / [M. Ruggiero, S. Pacini, M. Amato et al.] // *Miner Electrolyte Metab.* -1999. -T. 25 (3). -P.185-190.
11. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol / [M. Teng, M. Wolf, E. Lowrie et al.] // *N Engl J Med.* -2003. -T.349. -P.446-456.
12. Wacker, M. Vitamin D - effects on skeletal and extraskelatal health and the need for supplementation / M. Wacker, M.F. Holick // *Nutrients.* -2013. -T. 5. -№1. -P. 111-148.
13. Nnoaham, K.E. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis / K.E. Nnoaham, A. Clarke // *Int. J. Epidemiol.* -2008. -T. 37. -№1. -P. 113-119.

-
14. Crowle, A.J. Inhibition by 1,25(OH)₂-vitamin D₃ of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages / A.J. Crowle, E.J. Ross, M.H. May // *Infect. Immun.* -1987. -T. 55. -№12. -P. 2945–2950.
 15. 1 α ,25-Dihydroxy-3-epi-vitamin D₃, a natural metabolite of 1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃: production and biological activity studies in pulmonary alveolar type II cells / [V.K. Rehan et al.] // *Mol. Genet. Metab.* -2002. -T. 76. -№1. -P. 46–56.
 16. Strong associations of 25-hydroxyvitamin D concentrations with all-cause, cardiovascular, cancer, and respiratory disease mortality in a large cohort study / [B. Schöttker et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* -2013. -T. 97. -№4. -P. 782–793.
 17. Кателицидины, витамин D и туберкулез / [И.В. Беляева и др.] // *Вестник Санкт-Петербургского университета.* -2013. -№3. -С. 3–18.
 18. Hmama, Z. Quantitative analysis of phagolysosome fusion in intact cells: inhibition by mycobacterial lipoarabinomannan and rescue by an 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-phosphoinositide 3-kinase pathway / Z. Hmama, K. Sendide, A. Talal // *J Cell Sci.* -2004. -T.117. -P.2131–2140.
 19. 1 α ,25 Dihydroxyvitamin D₃ modulated cytokine response in pulmonary tuberculosis / [M. Vidyarani et al.] // *Cytokine.* -2007. -T. 40. -№2. -P. 128–134.
 20. Yang, B.F. Meta-analysis of relationship of vitamin D receptor polymorphism and tuberculosis / B.F. Yang, C.L. Han // *China Trop. Med.* -2006. -T. 6. -P. 1347–1349.
 21. Gao, L. Vitamin D receptor genetic polymorphisms and tuberculosis: updated systematic review and meta-analysis / L. Gao, Y. Tao, L. Zhang // *Int J Tuberc Lung Dis.* -2010. -T. 14(1). -P. 15-23.
 22. Joshi, L. Serum vitamin D levels and VDR polymorphisms (BsmI and FokI) in patients and their household contacts susceptible to tuberculosis / L. Joshi, M. Ponnana, S.R. Penmetsa // *Scand J Immunol.* -2014. -T.79(2). -P.113-119.