

УДК 616.216.3-002.2:575

С. А. Левицька
Л. П. Сидорчук
В. В. Костенко

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці

ПОЛІМОРФІЗМ С-590Т ГЕНА ІНТЕРЛЕЙКІНУ 4 У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ ЗАПАЛЬНІ ПРОЦЕСИ БІЛЯНОСОВИХ ПАЗУХ

Ключові слова: генетичний
поліморфізм, інтерлейкін-4,
хронічний синусит.

Резюме. Проведене дослідження однонуклеотидного С-590Т поліморфізму гена інтерлейкіну-4 у 48 хворих на хронічний гнійний синусит, 52 хворих на хронічний поліпозний синусит і 35 здорових осіб. Для хронічного запального процесу біляносових пазух характерними виявилися переважання гетерозиготного СТ варіанту, збільшення частоти зустрічання гомозигот по мутантному Т-алелю при зниженні відсотка СС-гомозигот. Найбільша частота виявлення поліморфного Т-алелю - 53,13%, ТТ-генотипу - 14,58%, та гетерозигот виявлених серед хворих на хронічний поліпозний синусит.

Вступ

Хронічні запальні захворювання біляносових пазух (БНП) – одна серед найбільш частих респіраторних патологій із можливою генетичною детермінантою розвитку [18].

В основі генетично обумовленої схильності до розвитку хронічних запальних процесів БНП може бути мутація генів, що кодують компоненти імунної відповіді [12]. У чисельних дослідженнях останнього десятиріччя продемонстрована залежність імунної відповіді від алельного поліморфізму генів цитокінів. Результатом таких робіт *in vitro* є виявлення окремих алелів генів, асоційованих із підвищеною або зниженою продукцією відповідного цитокіну [2, 4, 17], що може впливати на перебіг захворювання і розвиток ряду ускладнень. Отримані дані дозволяють допустити, що поліморфні гени цитокінів беруть активну участь у формуванні специфічної імунної відповіді.

Однак, залишається незрозумілим, які саме мутації та яких цитокінів мають вирішальне значення в розвитку хронічних синуситів [13].

Важливу роль у взаємодії клітинних і гуморальних факторів імунних і запальних реакцій грає інтерлейкін-4 (IL-4) [9]. Саме продукція цього цитокіну лімфоцитами Th2 типу забезпечує активацію антигенрозпізнавальних властивостей клітин імунної системи, а також інтенсивну продукцію імуноглобулінів, перш за все IgE.

Мета дослідження

Вивчення однонуклеотидного С-590Т поліморфізму гена IL-4 у хворих на різні форми хронічних синуситів.

Матеріал і методи

Поліморфізм гена IL-4 вивчений у 135 осіб, об'єднаних у три групи спостереження. Першу групу (48 осіб) склали хворі на хронічний гнійний синусит (ХГС), другу (52 хворих) – хворі на хронічний поліпозний синусит (ХПС). Третя, контрольна група, складалася з 35 практично здорових осіб.

Матеріалом для молекулярно-генетичного дослідження була ДНК, виділена з лімфоцитів периферійної венозної крові пацієнтів за допомогою набору реагентів «ДНК-сорб-В». ПЛР-реакцію проводили із використанням Taq-ДНК-полімерази та специфічних праймерів (forward - 5'-TAA ACT TGG GAG AAC ATG GT і reverse 5'-TGG GGAAG ATA GAG TAA TA). Ампліфікатор програмували відповідно до температурних режимів приєднання праймерів (відпалювання) до одностричкових ланцюгів ДНК [19]. Ампліфікація включала «денатурацію» ДНК при t 93°C протягом 5 хвилин із наступними 36 циклами «відпалювання» по 3 хвилини кожен: 93°C – 1 хвилина, приєднання праймерів при t 48°C. Заключний етап «елонгації» (нарощування в довжину фрагмента ДНК) виконували в присутності термостабільної Taq-полімерази на матриці з приєднаними до неї праймерами при t 72°C 3 хвилини 1 цикл. Отримали продукт ампліфікації довжиною 195bp від 562-ї до 756-ї пари нуклеотидів промоторної ділянки гена IL-4. Дискримінацію алелей проводили за допомогою специфічної ендонуклеази рестрикції AVAII («Fermentas®», Литва) у реакції гідролізу при температурі 37°C протягом 16 годин (місце рестрикції - 5'...G↓GA(orT)CC...3'; 3'...CCT(orA)G↑G...5'). Рестрикційні продукти ПЛР розділяли за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі у присутності трис-боратного буфе-

Таблиця 1

Частоти алелів С і Т С-590Т поліморфізму гена ІІ-4

Групи спостереження	К-сть спостережень	С-алель	Т-алель	Статистична обробка
Перша (ХГС)	48	68(65,38%)	36(34,62%)	$\chi^2_{1-2}=6,96$; $p<0,01$
Друга (ХПС)	52	45(46,88%)	51(53,13%)	$\chi^2_{2-3}=13,92$; $p<0,001$
Контрольна	35	53(75,71%)	17(24,29%)	$\chi^2_{1-3}=2,11$; $p>0,05$

Таблиця 2

Расові та популяційні відмінності зустрічання Т-алелі

№пп	Раса	Країна	Частка мутантної Т-алелі
1.	європеїдна	Канада	16,9% [21]
		США	15,8% [6]
		Чехія	27,5% [11]
		Іран	28% [16]
2.	монголоїдна	Канада	79,5% [21]
3.	екваторіальна	США	46,7% [6]
		Бразилія	24,5% [15]

Таблиця 3

Частоти генотипів С-590Т поліморфізму гена ІІ-4

Групи	Генотип			H ₀	H _E	D	χ^2	P
	СС	СТ	ТТ					
Перша(ХГС)	20(38,46%)	28(53,85%)	4(7,69%)	0,54	0,46	-0,19	1,28	0,26
Друга (ХПС)	4(8,33%)	37(77,08%)	7(14,58%)	0,77	0,50	-0,55	15,73	0,00
Контрольна	19(54,29%)	15(42,86%)	1(2,85%)	0,43	0,36	-0,18	1,03	0,31
Всього	43(31,85%)	80(59,26%)	12(8,89%)	0,59	0,47	-1,44	2,89	0,09

Примітка. H₀ – фактична гетерозиготність, H_E – очікувана гетерозиготність, D – індекс фіксації Райта

Таблиця 4

Особливості генотипів С-590Т поліморфізму гена ІІ-4 хворих на хронічні захворювання дихальних шляхів різних популяцій

№ пп	Країна	Особливості генотипу
1	Корея	ТТ-варіант асоціював з протективним механізмом щодо розвитку ХПС [20], домінуючий генотип - монозиготний ТТ варіант – 50,82% [14].
2	Канада	Т-алель асоціювала з розвитком алергічного риніту [21]
3	Великобританія	Т-алель асоціювала з розвитком бронхіальної астми та атопії [7]
4	Іран	СС-генотип асоціював з бронхіальною астмою та атопією [8]

ра (ТТБ), концентрованою з бромідом етидію, 30-45 хвилин: розрізняли «мутантну» AVAII-резистентну Т-алель та «дику» С-алель [10]. Фрагменти візуалізували за допомогою транслюмінатора в присутності маркера молекулярних мас 100-1000 bp («СибЭнзим», Росія).

Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми «Statistica 6» [5]. Визначали відповідність розподілу генотипів рівновазі Харді-Вайнберга за критерієм χ^2 [1]; рівень гетерозиготності – за величиною індексу фіксації Райта [3].

Обговорення результатів дослідження

Встановлено, що «дикий» алель зустрічався в більшості досліджуваних (таблиця 1): у 61,5%

(n=166) випадків з 270 виділених алелів в 590 позиції промотора гена ІІ-4 був цитозин (С), тоді як патологічний «мутантний» Т-варіант ідентифікували в 38,5%(n=104) випадках.

Характерним для контрольної групи було переважання С-алелю – 75,7% (n=53). Отримані частоти зустрічання С- і Т-алелів відповідають характеру розподілу алелів цього гена для європейських популяцій (таблиця 2), в той час як для представників монголоїдної раси характерним є домінування Т-алелю (79,5%).

У групі хворих на хронічні гнійні запалення БНП, так і в групі з поліпозним ураженням БНП, відсоток зустрічання поліморфного Т-алелю вірогідно збільшувався і становив 34,6%(n=36) і 53,1% (n=51) відповідно (табл.1).

Розподіл генотипів за поліморфним варіантом С-590Т гена ІІ-4 серед досліджуваних відповідає очікуваному при рівновазі Харді-Вайнберга (табл. 3). При аналізі окремих груп дослідження виявлено переважання гетерозиготного СТ варіанту як у контрольній вибірці – 42,86%(n=15) осіб, так і в групах хворих на ХГС – 53,85%(n=28) і ХПС – 77,08%(n=37) (табл. 3). Частка СТ гетерозигот є вірогідно більшою серед хворих на поліпозне враження БНП порівняно із практично здоровими особами та хворими на хронічний запальний процес БНП без утворення поліпів.

Розповсюдження гомозиготного варіанту сприятливого «дикого» С-алеля в хворих обох дослідних груп знижено порівняно з контролем, із мінімальною частотою у хворих на поліпи БНП – 8,33%(n=4).

У хворих на ХГС і ХПС в декілька разів зростає частота знаходження гомозигот за мутантним Т-алелем – 7,69%(n=4) у першій групі та 14,58%(n=7) у другій групі відповідно). Цікавим є те, що розповсюдження гомозиготного варіанту СС у пацієнтів із ХПС у декілька разів менше і складає 8,33%(n=4), що навіть нижче, ніж частота «мутантних» гомозигот ТТ – 14,58%(n=7).

У групі хворих на ХГС, а також у контрольній групі, розподіл частот генотипів за поліморфним варіантом С-590Т гена ІІ-4 відповідає очікуваному при рівновазі Харді-Вайнберга (табл. 3), хоча у хворих як першої, так і контрольної груп відмічена тенденція до збільшення рівня гетерозиготності ($p>0,05$). Статистично значиме збільшення фактичної гетерозиготності відмічене для хворих із поліпозною формою враження хронічних запальних процесів БНП ($p<0,05$).

Аналіз літературних повідомлень щодо особливостей розподілу генотипічних варіантів С-590Т поліморфізму гена ІІ-4 при хронічних захворюваннях дихальних шляхів виявив як співпадіння з отриманими даними, так і абсолютно протилежні закономірності (таблиця 4). Виявлені факти можна пояснити етнічними особливостями розподілу варіантів генотипу та фрагментарністю отриманих даних, які потребують подальшого вивчення та систематизації.

Таким чином, отримані дані дозволяють припустити, що С-590Т поліморфізм гена ІІ-4 має прогностичне значення для виявлення схильності до розвитку хронічного поліпозного синуситу.

Висновки

1. Частота зустрічання С- і Т-алелей С-590Т поліморфізму промоторної зони гена ІІ-4 відповідають розподілу для європеїдних популяцій із переважанням сприятливого «дикого» С-алеля.

2. У хворих на хронічні запальні процеси біляносових пазух переважає частота зустрічання гетерозиготного СТ генотипу – 65% та гомозиготного мутантного Т-алеля – 11%, при зниженні частки СС-гомозигот – 24%.

3. Групою ризику розвитку хронічного поліпозного синуситу є носії Т-алеля С-590Т поліморфізму гена ІІ-4: у хворих на хронічний поліпозний синусит частіше виявляли носійство патологічного Т-алеля – 53,13% і ТТ-генотипу – 14,58%, із вірогідною меншою кількістю носіїв С-алеля.

Перспективи подальших досліджень.

Провести аналіз змін клінічно-фенотипічних та лабораторно-діагностичних показників у хворих на хронічні запальні процеси біляносових пазух залежно від С-590Т поліморфізму гена ІІ-4.

Література. 1. *Лепендіна І.Н.* Генотипи населення Белгородської області. Распределение иммунобиохимических маркеров генов / И.Н.Лепендина, Е.В.Балановская, М.И.Чурносков // Генетика. – 2008. – Т.44, №3. – С.1-15. 2. *Сенников С.В.* Методы исследования системы цитокинов / С.В.Сенников, А.Н.Силков / В кн: Система цитокинов: теоретические и клинические аспекты / Под ред. В.А. Козлова, С.В. Сенникова. -Новосибирск. – Наука, 2004. – С.311 – 321. 3. *Спицын В.А.* Возможная связь между уровнем гетерозиготности по биохимическим маркерам генов у больных с легочной патологией / В.А.Спицын, Р.К.Агапова, Э.В.Цыпикова и др. // Генетика. – 1996. – Т.22, №7. – С.990-995. 4. *Тарасова Г.Д.* Влияние типа зиготности близнецов на распространенность ЛОР патологии / Г.Д.Тарасова, А.С.Юнусов, Л.А.Ларина // Рос. оторинолар. - 2006. - № 6 (25). – С.6 – 9. 5. *Халафян А.А.* Statistica 6. Статистический анализ данных. 3-е изд. Учебник / Халафян А.А. – М.: ООО «Бином-Пресс», 2007. – 512 с., ил. 6. Barnes K.C. African Americans with Asthma / K.C.Barnes, A.V.Grant, N.N.Hansel, P.G.Dunston, G.M.Dunston // The American Thoracic Society. – 2007. – Vol.4. – P.58-68. 7. *Begh B.* Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population / B.Begh, S.Barton, S.Rorke et al. // Clin Exp Allergy. – 2003. – Vol.33(8). – P.1111-1117. 8. *Hosseini-Farahabadi S.* Association between the polymorphisms of IL-4 gene promoter (-590C>T), IL-13 coding region (R130Q) and IL-16 gene promoter (-295T>C) and allergic asthma / S.Hosseini-Farahabadi, J.Tavakkol-Afshari, H.Rafatpanah // Iran.J.Allergy Asthma Immunol. – 2007. – Vol.6(1). – P.9-14. 9. *Jung T.* Interleukin-4 and interleukin-5 are rarely coexpressed by human T cells/ T.Jung, U.Schauer, K.Rieger [et al.] // Eur. J. Immunol. – 1995. – Vol. 25. – P.2413-241. 10. *Kamali-Sarvestani E.* Cytokine Gene Polymorphism in BCG Lymphadenopathy / E.Kamali-Sarvestani, B.Ghaheri-Fard, A.Alborzi // IJMS. – 2002. – Vol.27, №3. – P.125-130. 11. *Kubistova Z.* Distribution of 22 cytokin gene polymorphisms in the healthy Czech population // Z.Kubistova, F.Mrazek, Z.Tudos [et al.] // International Journal of Immunogenetics. – 2006. – Vol.33. – P.261-267. 12. *Liu Z.* Expression profiles in human nasal polyp tissues studied by means of DNA microarray / Z.Liu, J.Kim, J.P.Sypek, I.M.Wang, H.Horton, F.G.Oppenheim, B.S.Bochner // J.Allergy Clin. Immunol. – 2004. - Vol.114, №4. – P.783-790. 13. *Otto B.A.* The role of cytokines in chronic rhinosinusitis with nasal polyps / B.A.Otto, S.E.Wenzel // Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg. – 2008. - Vol.16, №3. – P.270-274. 14. *Park S.K.* Expression of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in nasal polyps associated with interleukin-4 promoter polymorphism -590 / S.K.Park, K.W.Heo, H.Jung, S.S.Yea, Y.I.Yang // Otolaryngol Head Neck Surg. – 2006. – Vol.135(6). – P.928-932. 15. *Quirico-Santos T.* Study of polymorphisms in the interleukin-4 and IL-4 receptor genes in a population of

Brazilian patients with multiple sclerosis / T.Quirico-Santos, V.Suppiah, S.Heggarty, R.Caetano, S.Alves-Leon, K.Vandenbroeck // *Arq. Neuro-Psiquiatr.* – 2007. – Vol.65(1). – P.67-73. 16. Rasouli M. Association of interferon-gamma and interleukin-4 gene polymorphisms with susceptibility to brucellosis in Iranian patients / M.Rasouli, S.Kiany // *Cytokine.* – 2007. – Vol.38. – P.49-53. 17. Rudack C. Cytokines in nasal polyposis, acute and chronic sinusitis / C.Rudack, N.Stoll, C.Bachert // *Am. J. Rhinol.* - 1998. - V.12. - №6. - P.383-388. 18. Tewfik M.A. Genetics of chronic rhinosinusitis: a primer / M.A.Tewfik, Y.Bossy, H.Al-Shemari, M.Desrosiers // *J. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* - 2010. – Vol.39, №1. – P.62-68. 19. Walley A.J. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for association with asthma and atopy / A.J.Walley, W.O.C.M.Cookson // *J. Med. Genet.* – 1996. – Vol.33. – P.689-692. 20. Yea S.S. Interleukin-4 C-590T polymorphism is associated with protection against nasal polyps in a Korean population / S.S.Yea, Y.I.Yang, S.K.Park et al // *Am.J.Rhinol.* – 2006. – Vol.20(5). – P.550-553. 21. Zhu S. polymorphism of the IL-4, TNF- α , and Fc γ R2II Genes and the Risk of Allergic Disorders in At-Risk Infants / S.Zhu, M.Chan-Yeung, A.B.Becker et al. // *Am.J.Respir.Care Med.* – 2000. – Vol.161(5). – P.1655-1659.

**ПОЛИМОРФИЗМ C-590T ГЕНА
ИНТЕРЛЕЙКИНА 4 У БОЛЬНЫХ
С ХРОНИЧЕСКИМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ
ПРОЦЕССАМИ В ОКОЛОНОСОВЫХ ПАЗУХАХ**

С. А. Левицкая, Л. П. Сидорчук, В. В. Костенко

Резюме. Проведено исследование однонуклеотидного C-590T полиморфизма гена интерлейкина-4 у 48 больных с хроническим гнойным синуситом, 52 больных с хроническим полипозным синуситом и 35 здоровых пациентов. Для хронического воспалительного процесса околоносовых пазух характерными оказались преобладание гетерозиготно-

го СТ варианта, увеличение частоты гомозигот по мутантному Т-аллелю при снижении количества СС-гомозигот. Наибольшая частота выявляемости полиморфного Т-аллеля - 53,13%, ТТ-генотипа - 14,58% и гетерозигот выявлена среди больных хроническим полипозным синуситом.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, интерлейкин 4, хронический синусит.

**THE C-590T POLYMORPHISM OF THE
INTERLEUKIN 4 GENE OF PATIENTS WITH
CHRONIC INFLAMMATORY PROCESSES OF THE
PARANASAL SINUSES**

S. A. Levytska, L. P. Sydorчук, V. I. Kostenko

Abstract. An analysis of the single nucleotide C-590T polymorphism of interleukin 4 gene was carried out in 48 patients with chronic purulent sinusitis, 52 patients with chronic polypous sinusitis and 35 healthy patients. The prevalence of heterozygote variant, the increase of frequency of T-homozygote and decrease of frequency of C-homozygote were revealed in patients with chronic inflammatory processes of paranasal sinuses. The maximum percent of T-allele (53,13%), TT-homozygote (14,58%) and heterozygote were revealed in patients with chronic polypous sinusitis.

Key words: genes polymorphism, interleukin 4, chronic sinusitis.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2011. - Vol.10, №2 (36).-P.51-54.

Надійшла до редакції 24.05.2011

Рецензент – проф. Л. Я. Федонюк

© С. А. Левицкая, Л. П. Сидорчук, В. В. Костенко, 2011