

УДК 616.216.3-002.2:616.15:575

С.А.Левицька

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці**ВПЛИВ ПОЛІМОРФІЗМУ С-590Т ГЕНА
ІНТЕРЛЕЙКІНУ-4 НА ПРОДУКЦІЮ
ІНТЕРЛЕЙКІНУ-4 У ХВОРИХ НА
ХРОНІЧНІ ЗАПАЛЬНІ ПРОЦЕСИ
БІЛЯНОСОВИХ ПАЗУХ****Ключові слова:** генетичний
поліморфізм С-590Т, інтерлейкін
4, хронічний синусит.**Резюме.** Проведене дослідження впливу простого однонуклеотидного поліморфізму гена ІЛ-4 С-590Т на продукцію ІЛ-4 у 48 хворих на хронічний гнійний синусит, 52 хворих на хронічний поліпозний синусит і 35 здорових осіб. Встановлено, що збільшення продукції ІЛ-4, виявлене при хронічному гнійному і хронічному поліпозному синуситах, може бути зумовлене однонуклеотидною заміною в промоторній зоні гена ІЛ-4. Наявність «мутантної» Т-алелі С-590Т поліморфізму гена ІЛ-4 асоціює із збільшенням продукції відповідного цитокіну. Частота гомозиготного ТТ генотипу С-590Т найвища серед хворих на хронічний поліпозний полісинусит. СС-генотип С-590Т поліморфізму гена ІЛ-4 може бути протективним фактором щодо розвитку хронічного синуситу.**Вступ**

На сучасному етапі розвитку оториноларингології суттєва роль в розвитку хронічних запальних процесів біляносових пазух (БНП) відводиться дефектам імунного захисту слизової оболонки [2]. В наукових дослідженнях останнього десятиріччя продемонстрована залежність імунної відповіді від алельного поліморфізму генів цитокінів. Результатом таких робіт *in vitro* є виявлення окремих алелів генів, асоційованих з підвищеною або зниженою продукцією відповідного цитокіну [2,8], що може впливати на перебіг захворювання. Отримані дані дозволяють допустити, що поліморфні гени цитокінів беруть активну участь у формуванні специфічної імунної відповіді на патологічні стани людини.

Важливу роль у взаємодії клітинних і гуморальних факторів імунних і запальних реакцій грає інтерлейкін-4 (ІЛ-4) – один з основних прозапальних цитокінів та біохімічних маркерів Т-хелпер-2-асоційованого запалення [6]. Генетичною детермінантою розвитку хронічних синуситів може бути поліморфізм промоторної ділянки ІЛ-4 [9].

Мета дослідження

Вивчити вплив простого однонуклеотидного поліморфізму С-590Т гена ІЛ-4 на продукцію ІЛ-4 лімфоцитами периферійної крові хворих за різних форм хронічних синуситів.

Матеріал і методи

Поліморфізм гена ІЛ-4 та концентрація ІЛ-4 в сироватці венозної крові вивчені в 135 осіб, об'єднаних у три групи спостереження. Першу групу (52 пацієнти) склали хворі на хронічний

гнійний синусит (ХГС), другу (48 осіб) – хворі на хронічний поліпозний синусит (ХПС). Третя, контрольна група, складалася з 35 практично здорових осіб.

Матеріалом для імунологічного дослідження була сироватка крові. Концентрацію ІЛ-4 визначали за допомогою діагностичної тест-системи (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург, Росія) методом твердофазного імуоферментного аналізу.

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 Таq-ДНК-полімерази та специфічних праймерів (forward - 5'-TAA ACT TGG GAG AAC ATG GT і reverse 5'-TGG GGA AAG ATA GAG TAA TA). Ампліфікатор програмували відповідно до температурних режимів приєднання праймерів (відпалювання) до однострочкових ланцюгів ДНК [10]. 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 Таq-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 по моторній ділянці гена ІЛ-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'...CCCT(orA)G↑G...5'). Рестрикційні продукти ПЛР розділяли за допомогою електрофорезу у 2% агарозному гелі в присутності трис-боратного буфера (ТТБ), концентрованого з бромідом етидію, 30-45 хвилин: розрізняли «мутантну» AVAII-резистентну Т-алель та «дику» С-алель [7]. Фрагменти візуалізували за допомогою транслюмінатора у присутності маркера молекулярних мас 100-1000 бр («СибЭнзим», Росія).

Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми «Statistica 6» із врахуванням критеріїв Стюдента (t) і непараметричного χ^2 [5]. Нормальність розподілу величин перевіряли за допомогою W-критерію Shapiro-Wilk, гомогенність дисперсій - за допомогою теста Левена (tL) [3]. Ідентифікацію досліджуваного показника як маркера ризику оцінювали методами клінічної епідеміології за результатами обчислення відношення шансів (OR) [4].

Обговорення результатів дослідження

У результаті молекулярно-генетичного аналізу 135 хворих виявлено 43(31,85%) гомозиготи за «диким» С-алелем, 80(59,26%) гетерозигот і 12(8,89%) гомозигот за «мутантним» Т-алелем (табл. 1).

Згідно отриманих даних, для поліморфізму С-590Т переважаючим генотипом був гетерозиготний СТ, доля якого становила 59,26%. Це відповідає характеру розподілу алелів цього гена для європеїдних популяцій, де також домінуючим є гетерозиготний варіант [1]. У той же час обидва гомозиготні варіанти зустрічалися значно рідше. Доля гомозиготного генотипу за «диким» алелем СС становила 31,85%, доля «мутантних» ТТ-гомозигот – 8,89%.

При дослідженні асоціації між продукцією ІЛ-4 лімфоцитами периферійної крові та генетичним поліморфізмом С-590Т гена ІЛ-4 встановлено, що продукція цитокіну при гетерозиготному генотипі була вірогідно вищою ($t=5,68$; $p<0,01$; $tL=7,90$) в порівнянні із гомозиготами за «диким» С-алелем (табл. 1). Так само

вищим був вміст ІЛ-4 при гомозиготному варіанті ТТ ($t=5,93$; $p<0,001$; $tL=4,09$). В той же час статистично значимої різниці між продукцією цитокіну гомозиготами за мінорним Т-алелем і гетерозиготами виявлено не було ($t=1,99$; $p=0,05$; $tL=0,12$).

Таким чином, наявність тімінового нуклеотиду в 590 позиції промоторної зони гена ІЛ-4 асоціювала із збільшенням продукції відповідного цитокіну лімфоцитами периферійної крові.

Серед хворих першої групи переважали гетерозиготи СТ генетичного поліморфізму С-590Т (50%), в той же час частка гомозиготного СС варіанта була також значною і склала 41,67% (табл. 2). Гомозиготи за мутантним Т-алелем виявлені у 8,33% випадків.

Дослідження вмісту ІЛ-4 та генетичного поліморфізму С-590Т промоторної зони гена ІЛ-4 серед хворих на ХГС показало, що найвищий рівень продукції характерний для гомозиготного мінорного ТТ генотипу (табл. 2), найменший – для гомозигот за СС-варіантом. Проте, вірогідна різниця в рівнях продукції ІЛ-4 виявлена тільки між обома гомозиготними варіантами ($p<0,05$).

Така сама закономірність виявлена серед хворих на поліпозну форму ураження БНП (табл.2). Вірогідно більший рівень продукції ІЛ-4 зафіксований у гомозигот за «мутантним» Т-алелем ($p<0,05$) в порівнянні із гомозиготним СС варіантом. Водночас аналіз розповсюдження поліморфних варіантів генотипу засвідчив збільшення відсотку гетерозигот (78,85%) і ТТ гомозигот (13,46%) при зменшенні частоти виявлення гомозиготного СС варіанту (до 7,69%).

Домінуючим поліморфним варіантом генотипу серед пацієнтів контрольної групи був гомозиготний СС(54,29%), рідше виявляли гетерозиготний СТ варіант (42,86%) (табл. 2). Гомозиготний варіант за мінорним Т-алелем виявлений в одному випадку.

Статистично значиме збільшення концентрації ІЛ-4 в сироватці периферійної венозної крові виявилось характерним для гетерозиготного варіанту генотипу в пацієнтів контрольної групи в порівнянні з СС-гомозиготним генотипом

Таблиця 1

Вміст ІЛ-4 в сироватці крові пацієнтів з різними типами генотипу

Група дослідження	ІЛ-4 (пг/мл) (M±m)	σ	WSW
СС (n=43)	46,03±1,37	8,99	0,96
СТ (n=80)	58,07±1,37	12,22	0,97
ТТ (n=12)	65,73±3,98	13,80	0,92

Примітка: М – середнє арифметичне, m – стандартна похибка середнього, σ – стандартне відхилення, WSW – W-критерій Shapiro-Wilk

Таблиця 2

Вміст ІЛ-4 в сироватці крові в залежності від захворювання і генотипу

Показник	Генотип	Кількість хворих	ІЛ-4 (пг/мл) (M±m)	Статистична обробка
Перша група (n=48)	CC	20 (41,67%)	48,38±1,25	p(CC-CT)>0,05
	CT	24 (50%)	51,78±1,86	p(CC-TT)<0,05
	TT	4 (8,33%)	56,25±4,93	p(CT-TT)>0,05
Друга група (n=52)	CC	4 (7,69%)	54,08±4,64	p(CC-CT)>0,05
	CT	41 (78,85%)	64,68±1,84	p(CC-TT)<0,05
	TT	7 (13,46%)	72,13±5,14	p(CT-TT)>0,05
Контрольна група (n=35)	CC	19 (54,29%)	41,86±2,32	p(CC-CT)<0,05
	CT	15 (42,86%)	50,03±1,73	
	TT	1 (2,85%)	58,80	

Примітка: M – середнє арифметичне, m – стандартна похибка середнього

Таблиця 3

Показники імуногенетичного дослідження як маркери ризику розвитку хронічних запальних процесів БНП

Показник	OR	Log V	Довірчі інтервали
Наявність CC-генотипу	0,27	0,16	0,12 – 0,60
Наявність TT- генотипу	5,08	1,12	19,30 – 34,28
Наявність «мутантної» T-алелі	2,40	0,1	1,27 – 4,57

Примітка: OR – відношення шансів; Log V – логарифм дисперсії відношення шансів.

(p<0,05) (табл. 2). Невелика частота виявлення гомозиготного мінорного варіанту TT (1 випадок) не дозволила зробити статистично обґрунтоване порівняння показників.

У процесі дослідження була виявлена позитивна асоціація генотипу TT (OR=5,08) та мінорного T-алелю (OR=2,40) поліморфізму промоторної зони гена ІЛ-4 C-590T з розвитком хронічного запального процесу в БНП (табл. 3). Протективним ефектом володіє гомозиготний генотип CC (OR=0,27) даного поліморфізму.

Дослідження частоти зустрічання всіх генотипів по алелях в позиції C-590T поліморфізму промоторного регіону гена ІЛ-4 виявило вірогідну різницю в розподілі генотипів. Особливо високою специфічністю і, відповідно, високим прогностичним коефіцієнтом, володіє наявність гомозиготного варіанту за «диким» C-алелем. Виявлена закономірність свідчить про певне протективне значення наявності генотипу CC в геномі і може виявитися одним із факторів резистентності щодо розвитку хронічного поліпозного запалення верхніх дихальних шляхів.

Висновки

1. Наявність «мутантної» T-алелі простого одонуклеотидного поліморфізму C-590T гена ІЛ-4 асоціює із збільшенням продукції

відповідного цитокіну в сироватці периферійної венозної крові.

2. Домінуючим генотипом у хворих на хронічні захворювання біляносових пазух є гетерозиготний CT варіант C-590T поліморфізму гена ІЛ-4, в той час як в групі контролю найчастіше зустрічаються гомозиготи за «дикого» C-алеллю.

3. Частота гомозиготного TT генотипу C-590T поліморфізму гена ІЛ-4 найвища серед хворих на хронічний поліпозний полісинусит.

4. Збільшення продукції ІЛ-4, що виявлене при хронічному гнійному і хронічному поліпозному синуситі, може бути зумовлена одонуклеотидною заміною в промоторній зоні гена ІЛ-4.

5. Одним з факторів резистентності щодо розвитку хронічного запального процесу біляносових пазух може бути CC-генотип одонуклеотидного простого C-590T поліморфізму гена ІЛ-4.

Перспективи подальших досліджень

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

Література

1. Коненков В.И. Медицинская и экологическая иммуногенетика. - Новосибирск, 1999. - 250с.
2. Конопля А.И. Имунные и оксидантные нарушения у больных острыми и обострением хронических воспалительных заболеваний верхнечелюстных пазух / А.И.Конопля, С.В.Будяков, Н.А.Конопля // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2009. - №1. – С.72-80
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. - 311 – 321.
3. Стентон Г. Медико-биологическая статистика / Гланц Стентон; пер. с англ. Ю.А.Данилова. – М.: Практика, 1999. – 459 с
4. Флетчер Р. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины / Р.Флетчер, С.Флетчер, Э.Вагнер; пер. с англ. Ю.Б.Шевелева. – М.МедиаСфера, 3-е изд., 2004. – 352 с., ил
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. 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.
7. Kamali-Sarvestani E. Cytokine Gene Polymorphism in BCG Lymphadenopathy / E.Kamali-Sarvestani, B.Ghahesi-Fard, A.Alborzi // IJMS. – 2002. – Vol.27, №3. – P.125-130.
8. Rudack C Cytokines in nasal polyposis, acute and chronic sinusitis / C Rudack, N. Stoll, C bachert // Am. J. Rhinol. - 1998. - V. 12. - N. 6. - P. 383 -388.
9. Seong K.P. Expression of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in nasal polyps associated with interleukin-4 promoter polymorphism -590 / K.P.Seong, W.H.Kyung, J.Hyun, S.Y.Sung, Y.Young // Otolaryngology – Head and Neck Surgery. – 2006. – Vol.135, Issue 6. – P. 928-932.
10. 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.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА C-590T ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА 4 НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ПРОЦЕССАМИ ОКОЛОНОСОВЫХ ПАЗУХ

С.А.Левецкая

Резюме. Проведено исследование влияния простого одонуклеотидного полиморфизма гена IL-4 C-590T на продукцию IL-4 у 48 больных хроническим гнойным синуситом,

52 больных хроническим полипозным синуситом и 35 здоровых людей. Установлено, что увеличение продукции IL-4, выявленное при хроническом гнойном и хроническом полипозном синуситах, может быть обусловлено одонуклеотидной заменой в промоторной зоне гена IL-4. Наличие «мутантной» T-аллели C-590T-полиморфизма гена IL-4 ассоциирует с увеличением продукции соответствующего цитокина. Частота гомозиготного TT генотипа C-590T наивысшая среди больных хроническим полипозным полисинуситом. CC-генотип C-590T полиморфизма гена IL-4 может быть протективным фактором, препятствующим развитию хронического синусита.

Ключевые слова: генетический полиморфизм C-590T, интерлейкин 4, хронический синусит.

THE INFLUENCE OF THE C-590T POLYMORPHISM OF THE INTERLEUKIN 4 GENE ON INTERLEUKIN-4 PRODUCTION IN PATIENTS WITH CHRONIC INFLAMMATORY PROCESSES OF PARANASAL SINUSES

S.A.Levytska

Abstract. An analysis of the influence of single nucleotide polymorphism of interleukin 4 gene on IL-4 production was carried out in 48 patients with chronic purulent sinusitis, 52 patients with chronic polypous sinusitis and 35 healthy persons. It was established that the increasing of IL-4 production revealed in cases of chronic purulent and chronic polypous sinusitis may be caused by the single nucleotide replacement in promoter of IL-4 gene. The mutant T-allele of C-590T polymorphism of IL-4 gene was associated with increasing of IL-4 production. The highest frequency of TT-genotype of C-590T polymorphism of IL-4 gene was revealed in patients with chronic polypous sinusitis. The CC-genotype of C-590T polymorphism of IL-4 gene can be the protective factor for the development of chronic sinusitis.

Key words: genes polymorphism C-590T, interleukin 4, chronic sinusitis.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and expir. pathol. - 2011. - Vol.10, №3 (37).-P.110-113

Надійшла до редакції 17.08.2011

Рецензент проф. Л.П. Сидорчук

© С.А.Левецька, 2011