

УДК 616.216.3-002.2:616.15:575

© А.І. Гоженко, С.А. Левицька, Л.П. Сидорчук, 2012.

## ГЕНЕТИЧНА ДЕТЕРМІНОВАНІСТЬ РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ В НАВКОЛОНОСОВИХ СИНУСАХ

**А.І. Гоженко, С.А. Левицька, Л.П. Сидорчук**

*ДП Український НДІ медицини транспорту (директор - проф. А.І. Гоженко), м.Одеса; Буковинський державний медичний університет (ректор – проф. Т.М. Бойчук), м.Чернівці.*

### THE GENETIC CONDITIONALITY OF THE DEVELOPMENT OF CHRONIC INFLAMMATORY PROCESS IN PARANASAL SINUSES

**A.I. Gozhenko, S.A. Levytska, L.P. Sidorchuk**

#### SUMMARY

The results of the influence of points-mutations of genes IL-1 $\beta$ (C-511T) and IL-4(C-590T) on the production of proper cytokines in children with purulent and polypous forms of chronic sinusitis allowed to make a hypothesis of genetic conditionality of the development of the type of chronic inflammation in paranasal sinuses. It was established that the mutation in 511 position of promoter zone of IL-1 $\beta$ -gene decreases the risk of the development of the purulent sinusitis as well as mutation in 590 position of promoter zone of IL-4-zone shows the increased probability of the development of polypous form of chronic inflammation.

### ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕРМИНИРОВАННОСТЬ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В ОКОЛОНОСОВЫХ СИНУСАХ

**А.И. Гоженко, С.А. Левицкая, Л.П. Сидорчук**

#### РЕЗЮМЕ

Результаты исследования влияния точечных мутаций генов IL-1 $\beta$  (C-511T) и IL-4(C-590T) на продукцию соответствующих цитокинов у детей с гнойной и полипозной формами хронических синуситов позволили высказать гипотезу о генетической детерминированности развития типа хронического воспаления в околоносовых синусах. Установлено, что мутация в 511 позиции промоторной зоны гена IL-1 $\beta$  уменьшает риск развития гнойного синусита, в то время как мутация в 590 позиции гена IL-4 указывает на повышенную вероятность развития полипозной формы хронического воспаления.

**Ключові слова:** генетичний поліморфізм, інтерлейкіни 1в і 4, хронічний синусит.

Хронічні запальні захворювання навколоносових синусів – одна з найбільш частих респіраторних патологій із можливою генетичною детермінантою розвитку [8]. Уроджений дефект імунного розпізнавання патогенів епітеліоцитами слизової оболонки може відігравати важливу роль у патогенезі хронічного запалення навколоносових синусів [4]. Ефективність захисних реакцій неспецифічного і специфічного імунітету забезпечується тісною міжклітинною кооперацією, а одним з перших прозапальних цитокинів, що продукується клітинами у відповідь на вторгнення патогенних мікроорганізмів, є інтерлейкін-1 (IL-1) [7].

Важливу роль у взаємодії клітинних і гуморальних факторів імунних і запальних реакцій грає інтерлейкін-4 (IL-4) – представник протизапальних цитокинів та біохімічний маркер Т-хелпер-2-асоційованого запалення [5].

Продукція цитокинів зумовлена дією декількох факторів і одним з важливих механізмів контролю їх синтезу є регуляція на генному рівні [1].

Метою дослідження було вивчення впливу точкових мутацій C-511 гена IL-1 $\beta$  і C-590T гена IL-4 на формування типу хронічного запального процесу в ННС у дітей.

#### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Поліморфізм генів IL-1 $\beta$  та IL-4 та концентрація відповідних цитокинів в сироватці венозної крові вивчені у 135 дітей, об'єднаних в три групи спостереження. Першу групу (n=48) склали хворі на хронічний гнійний синусит, другу (n=52) – хворі на хронічний поліпозний синусит. Третя, контрольна група, складалася з 35 практично здорових дітей без запальної патології в навколоносових пазухах.

Матеріалом для імунологічного дослідження була сироватка крові. Концентрацію цитокинів визначали за допо-могою діагностичних 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 Taq-ДНК-полімерази та специфічних праймерів. Дискримінацію алелей проводили за допомогою специфічних ендонуклеаз рестрикції AVAI і AVAII («Fermentas<sup>®</sup>», Литва) у реакції гідролізу. Рестрикційні продукти ПЛР розділяли за допомогою електрофорезу у 2% агарозному гелі у присутності трис-боратного буфера (ТТБ),

концентрованою з бромідом етидію, 30-45 хвилин: розрізняли «мутантну» AVAII-резистентну Т-алель та «дику» С-алель [6]. Фрагменти візуалізували за допомогою трансільюмінатора у присутності маркера молекулярних мас 100-1000 бр («СибЭнзим», Росія).

Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми «Statistica 6» [3]. Ідентифікацію досліджуваного показника як маркера ризику оцінювали методами клінічної епідеміології за результатами обчислення відношення шансів (OR) [2].

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що вміст ІЛ-1 $\beta$  у сироватці периферичної венозної крові у хворих на гнійну форму хронічного синуїту був найнижчим та

статистично значимо відрізнявся від відповідних показників контрольної групи ( $p < 0,05$ ) і групи хворих з поліпозною формою ураження ( $p < 0,05$ ; табл. 1). У той же час вірогідних змін між концентрацією ІЛ-1 $\beta$  у другій та контрольній групах не виявлено ( $p > 0,05$ ).

Вміст ІЛ-4 в сироватці крові при гнійній формі хронічного запалення вірогідно вищим у порівнянні з контрольною групою ( $p < 0,05$ ; табл. 1) та вірогідно нижчим у порівнянні з хворими з поліпозною формою ураження ( $p < 0,01$ ).

Таким чином, розвиток хронічного запалення в ННС супроводжується зниженням продукції ІЛ-1 $\beta$ , одного з основних прозапальних цитокінів, на фоні зростання продукції протизапального ІЛ-4.

Таблиця 1

Вміст ІЛ-1 $\beta$  та ІЛ-4 в сироватці крові дітей, хворих на хронічні синуїти

Група дослідження	ІЛ-1 $\beta$ (пг/мл) (M $\pm$ m)	ІЛ-4 (пг/мл) (M $\pm$ m)
Хворі на хронічний гнійний синуїт (n=48)	62,05 $\pm$ 2,33	50,74 $\pm$ 1,16
Хворі на хронічний поліпозний синуїт (n=52)	69,05 $\pm$ 2,33	64,87 $\pm$ 1,71
Контрольна група (n=35)	75,93 $\pm$ 3,07	45,85 $\pm$ 1,64

Найнижчий вміст ІЛ-1 $\beta$  у сироватці крові характерний для ХГС, у хворих на ХПС концентрація цього цитокіну вірогідно вища. В той же час поліпозний хронічний запальний процес характеризувався найвищим рівнем продукції ІЛ-4.

При дослідженні асоціації між продукцією ІЛ-1 $\beta$  лімфоцитами периферійної крові та генетичним поліморфізмом С-511Т гена ІЛ-1 $\beta$  встановлено, що

продукція цитокіну при гетерозиготному генотипі була вірогідно вищою в порівнянні із гомозиготами за «диким» С-алелем ( $p < 0,05$ ; табл. 2). Так само вищим був вміст ІЛ-1 $\beta$  при гомозиготному варіанті ТТ ( $p < 0,05$ ). В той же час статистично значимої різниці між продукцією цитокіну гомозиготами за мінорним Т-алелем і гетерозиготами виявлено не було ( $p > 0,05$ ; табл. 2).

Таблиця 2

Вплив генетичного поліморфізму С-511Т гена ІЛ-1 $\beta$  і С-590Т гена ІЛ-4 на рівень відповідних цитокінів в сироватці крові

Варіант поліморфізму	Генотип	Рівень ІЛ-1 $\beta$ (пг/мл) (M $\pm$ m)	Варіант поліморфізму	Генотип	Рівень ІЛ-4 (пг/мл) (M $\pm$ m)
С-511Т гена ІЛ-1 $\beta$	СС (n=54)	62,21 $\pm$ 2,17	С-590Т гена ІЛ-4	СС (n=43)	46,03 $\pm$ 1,37
	СТ (n=55)	73,54 $\pm$ 1,97		СТ (n=80)	58,07 $\pm$ 1,37
	ТТ (n=26)	71,17 $\pm$ 3,23		ТТ (n=12)	65,73 $\pm$ 3,98
Статистична обробка	p(СС-СТ)<0,05 p(СС-ТТ)<0,05		Статистична обробка	p(СС-СТ)<0,05 p(СС-ТТ)<0,05	

Продукція ІЛ-4 гомозиготами за мінорним Т-алелем і гетерозиготами за С-590Т поліморфізмом гена ІЛ-4 була вірогідно вищою ( $p < 0,05$ ) в порівнянні із гомозиготами за «диким» С-алелем (табл. 2). В той же час статистично значимої різниці між продукцією цитокіну носіями СТ і ТТ генотипів виявлено не було ( $p > 0,05$ ).

Таким чином, наявність тіміну в 511 позиції промоторної зони гена ІЛ-1 $\beta$  асоціювала із збільшенням продукції відповідного цитокіну

лімфоцитами, а мутація С-Т в 590 позиції промоторної зони гена ІЛ-4 – із зростанням рівня ІЛ-4 в сироватці периферійної крові.

Аналіз одонуклеотидного поліморфізму С-511Т гена ІЛ-1 $\beta$  серед груп дослідження довів, що найбільша доля гомозигот за «диким» С-алелем виявлена серед хворих на гнійну форму синуїту. При цьому СС-гомозиготи характеризувалися найнижчим рівнем продукції ІЛ-1 $\beta$  (табл. 3).

В групі хворих на поліпозну форму ураження

зменшується доля СС-гомозигот до 40,38%, зростає відсоток зустрічання гомозиготного ТТ-варіанта генотипу до 25%. Домінуючим варіантом генотипу в контрольній групі був гетерозиготний (62,86%), доля гомозигот була найменшою при порівнянні з обома дослідними групами.

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. 3).

Аналіз одонуклеотидного поліморфізму С-590Т гена ІL-4 серед груп дослідження довів, що найбільша

доля гомозигот за СС-варіантом була вивлена серед дітей контрольної групи і дітей, хворих на хронічний гнійний синусит. При цьому СС-гомозиготи характеризувалися найнижчим рівнем продукції ІL-1 $\beta$  (табл. 3).

Результати проведеного дослідження дозволяють висловити гіпотезу про існування генетичної детермінованості типу хронічного запального процесу, що розвивається в навколоносових пазухах. Точкова мутація в промоторній ділянці гена здатна призводити до зміни рівня продукції кодового цитокіна.

Таблиця 3

Вміст ІL-1 $\beta$  та ІL-4 в сироватці крові в залежності від захворювання і генотипу

Група	Генотип (С-511Т гена ІL-1 $\beta$ )	К-ть хворих	ІL-1 $\beta$ (пг/мл)	Генотип (С-590Т гена ІL-4)	К-ть хворих	ІL-4 (пг/мл)
Хворі на хронічний гнійний синусит (n=48)	СС	25 (52,08%)	55,10 $\pm$ 1,74	СС	20 (41,67%)	48,38 $\pm$ 1,25
	СТ і ТТ (наявна мутація)	22 (47,92%)	71,41 $\pm$ 1,36	СТ і ТТ (наявна мутація)	28 (58,33%)	51,78 $\pm$ 1,86
Хворі на хронічний поліпозний синусит (n=52)	СС	21 (40,38%)	66,40 $\pm$ 4,22	СС	4 (7,69%)	54,08 $\pm$ 4,64
	СТ і ТТ (наявна мутація)	44 (81,62%)	71,92 $\pm$ 4,77	СТ і ТТ (наявна мутація)	48 (92,31%)	68,68 $\pm$ 1,84
Контрольна група (n=35)	СС	8 (22,86%)	73,45 $\pm$ 5,29	СС	19 (54,29%)	41,86 $\pm$ 2,32
	СТ і ТТ (наявна мутація)	27 (77,14%)	78,6 $\pm$ 6,16	СТ і ТТ (наявна мутація)	16 (45,71%)	54,03 $\pm$ 1,73

Збільшення продукції ІL-1 $\beta$  лімфоцитами периферійної венозної крові при реалізації запального процесу в навколоносових синусах може бути пов'язана із наявністю «мутантної» Т-алелі

одонуклеотидного поліморфізму С-511Т гена ІL-1 $\beta$ . При цьому мінорна Т-алель володіє протективним ефектом щодо розвитку хронічного гнійного запалення (OR=0,27; табл. 4).

Таблиця 4

Показники імуногенетичного дослідження як маркери ризику розвитку хронічних запальних процесів ННС

Показник	OR	Log V	Довірчі інтервали
Наявність «мутантної» Т-алелі поліморфізму С-511Т гена ІL-1 $\beta$	0,27	0,25	0,1-0,72
Наявність «мутантної» Т-алелі поліморфізму С-590Т гена ІL-4	2,40	0,1	1,27 – 4,57

Так само наявність «мутантної» Т-алелі простого одонуклеотидного поліморфізму С-590Т гена ІL-4 асоціює із збільшенням продукції відповідного цитокіну і може свідчити про підвищений ризик розвитку поліпозної форми хронічного синуситу (OR=2,40; табл. 4).

Отримані дані свідчать про те, що поліморфізм генів, кодуєючих інформацію про представників прозапальних і протизапальних цитокінів, призводить

до імунної дисфункції та порушення розвитку запального процесу. Це дає змогу висловити припущення про вплив генетично детермінованої імунної дисфункції на характер і розвиток запалення в інших органах і системах.

#### ВИСНОВКИ

1. Генетичною основою розвитку типу хронічного запалення в навколоносових пазухах може бути спадково детермінований рівень продукції

прозапальних і протизапальних цитокінів. Так, мутація в 511 позиції промоторної зони гена IL-1 $\beta$  зменшує ризик розвитку хронічного гнійного синуситу, в той час як мутація в 590 позиції гена IL-4 може вказувати на схильність щодо розвитку хронічного поліпозного запалення.

2. Фактором резистентності щодо розвитку хронічного гнійного запального процесу може бути наявність Т-алелі однонуклеотидного С-511Т поліморфізму гена IL-1 $\beta$ , а протективним фактором щодо розвитку поліпозної форми враження навколоносових синусів – гомозиготний генотип за «диким» С-алелем однонуклеотидного С-590Т поліморфізму гена IL-4.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Левицька С.А. Вплив поліморфізму С-590Т гена інтерлейкіну 4 на продукцію інтерлейкіну 4 у хворих на хронічні запальні процеси біляносових пазух / С.А.Левицька // Клінічна та експериментальна патологія.-2011.-Т.Х, №3(37).-С.110-113.

2. 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.

3. Халафян А.А. Statistica 6. Статистический анализ данных. 3-е изд. Учебник / Халафян А.А. – М.: ООО «Бином-Пресс», 2007. – 512 с., ил.

4. Bradley D.T. Role of interleukins and transforming growth factor-beta in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis / D.T.Bradley, S.E.Kountakis // Laryngoscope. – 2005. – Vol.115(4). – P.684-686.

5. 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.

6. Klimkowicz-Mrowiec A. Interleukin-1 gene -511 CT polymorphism and the risk of Alzheimer's disease in a Polish population / A.Klimkowicz-Mrowiec, M.Marona, P.Woikow et al. // Dement Geriatr Cogn Disord. – 2009. – Vol.28 (5). – P.461-464.

7. Mfuna Endam L. Association of IL1A, IL1B, and TNF gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: A replication study / L.Mfuna Endam, C.Cormier, Y.Bossй, A.Filali-Mouhim, M.Desrosiers // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 2010. – Vol.136(2). – P.187-192.

8. Tewfik M.A. Genetics of chronic rhinosinusitis: a primer / M.A.Tewfik, Y.Bossй, H.Al-Shemari, M.Desrosiers // J.Otolaryngol.Head.Neck.Surg. - 2010. – Vol.39, №1. – P.62-68.