

О.І. КАШИН, Д.В. ЗАСТАВНА, Г.В. МАКУХ  
Інститут спадкової патології АМН України, Львів

## ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ КРАПКОВИХ НУКЛЕОТИДНИХ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНА ІЛ-10 ПРИ МУКОВІСЦИДОЗІ



*Вивчали розподіл крапкових нуклеотидних поліморфізмів промоторної частини гена інтерлейкіну-10 у положенні —1082 G→A в групі хворих на муковісцидоз. Досліджено 42 зразки ДНК пацієнтів з муковісцидозом, контрольну групу склали 73 зразки ДНК від практично здорових осіб. Результати вивчення частот алелів високої (G) та низької (A) експресії гена ІЛ-10 засвідчили статистично вірогідну різницю у розподілі частот G-алеля та GG-генотипу в групі пацієнтів з МВ у порівнянні з контролем. Дослідження розподілу SNP—1082 G→A пІЛ-10 в окремих групах пацієнтів з МВ показало статистично вірогідне підвищення частот G-алеля та GG-генотипу лише у групі пацієнтів — гомозиготних носіїв delF508 мутації. Розглядається можлива роль промоторних ділянок гена ІЛ-10 як модифікаторів фенотипічних проявів МВ при певних ТРБМ-генотипах.*

© О.І. КАШИН, Д.В. ЗАСТАВНА, Г.В. МАКУХ, 2006

**Вступ.** Муковісцидоз (МВ) — найбільш поширена моногенна хвороба людини з частотою 1 : 2500 новонароджених. МВ зумовлений генетичними дефектами гена ТРБМ (трансмембранний регуляторний білок муковісцидозу), які спричиняють аномальне функціонування екзокринних залоз організму. Разом з тим навіть при ідентичних ТРБМ-генотипах діапазон уражень при муковісцидозі є високо-варіабельним [1], тому пошук альтернативних генетичних факторів реалізації фенотипічних проявів МВ може допомогти у розумінні кореляції генотип—фенотип.

З цього приводу розглядається поняття генної мережі [2—4], в межах якої поряд із основним геном на фенотипічні прояви моногенних хвороб впливають і так звані гени-модифікатори. Зокрема, за даними Agon et al. [5], Заставної та ін. [6, 7], при МВ такими генами можуть бути гени, які відповідають за імуногенетичну структуру в клітині, а саме окремі гени головного комплексу гістосумісності. Автори припускають, що генетичні фактори, відомі своїм модуляторним ефектом на імунну відповідь організму, обумовлюють клінічний прогноз при МВ. В продовження цього напрямку робіт (і наших, зокрема) видається доцільним вивчення ролі цитокінів в мережі фенотипічних проявів при МВ, адже, як відомо, саме цитокіни безпосередньо задіяні у механізмі функціонування головного комплексу гістосумісності. Дослідження такого роду мотивовані ще й останніми результатами літератури щодо дисбалансу при МВ продукції цілого ряду цитокінів — ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10 [8—11].

Особливий інтерес викликає прозапальний цитокін інтерлейкін-10 (ІЛ-10). Зокрема, промоторна частина гена ІЛ-10 (пІЛ-10) містить ряд крапкових нуклеотидних варіацій (SNP), які відповідають за високу/низьку експресію ІЛ-10, ці ж SNP-варіації формують алелі схильності до ряду хвороб, таких як ракові та аутоімунні [12—14]. Враховуючи те, що доведеним фактом на сьогодні є дисбаланс при МВ продукції ІЛ-10, вважаємо доцільним вивчення крапкових нуклеотидних поліморфізмів гена ІЛ-10 як модулятора фенотипічних проявів при МВ. Доцільність такого роду досліджень мотивована ще й неоднозначністю отриманих з цього питання результатів. Зокрема, незважаючи на те, що однією з характерних особливостей МВ є дисбаланс цитокінів та цитокін-

подібних молекул в клітинах легеневого епітелію [9, 15], проте в сироватці крові не знайдено особливих відмінностей у продукції ІЛ-10 між хворими на МВ та здоровими індивідами [16], хоча *in vitro* Т-клітини периферійної крові пацієнтів з МВ відповідають високими рівнями секреції ІЛ-10 при індукції.

Отже, підсумовуючи все сказане та зважаючи на те, що ІЛ-10 відіграє одну з ключових ролей у імунологічних шляхах організму, нам вдалось надзвичайно цікавим дослідити роль поліморфізму —1082 G→А гена ІЛ-10 як потенційного імуногенетичного маркера схильності до альтерації клінічних проявів при МВ.

Метою даної роботи є дослідження SNP в положенні —1082 G→А пІЛ-10 у групі хворих на МВ як гена-модулятора ТРБМ-гена при МВ.

**Матеріали і методи.** Матеріалом для проведення досліджень служили зразки ДНК, отримані з лейкоцитів периферійної крові дітей, хворих на МВ, що проходили молекулярно-генетичне обстеження в Інституті спадкової патології АМН України. Всього було обстежено 42 зразки ДНК пацієнтів з МВ, з них у 17 випадках раніше було виявлено носійство мажорної мутації delF508 у гомозиготному стані. Такі пацієнти склали групу носіїв мажорної мутації delF508 у гомозиготному стані, 19 зразків увійшли до групи пацієнтів з компаундним гетерозиготним носійством мажорної мутації delF508, в двох зразках виявлено носійство «слов'янської» мутації 21 кб, у чотирьох пацієнтів з клінічно діагностованим МВ тип мутацій не з'ясований.

Контрольну групу склали 73 зразки ДНК, отримані від практично здорових осіб, в родинному анамнезі яких не було МВ, онкологічних та аутоімунних хвороб.

Досліджувану промоторну ділянку гена ІЛ-10, що містить SNP —1082 G→А, ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) згідно з методом, описаним Giordani et al. [16], з використанням реактивів «МВІ Fermentas». Детекцію SNP —1082 G→А проводили методом ПДРФ з використанням ендонуклеази рестрикції Eam1401 («МВІ Fermentas») згідно з інструкцією фірми-виробника. Фрагменти ПЛР продукту, отримані методом ПДРФ, розділяли у агарозному гелі (3 %, 0,5 мг бромистого етидію).

Дані обробляли методами варіаційної статистики з використанням контингентних таблиць 2Х2 та 2Х3, обчисленням критеріїв Пірсона  $\chi^2$  (корекція Yate) та Ст'юдента (р). При  $p \leq 0,05$  результати вважались статистично достовірними.

Дослідження було проведено з урахуванням норм біоетики.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Вивчали крапкові нуклеотидні варіації (SNP) промоторної частини гена ІЛ-10 (пІЛ-10), а саме поліморфізм —1082 G→А. Всього обстежено 115 індивідів, контроль склав 73 практично здорових людей без обтяженого анамнезу з приводу муковісцидозу, онкологічних та аутоімунних хвороб.

Результати вивчення частот алелів високої (G) та низької (A) експресії гена ІЛ-10 у контрольній групі представлено у табл. 1. Як видно, співвідношення за частотою G- та A-алелів відповідало 80 : 66 (в абсолютних значеннях), або 55 % до 45 % алелів.

В групі пацієнтів з МВ (42 пацієнти) частота G-алеля істотно переважала його частоту в контрольній групі (73 % проти 45 %), а проведені розрахунки критерію Пірсона ( $\chi^2$ ) засвідчили цю різницю статистично вірогідною ( $\chi^2 = 11,59$  при  $P = 0,0007$ ).

Провівши аналіз розподілу генотипів —1082 G→А пІЛ-10, ми також виявили суттєве підви-

Таблиця 1

Частоти SNP —1082 G→А пІЛ-10 в групі пацієнтів з муковісцидозом (МВ) у порівнянні з контролем

Досліджувані групи	Частота алелів		P ( $\chi^2$ )
	A	G	
Пацієнти з МВ	23/84 (27 %)	61/84 (73 %)	0,0007 (11,59)
Контроль	80/146 (55 %)	66/146 (45 %)	—

Таблиця 2

Частоти генотипів SNP —1082 G→А пІЛ-10 в групі пацієнтів з муковісцидозом (МВ) у порівнянні з контролем

Досліджувані групи	Частота генотипів			P ( $\chi^2$ )
	AA	AG	GG	
Пацієнти з МВ	4 (9 %)	15 (36 %)	23 (55 %)	0,0004(15,568)
Контроль	22 (30 %)	36 (49 %)	15 (21 %)	—

щення частоти GG-генотипу в групі пацієнтів з МВ (55 % у групі пацієнтів з МВ у порівнянні з 21 % в контрольній групі,  $P = 0,0004$ ). Дані по розподілу генотипів — 1082 G→A пІЛ-10 наведені в табл. 2.

З літературних даних відомо, що GG-генотип формує генотип «високої» експресії гена ІЛ-10 [13, 14], тобто дані результати засвідчили спадково обумовлену схильність пацієнтів з МВ до продукції високих рівнів ІЛ-10.

Зважаючи на генетичну гетерогенність щодо ТРБМ-генотипу групи пацієнтів з МВ, наступним етапом роботи було дослідження розподілу SNP — 1082 G→A у групах гомозиготних носіїв мутації delF508 та компаундних гетерозигот за носійством цієї мутації.

Отримані результати (табл. 3 та 4) показали, що існує чітка статистично вірогідна різниця у розподілі маркерного G-алеля (79 % проти 45%,  $p = 0,0007$ ) і особливо GG-генотипу (65 % проти 21 %,  $p = 0,001$ ) у групі пацієнтів — гомозиготних носіїв мутації delF508 у порівнянні з розподілом у контрольній групі. Щодо групи компаундних гетерозигот (delF508/X), то у порівнянні з контролем за особливостями розподілу SNP — 1082 G→A різниці не виявлено як по частоті А- і G-алелів, так і по особливостях генотипів — 1082 G→A пІЛ-10. Отже, очевидно, можна говорити про певні селективні механізми у популяції та можливу котрансмісію маркерів «високої» експресії гена ІЛ-10 з певним ТРБМ-генотипом.

Отримані результати представляють, на нашу думку, великий інтерес у декількох аспектах. По-перше, вони пояснюють генетичну передумову здатності клітин периферійної крові пацієнтів з МВ до продукції високих рівнів ІЛ-10, описану рядом дослідників [10, 17]. З іншого боку, отримані нами дані свідчать, що G-

алель та GG-генотип пІЛ-10 (алель та генотип «високої» експресійної здатності пІЛ-10) можуть виступати маркерами схильності до розвитку певного клінічного фенотипу при МВ.

Зокрема статистично вірогідно підвищені частоти маркерного G-алеля і особливо GG-генотипу у групі пацієнтів — гомозиготних носіїв мутації delF508 можуть пояснити певні особливості клінічного перебігу МВ у пацієнтів з даним ТРБМ-генотипом. Адже саме гомозиготне носійство мутації delF508 асоціюється з важкими панкреатичними відхиленнями при МВ [18], причому панкреатичні порушення при МВ включають в себе патологію біліарної системи та вторинний фіброз з маловідомою етіологією розвитку без слідів запальних процесів [12]. У зв'язку з цим можна передбачити високу активність ІЛ-10 як мажорного проти-запального цитокіну власне при delF508/delF508-генотипі.

Разом з тим цілком ймовірно, що схильність до генетично обумовленої здатності клітин до

Таблиця 3

Розподіл алелів — 1082 G→A пІЛ-10 в групах гомозиготного носійства мутації delF508, компаундного носійства мутації delF508 при МВ у порівнянні з контролем

Досліджувані групи	Частота алелів		P ( $\chi^2$ )
	A	G	
delF508/delF508 (n = 17)	7/34 (21 %)	27/34 (79 %)	0,0007(11,59)
delF508/X (n = 19)	15/38 (39 %)	23/38 (61 %)	НВ
Контрольна група (n = 73)	80/146 (55 %)	66/146 (45 %)	—

Примітка. Тут і в табл. 4 НВ — статистично невірогідна різниця,  $p > 0,05$ .

Таблиця 4

Розподіл генотипів — 1082 G→A пІЛ-10 в групах гомозиготного носійства мутації delF508, компаундного носійства мутації delF508 при МВ у порівнянні з контролем

Досліджувані групи	Частота генотипів			P ( $\chi^2$ )
	AA	AG	GG	
delF508/delF508	1/17 (6 %)	5/17 (29 %)	11/17 (65 %)	0,001(13,680)
delF508/X	3/19 (15,8 %)	9/19 (47,4 %)	7/19 (36,8 %)	НВ
Контрольна група	22/73 (30 %)	36/73 (49 %)	15/73 (21 %)	—



експресії високих рівнів ІЛ-10, в свою чергу, підлягає певному ендogenous впливові власне у пацієнтів з гомозиготним носійством мутації delF508. Таке передбачення підтверджується тим, що, як відомо [19], триада цитокінів, а саме ІЛ-1, ІЛ-6 та ІФН- $\gamma$ , є стимуляторами синтезу гепатоспецифічних ядерних факторів шляхом взаємодії з білковими факторами ядерної сигнальної мережі гепатоцитів, зокрема з ССАТ/енхансер-зв'язуючими активаторними білками (С/ЕВР). У свою чергу, активація промоторної активності гена ІЛ-10 прямо залежить від експресії С/ЕВР в клітинах [18, 19], а основною біологічною функцією ІЛ-10 є інгібування експресії прозапальних цитокінів ІЛ-1, ІЛ-6 та, особливо, ІФН- $\gamma$  [21]. Показано також [20–22], що рівень секреції ІФН- $\gamma$  у пацієнтів з МВ значно знижений при підвищених рівнях ІЛ-10 і в результаті проходження сигнальних шляхів у клітинах гепатобіліарної системи при МВ змінюється. Тобто, припускаючи генетично обумовлені «високі» рівні експресії ІЛ-10 в гепатобіліарній системі пацієнтів з МВ та особливо у носіїв мажорної delF508 мутації, ми можемо сказати, що ІЛ-10 істотно впливає на сигнальну мережу клітин і відповідно є патогенним фактором панкреатичних порушень при delF508/delF508-генотипі.

**Висновки.** Виявлено статистично вірогідну різницю у розподілі частот G-алеля та GG-генотипу в групі пацієнтів з МВ у порівнянні з контролем. Дослідження розподілу SNP-1082 G→A пІЛ-10 в окремих групах пацієнтів з МВ (групі гомозиготних носіїв мутації delF508 та групі компаундних гетерозигот по даній мутації) показало статистично вірогідне підвищення частот G-алеля та GG-генотипу лише у групі пацієнтів — гомозиготних носіїв delF508 мутації. У світлі відомих з літератури даних виявлені нами асоціативні зв'язки алеля та генотипу «високої» експресії з гомозиготним носійством мутації delF508 дозволяє стверджувати, що панкреатичні порушення при МВ реалізуються через дисбаланс ядерної сигнальної мережі під значним впливом генетично обумовленого високого рівня ІЛ-10. Дослідження виявили можливу роль промоторних ділянок гена ІЛ-10 в як маркерів схильності до розвитку клінічних проявів МВ.

**SUMMARY.** Distribution of interleukin-10 promoter — 1082 G→A single nucleotide polymorphism (SNP) in the group of cystic fibrosis (CF) patients has been studied. As a whole 42 CF patients and 73 persons of the control group were genotyped for IL-10 promoter — 1082 G→A SNP. The frequencies of IL-10 — 1082 G-allele and GG high expression genotype increased significantly in CF patients in comparison to the control group. In addition, study of IL-10 — 1082 SNP distribution in the separate CF groups showed statistically significant increasing of the G-allele and GG-genotype frequencies in the subgroup of homozygous delF508 carriers. The possible role of IL-10 promoter SNP as a phenotype modifiers at different CF genotypes is examined.

**РЕЗЮМЕ.** Изучали распределение точечной нуклеотидной вариации — 1082 G→A промоторной части гена интерлейкина-10 в группе пациентов с муковисцидозом (МВ). Всего обследовано 42 образца ДНК пациентов с МВ и 73 образца контрольной группы. В результате изучения частот аллелей высокой (G) и низкой (A) экспрессии гена ІЛ-10 найдено, что статистически достоверная разница в распределении частот G-аллеля и GG-генотипа присутствует в группе пациентов с МВ в сравнении с контролем. В отдельных группах пациентов с МВ статистически достоверное повышение частот G-аллеля и GG-генотипа отмечено в группе гомозиготных носителей мутации delF508. Рассматривается возможная роль полиморфизма промоторных участков гена ІЛ-10 в качестве модификаторов фенотипа МВ при определенных генотипах гена ТРБМ.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *The cystic fibrosis genotype-phenotype consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis // New Engl. J. Med. — 1993. — 329. — P. 1308–1313.*
2. *Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Є., Асеев М.В. Геном человека и гены «предрасположенности». Введение в предиктивную медицину.— СПб: Интермедика, 2000. — 271 с.*
3. *Колчанов Н.А., Ананько Е.А., Колпаков Ф.А., Подкольная О.А., Игнатъева Е.В., Горячкова Т.Н., Степаненко И.Л. Генные сети // Молекуляр. биология. — 2000. — 34, № 4. — С. 533–544.*
4. *Todd J.A. Interpretation of results from genetic studies of multifactorial diseases // Lancet. — 1999. — 354, Suppl 1. — P. S115–S116.*
5. *Aron Y., Polla B.S., Bienvenu T., Dall'ava J., Dusser D., Hubbert D. HLA Class II Polymorphism in cystic fibrosis: A possible modifier of pulmonary phenotype // Amer. J. Respir. Orit. Care Med. — 1999. — 159. — P. 1464–1468.*
6. *Заставна Д.В., Гнатейко О.З., Макух Г.В., Терпиляк О.І., Надюк З.О. Роль імуногенетичних маркерів у ре-*

- алізації схильності до генетично обумовленої патології // Біополімери і клітина. — 2003. — 19, № 2. — С. 190—195.
7. Заставна Д.В. Особливості розподілу алелів гена DQA1 головного комплексу гістосумісності — як генетична передумова аутоімунних уражень при синдромі Дауна та муковісцидозі // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології : 36. наук. пр. — Київ—Луганськ—Харків. — Вип. 3(49). — 2003. — С. 53—61.
  8. Becker M.N., Sauer M.S., Muhlebach M.S., Hirsh A.J., Wu Q., Verghese M.W., Randell S.H. Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells // Amer. J. Respir. Crit. Care. Med. — 2004. — 69. — P. 645—653.
  9. Haubeau C., Le Naour R., Abely M., Hinnrasky J., Gueunounou M., Gaillard D., Puchelle E. Disregulation of IL-2 and IL-8 production in circulating T lymphocytes from young cystic fibrosis patients // Clin. Exp. Immunol. — 2004. — 135, № 3. — P. 528—534.
  10. Casaulta C., Schoni M. H., Weichel M., Cramer R., Jutel M., Daigle I., Akdis M., Blaser K., Akdis C.A. IL-10 Controls *Aspergillus fumigatus*- and *Pseudomonas aeruginosa*-Specific T-cell response in cystic fibrosis // Pediatr. Res. — 2003. — 53. — P. 313—319.
  11. Hauber H.P., Beyer I.S., Meyer A., Pforte A. Decreased interleukin-18 expression in BAL cells and peripheral blood mononuclear cells in adult cystic fibrosis patients // J. Cyst. Fibros. — 2004. — 3. — P. 129—131.
  12. Howell W.M., Turner S.J., Bateman A.C., Theaker J.M. IL-10 promoter polymorphisms influence tumor development in cutaneous malignant melanoma // Genes Immunol. — 2001. — 2. — P. 25—31.
  13. Perrey C., Pravica V., Sinnott P.J., Hutchinson I.V. Genotyping for polymorphisms in interferon- $\gamma$ , interleukin-10, transforming growth factor- $\beta$ 1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  genes: a technical report // Transplant. Immunol. — 1998. — 6. — P. 193—197.
  14. Turner D.M., Williams D.M., Sankaran D., Lazarus M., Sinnott P.J., Hutchinson I.V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene // Eur. J. Immunogenet. — 1997. — 24. — P. 1—8.
  15. Virella-Lowell I., Herlihy J.D., Liu B., Lopez C., Cruz P., Muller C., Baker H.V., Flotte T.R. Effects of CFTR, interleukin-10, and *Pseudomonas aeruginosa* on gene expression profiles in a CF bronchial epithelial cell line // Mol. Ther. — 2004. — 10. — P. 562—573.
  16. Giordani L., Bruzzi P., Lasalandra C., Quaranta M., Schittulli F., Ragione F. D., Iolascon A. Association of breast cancer and polymorphisms of Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  genes // Clin. Chem. — 2003. — 49. — P. 1664—1667.
  17. Schrem H., Klemptner J., Borlak J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the Hepatocyte Nuclear Factor Network and liver-specific gene expression // Pharmacol. Rev. — 2002. — 54. — P. 129—158.
  18. Brenner S., Prosch S., Schenke-Layland K., Riese U., Gausmann U., Platzer C. cAMP-induced interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation // J. Biol. Chem. — 2003. — 278. — P. 5597—5604.
  19. Kinnman N., Lindblad A., Housset C., Buentke E., Scheznius A., Strandvik B., Hultcrantz R. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in liver tissue from patients with cystic fibrosis // Hepathology. — 2000. — 32. — P. 334—340.
  20. Asadullah K., Sterry W., Volk H.D. Interleukin-10 Therapy—Review of a New Approach // Pharmacol. Rev. — 2003. — 55. — P. 241—269.
  21. Weber A.J., Soong G., Bryan R., Saba S., Prince A. Activation of NF- $\kappa$  B in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl channel function // Amer. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol. — 2001. — 281. — P. 71—78.
  22. Spight D., Zhao B., Haas M., Wert S., Denenberg A., Shanley T.P. Immunoregulatory effects of regulated, lung-targeted expression of IL-10 in vivo // Amer. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol. — 2005. — 288. — P. 251—265.

Надійшла 15.08.05