

Алельні варіанти генів *IL8* та *IL10* є маркерами спадкової схильності до ішемічного інсульту

А.М. Кучеренко^{1,2}, Д.В. Шульженко³, С.М. Кузнєцова³, Л.А. Лівшиць¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

³ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»

Резюме. У статті висвітлено результати дослідження 183 пацієнтів, які вижили після ішемічного інсульту та знаходились на стаціонарному лікуванні у відділенні судинної патології головного мозку ДУ «Інститут геронтології НАМН України», з оцінки ролі поліморфних варіантів *-781C/T* гена *IL8* і *-592C/A* гена *IL10* як генетичних маркерів ризику розвитку ішемічного інсульту. Було виявлено статистично достовірно ($p < 0,05$) вищу частоту носіїв алелю *-781T* у групі пацієнтів з інсультом (81,6%) порівняно з контрольною групою (70,1%). Носії алелю *IL8* – *-781T* – мають майже вдвічі вищий ризик розвитку ішемічного інсульту ($OR=1,886$; ДІ 95%: 1,041-3,417). Статистично достовірно ($p < 0,05$) вища частота носіїв алелю *-592C* гена *IL10* спостерігалася у пацієнтів з ішемічним інсультом (98,2%) порівняно з контрольною групою (90,7%). Носії цього алелю мають майже в 6 разів вищий ризик розвитку ішемічного інсульту ($OR=5,71$, 95% ДІ, 1,48-22,11). Установлено, що в осіб гомозиготних за алелем *-592C* гена *IL10*, в яких розвинувся ішемічний інсульт, шанси на покращення стану (за шкалою Ренкін) протягом перших двох тижнів майже втричі вищі ($OR=2,76$; 95% CI, 1,26-6,07). На підставі отриманих статистичних відмінностей встановлено, що алелі *-781T* гена *IL8* та *-592C* гена *IL10* є факторами спадкової схильності до розвитку ішемічного інсульту. Крім того, алель *-592C* гена *IL10* є генетичним маркером позитивної динаміки стану пацієнта в перші два тижні лікування.

Ключові слова: ішемічний інсульт, генетичні маркери ризику, поліморфні варіанти *-781C/T* гена *IL8* і *-592C/A* гена *IL10*, фактор спадкової схильності до ішемічного інсульту.

Запалення є ключовою ланкою захисту організму, яка активується у відповідь на різноманітні травми та ушкодження [1]. Церебральна ішемія індукує швидку запальну реакцію із залученням декількох типів клітин [1]. У низці досліджень вивчались сигнальні каскади, що активуються у відповідь на ішемію. За їхніми результатами встановлено, що каскади, які пов'язані із запаленням, залучені на всіх етапах ішемічного процесу [2]. Цитокінове середовище (мережа взаємодіючих цитокінів та їх рецепторів) має суттєвий внесок у запальну відповідь і тісно пов'язане з патофізіологією ішемічного пошкодження головного мозку, і, зокрема, ішемічного інсульту. Баланс між про- та протизапальними цитокінами суттєво порушується за рахунок змін експресії відповідних генів, які переважно обумовлені поліморфізмом у промоторних та інтронних ділянках [3, 4].

Для дослідження можливої ролі певних цитокінів у патогенезі ішемічного інсульту були обрані два гени: ген прозапального інтерлейкіну 8 (*IL8*) та протизапального інтерлейкіну 10 (*IL10*). Інтерлейкін 8 є цитокіном хемоаттракції, який також функціонує як фактор росту та ангіогенезу. Він індукує інфільтрацію імунних клітин у зону ішемії та може брати участь у процесі реперфузії [5]. Ген *IL8* розташований на 4 хромосомі в локусі 4q13-q21, складається з 4-х екзонів і 3-х інтронів [6]. На даний час для цього гена відомо 235 однонуклеотидних поліморфізмів [7]. За умови мононуклеотидної заміни С на Т в положенні *-781* першого інтрона гена *IL8* утворюється сайт упізнавання для транскрипції фактора *C/EBPβ*, який підвищує рівень експресії, що в свою чергу призводить до більш високої продукції відповідного білка [8]. Саме тому цей поліморфізм був обраний в якості потенційного генетичного маркера ризику розвитку ішемічного інсульту. Інтерлейкін 10 є протизапальним цитокі-

© А.М. Кучеренко^{1,2}, Д.В. Шульженко³, С.М. Кузнєцова³, Л.А. Лівшиць

ном, асоційованим із відновленням тканин і цитопротекторним ефектом [9]. Цей цитокін кодується геном IL10, розташованим в локусі 1q31-q32 та складається з 5-и екзонів та 4-х інтронів [10]. На даний час для цього гена відомо 187 одонуклеотидних поліморфізмів [11]. Мононуклеотидна заміна -592C/A розташована в промоторній ділянці в сайті впізнання транскрипційного фактора Sp1 може спричинювати зміну спорідненості відповідного фактора транскрипції до сайту в послідовності ДНК, що обумовлює низький рівень експресії на рівні білкового продукту [12]. Функціональна роль цього поліморфного варіанту робить його можливим генетичним маркером ризику ішемічного інсульту.

Мета дослідження – оцінка ролі поліморфних варіантів -781C/T гена IL8 та -592C/A гена IL10 як генетичних маркерів ризику розвитку ішемічного інсульту.

Матеріали та методи

У рамках роботи було обстежено дві групи неспоріднених індивідів із різних регіонів України. Згідно з основними правилами біоетики при використанні людини в якості об'єкту дослідження, нами була отримана інформована згода на проведення дослідження від усіх досліджуваних індивідів, та було введено номенклатуру зразків ДНК, яка включала числовий код.

Група дослідження складалася з 183 пацієнтів (95 чоловіків, 88 жінок, середній вік – 64,6±9,1), які вижили після ішемічного інсульту та знаходились на стаціонарному лікуванні у відділенні судинної патології головного мозку ДУ «Інститут геронтології НАМН України». Усі пацієнти з цієї групи проходили комплексне клініко-неврологічне та генеалогічне обстеження відповідно до стандартного протоколу, програма якого включала: анамнез життя та хвороби; генеалогічний анамнез (наявність судинної патології у родичів 1-го ступеня споріднення); неврологічний огляд; оцінку ступеня порушення функцій та якості реабілітації за допомогою шкали Ренкін (Rankin scale) при надходженні хворого у відділення та при виписці; ультразвукове дуплексне дослідження судин голови та шиї на приладі EN VISOR (Philips); ехокардіографію на апараті MicroMaxx (SonoSite); електроенцефалографію на 16-канальному електроенцефалографі «Neurofax EEG-1100K» (Nihon Kohden); для верифікації характеру, розміру та локалізації вогнища ураження використовували КТ або МРТ головного мозку.

До контрольної групи увійшли 88 здорових людей старше 65 років (35 чоловіків, 53 жінки, середній вік 73,9±6,4) без історії ішемічного інсульту. Для осіб, які були включені в цю групу, також проводилось анкетування для збору клінічних даних стосовно наявних хронічних захворювань та артеріальної гіпертензії.

Генотипування. ДНК екстрагували з лейкоцитів периферичної крові відповідно до стандартних процедур – шляхом гідролізу лізатів клітин протеїназою К із наступною фенольною екстракцією. Ампліфікацію *in vitro* ділянок геному, що містили поліморфні варіанти -781C/T гена IL8 та -592C/A гена IL10, проводили за допомогою рутинної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів. Отримані продукти ПЛР гідролізували ендонуклеазами рестрикції як описано раніше [8, 13] та аналізували у 2% агарозному гелі.

Статистичний аналіз. Метод χ^2 був використаний для виявлення відповідності розподілу генотипів та алелей рівновазі Харді-Вайнберга. Тест Фішера (метод Mid-P) був використаний для оцінки різниці в розподілі генотипів та алелей. Для аналізу асоціації певного генотипу з розвитком ішемічного інсульту було розраховано відношення шансів (OR). При підрахунку усіх статистичних показників використовували 95% довірчий інтервал. Статистичний аналіз проводили з використанням статистичних пакетів GenePop та OpenEpi [14, 15].

Результати та їх обговорення

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів тим, що теоретично очікувались у кожній досліджуваній групі свідчив про випадковий розподіл генотипів відповідно до співвідношення Харді-Вайнберга (табл. 1).

У результаті молекулярного-генетичного аналізу алельних поліморфних варіантів гена IL8 було виявлено статистично достовірно ($p < 0,05$) вищу частоту носіїв алелю -781T у групі пацієнтів з інсультом (81,6%) порівняно з контрольною групою (70,1%). Більше того, виявилось, що носії алелю IL8 -781T мають майже вдвічі вищий ризик розвитку ішемічного інсульту (OR=1,886; ДІ 95%: 1,041-3,417). Ішемічне пошкодження є результатом каскаду клітинних і молекулярних подій, викликаних раптовою відсутністю припливу крові та подальшої реперфузії зони ішемії [2, 9]. Уражені й відмираючі

Таблиця 1 Розподіл генотипів за дослідженими поліморфними варіантами

Поліморфізм	Генотип	Ішемічний інсульт		Контроль	
		n	%	n	%
IL8 C-781T	CC	33	18,4%	26	29,9%
	CT	102	57,0%	45	51,7%
	TT	44	24,6%	16	18,4%
	Усього	179		87	
IL10 C-592A	CC	116	68,2%	49	57,0%
	CA	51	30,0%	29	33,7%
	AA	3	1,8%	8	9,3%
	Усього	170		86	

Таблиця 2 Розподіл генотипів за дослідженими поліморфними варіантами в групах пацієнтів із різною динамікою стану впродовж перших двох тижнів лікування

Поліморфізм	Генотип	Пацієнти з поліпшеним станом		Пацієнти без змін стану	
		n	%	n	%
IL8 C-781T	CC	6	11,1	26	22,6
	CT	34	63,0	60	52,2
	TT	14	25,9	29	25,2
	Усього	54		115	
IL10 C-592A	CC	43	81,1	65	60,7
	CA	10	18,9	39	36,4
	AA	0	0,0	3	2,8
	Усього	53		107	

клітини відіграють ключову роль в постішемичному запаленні, тому що вони продукують «молекули небезпеки», які активують імунну систему [9]. Надлишковий рівень прозапального інтерлейкіну 8, який має місце в індивідів-носіїв алелю -781T, за таких умов може сприяти поширенню зони ішемічного ураження та сприяти перетворенню зони ішемії на зону церебрального інфаркту.

Статистично достовірно ($p < 0,05$) вища частота носіїв алелю -592C гена IL10 спостерігалася в пацієнтів з ішемічним інсультом (98,2%) порівняно з контрольною групою (90,7%). За результатами розрахунку показника відношення шансів, носії цього алелю мають майже в 6 разів вищий ризик розвитку ішемічного інсульту (OR=5,71, 95% ДІ, 1,48-22,11). Можна припустити, що в таких осіб порушена первинна захисна запальна відповідь на церебральну ішемію внаслідок підвищеного вмісту прозапального інтерлейкіну 10. За таких умов тканини мозку, ймовірно, повільніше реагують на гіпоксію, що розвивається внаслідок ішемії, та не своєчасно відновлюють кровопостачання уражених ділянок, сприяючи некротичній загибелі клітин в зоні ураження [2, 9].

Із метою оцінки ролі генотипу індивіда в процесі покращання стану пацієнта в постінсультний період ми проаналізували розподіл генотипів для обох досліджених поліморфних варіантів в групі хворих зі зменшенням ступеня тяжкості інсульту (оцінювалась за допомогою шкали Rankin на 3-ю та 14-у добу лікування) і без змін у стані. Отримані результати наведені в табл. 2.

За результатами аналізу не було встановлено асоціації між генотипами за поліморфним варіантом C-781T гена IL8 і динамікою стану пацієнта. Однак, в осіб гомозиготних за алелем -592C гена IL10, в яких розвинувся ішемічний інсульт, виявилися майже втричі вищі (OR=2,76; 95% ДІ, 1,26-6,07) шанси на покращання стану (за шкалою Ренкін) протягом перших двох тижнів. Можливе пояснення отриманих даних полягає в тому, що секреція прозапальних цитокінів (інтерлейкіни 6, 8 та β) індукує експре-

сію молекул запалення [2, 9]. Ці молекули рекрутують циркулюючі лімфоцити, які інфільтруються в область ішемії та збільшують зону церебрального інфаркту, а високий рівень протизапального інтерлейкіну 10 може запобігати цьому процесу [1, 2, 9].

Висновки

На підставі отриманих статистичних відмінностей встановлено, що алелі -781T гена IL8 та -592C гена IL10 є факторами спадкової схильності до розвитку ішемічного інсульту. Крім того, алель -592C гена IL10 є генетичним маркером позитивної динаміки стану пацієнта в перші два тижні лікування.

Список використаної літератури

- Garcia-Bonilla L., Benakis C., Moore J., Iadecola C., Anrather J. Immune mechanisms in cerebral ischemic tolerance // *Front Neurosci.* - 2014. - Vol. 8. - P. 44.
- Moskowitz M.A., Lo E.H., Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments // *Neuron.* - 2010. - Vol. 67. - P. 181-198.
- Daly A.K., Day C.P., Donaldson P.T. Polymorphisms in immunoregulatory genes: towards individualized immunosuppressive therapy? // *Am J Pharmacogenomics.* - 2002. - Vol. 2. - P. 13-23.
- Emonts M., Hazes M.J., Houwing-Duistermaat J.J., van der Gaast-de Jongh C.E., de Vogel L., Han H.K., Wouters J.M., Laman J.D., Dolhain R.J. Polymorphisms in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: a case control study // *BMC Med Genet.* - 2011. - Vol. 12. - P. 36.
- Stanimirovic D., Satoh K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation // *Brain Pathol.* - 2000. - Vol. 10, N. 1. - P. 113-126.
- Mukaida N., Shiroo M., Matsushima K. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8 // *J. Immunol.* - 1989. - Vol. 143. - P. 1366-1371.
- Stelzer G., Dalah I., Iny Stein T., Satanower Y., Rosen N., Nativ N., Oz-Levi D., Olender T., Belinky F., Bahir I. et al. In-silico Human Genomics with GeneCards // *Hum Genomics.* - 2011. - Vol. 5. - P. 709-717 [http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=il8].
- Hacking D., Knight J.C., Rockett K., Brown H., Frampton J., Kwiatkowski D.P., Hull J., Udalova I.A. Increased in vivo transcription of an IL-8 haplotype associated with respiratory syncytial virus disease-susceptibility // *Genes Immun.* - 2004. - Vol. 5. - P. 274-282.
- Iadecola C., Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. // *Nat Med.* - 2011. - Vol. 17, N.7. - P.796-808.
- Eskdale J., Kube D., Tesch H., Gallagher G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5-prime flanking sequence // *Immunogenetics.* - 1997. - Vol. 46. - P. 120-128.
- Stelzer G., Dalah I., Iny Stein T., Satanower Y., Rosen N., Nativ N., Oz-Levi D., Olender T., Belinky F. et al. In-silico Human Genomics with GeneCards // *Hum Genomics.* - 2011. - Vol. 5. - P. 709-717 [http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=il10].
- Temple S.E., Lim E., Cheong K.Y., Almeida C.A., Price P., Ardlie K.G., Waterer G.W. Alleles carried at positions -819 and -592 of the IL10 promoter affect transcription following stimulation of peripheral blood cells with *Streptococcus pneumoniae* // *Immunogenetics.* - 2003. - Vol. 55. - P. 629-632.
- Costa G.C., da Costa Rocha M.O., Moreira P.R., Menezes C.A., Silva M.R., Gollob K.J., Dutra W.O. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy // *J Infect Dis.* - 2009. - Vol. 199. - P. 451-454.
- Rousset F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux // *Mol Ecol Resources.* - 2008. - Vol. 8. - P. 103-106.
- Sullivan K. M., Dean A., Soe M. M. OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health // *Public Health Rep.* - 2009. - 124, № 3. - P. 471-474.