

***IL-4* geno 590C/T polimorfizmas Kauno moterų populiacijoje ir sąsajos su plaučių ligomis**

Ieva Mirskytė, Asta Danilevičiūtė

Vytauto Didžiojo universitetas

Sergamumas plaučių ligomis didėja visame pasaulyje. Susirgimus dažnai lemia aplinkos veiksniai, tačiau genetinis faktorius yra vienas iš pagrindinių. Organizmo apsauginėse imuninėse reakcijose imunokompetentinės ląstelės sąveikauja su įvairiomis signalinėmis molekulėmis tarp kurių reikšmingi yra citokinai. Jų pagalba imuninės sistemos ląstelės geba gauti informaciją ir koordinuoti funkciją. Citokinai pasižymi plačiu veikimo spektru. Viena iš didžiausių citokinų grupių yra interliukinai, kurie atsakingi už specifinių imuninių reakcijų reguliavimą. Bandant nustatyti konkrečius plaučių ligų genų atlikta nemažai genitinių tyrimų. Genas *IL-4* buvo aprašomas daugelyje tyrimų susijusių su plaučių ligomis. Tyrimo tikslas - nustatyti Kauno regiono moterų genetinę įvairovę pagal *IL-4* 590C/T geno polimorfizmą bei įvertinti šių genotipų pasiskirstymą tarp sveikų ir plaučių ligomis sergančių moterų grupių. Tyrimo dalyvavo 151 moteris, iš jų 58 buvo sveikos moterys, likusios buvo sergančios plaučių ligomis. Rezultatai parodė, kad genotipų pasiskirstymas atitiko Hardy-Weinberg pusiausvyrą. CC genotipas buvo dominuojantis, CC dažnis - 0,66, CT genotipo dažnis - 0,30 ir TT - 0,04. Palyginus genotipų dažnius tarp abiejų moterų grupių, nustatyta, kad genotipo CC dažnis (0,74) buvo didesnis tarp sveikų moterų, o genotipai CT (0,35) ir TT (0,05) dažniau aptikti grupėje, kurioje moterys sergo plaučių ligomis, tačiau skirtumas nebuvo statistškai reikšmingas ($p = 0,21$).

Plaučių ligos, geno IL-4 590C/T polimorfizmas

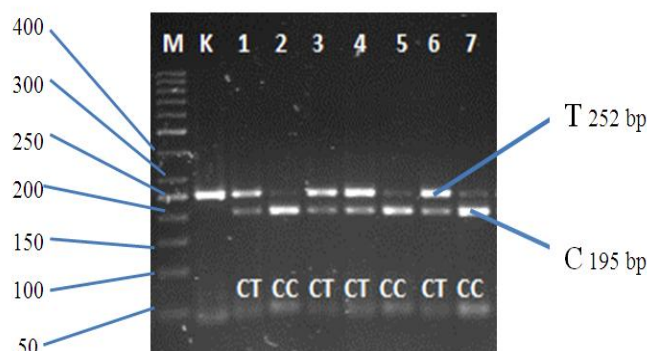
Įvadas

Manoma, kad iki 2020 m. mirštamumas nuo plaučių ligų, tokių kaip lėtinė obstrukcinė plaučių liga (LOPL), gali užimti trečią vietą, ypač besivystančiose šalyse (Hurt et al., 2000, Hoyert et al., 1999). Tai yra progresuojanti kvėpavimo takų liga, kuri sutrikdo plaučių praeinamumą ir dujų apykaitą ir susijusi su nenormalia plaučių uždegimine reakcija į įkvėpiamas kenksmingas daleles ar dujas. Prie LOPL galima priskirti chroninę plaučių emfizemą, chronišką bronchitą. Rūkymas yra vienas iš svarbių ir pagrindinių faktorių plaučių ligų etiologijoje, tačiau tik 10-20 % rūkančiųjų susergera. Kol kas nėra žinomi pagrindiniai faktoriai, sukiantys plaučių ligas, tačiau genetinis faktorius yra taip pat svarbus (Vladich et al., 2005; Trajkov et al., 2009). Atlikta nemažai mokslinių genitinių tyrimų siekiant nustatyti konkrečius plaučių ligų genų. Tyrimai daugiausia buvo atliekami su citokinų klasės chromosomomis. Buvo nustatinėjamos genų *IL-4*, *IL-13*, *IL-19*, *IL-5*, *CD14*, *HLA*, *TNF* ryšys su plaučių ligomis (Ober et al., 2000). Vienas iš genų, susijusių su plaučių ligomis, tokiomis kaip astma, atopinė astma, alerginė astma, lėtinė obstrukcinė plaučių liga, padidėjęs kvėpavimo takų jautrumas yra *IL-4* 590C/T, o *IL-4* 590T alelis yra susijęs su padidėjusia geno ekspresija *in vitro* ir didesniu IgE kiekiu *in vivo*, tuo tarpu kai C alelis susijęs su sumažėjusia geno ekspresija (Rosenwasser et al., 1995). T „didelės ekspresijos“ alelio dažnis varijuoja nuo 70 iki 80 proc. tarp azijiečių ir 15-25 proc. tarp europiečių (Gomes et al., 2012, Anovazzi et al., 2010; Chiang et al., 2007; Gyan et al., 2004; Hegab et al., 2004; Rosenwasser et al., 1995). T alelis yra susijęs su vėžiu (Huang et al., 2008; Vairaktaris et al., 2007; Varin and Gordon, 2009). Japonijoje atlikti tyrimai patvirtino ryšį tarp *IL-4* 590C/T geno polimorfizmo ir astmos (Noguchi, 1999). Walley ir Cookson, 1996 m. nustatė, kad *IL-4* 590C/T geno polimorfizmas susijęs su atopine astma, bei plaučių nepapankamumu.

Tyrimo tikslas - nustatyti Kauno regiono moterų genetinę įvairovę pagal *IL-4* 590C/T geno polimorfizmą bei įvertinti šių genotipų paplitimą tarp sveikų ir plaučių ligomis sergančių moterų grupių.

Tyrimų metodika

Kaune 2007 - 2009 metais buvo atliekamas Europos Sąjungos 6-sios Bendrosios Programos projektas HiWATE (Health impacts of long-term exposure to disinfection by-products in drinking water in Europe). Į tyrimą buvo įtrauktos visos nėščios Kauno mieste gyvenančios moterys, kurios sutiko dalyvauti tyrime ir pasirašė „Informuoto asmens sutikimo formą“ bei sutiko duoti biologinius kraujo mėginius. Pasinaudojus šio tyrimo duomenų baze, tyrimui buvo atrinktos visos moterys, kurios anketoje pažymėjo, kad sergo plaučių ligomis (93) ir atsitiktinai parinktos moterys, kurios nesirgo plaučių ligomis (58). DNR išskyrimui naudojome genominės DNR valymo rinkinį (SORPOclean™ Genomic DNA Extraction Module). *IL-4* polimorfizmui nustatyti buvo naudojami pradmenys: *IL-4* F 5'-ACTAGGCCTCACCTCACCTGATACG-3'; *IL-4* R 5'-GTTGTAATGCAGTCCTCCTG-3'. DNR buvo amplifikuojama polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) metu.



1 pav. *IL-4* geno polimorfizmas: M – markeris, kairėje – fragmentų dydis (bp), K – kontrolė (nekarpytas fragmentas), takelis 1, 3, 4, 6 – CT genotipas, takelis 2, 5, 7 – CC genotipas.

Fig.1. *IL-4* gene polymorphis: M-marker, K-control (uncut fragment), 1, 3, 4, 6 – genotype CT, 2, 5, 7 – genotype CC

PGR buvo atliekama 25μl tūryje. PGR produktas karpomas restriktaze FaqI (BsmFI) #ER1811 (UAB

„Fermentas“, Lietuva). Po karpymo PGR produktai buvo elektroforetiškai frakcionuojami 5 proc. agarozės gelyje. Gelis analizuojamas ir fotografuojamas ultravioletinėje šviesoje (UV Transilluminator, Herolab, Vokietija) (1 pav.) ir atliekama analizė. Apskaičiuotos genotipų dažnių reikšmės tarp sveikų ir plaučių ligomis sirgusių moterų grupių.

Rezultatai

Siekiant nustatyti Kauno regiono moterų genetinę įvairovę pagal *IL-4 590C/T* geno polimorfizmą bei įvertinti šių genotipų paplitimą tarp sveikų ir plaučių ligomis sirgusių moterų grupių, buvo ištirta 151 moteris. Moterų amžiaus svyravo nuo 16 iki 44 metų, amžiaus vidurkis - 27,4 metai (SD 4,98). Moterys suskirstytos į dvi grupes: sveikas ir sirgusias plaučių ligomis. Pirmąją grupę sudarė

58 (38,4 proc.), o antrąją 93 (61,6 proc.) moterys. Rūkymas yra vienas iš rizikos veiksnių, turinčių įtakos sergamumui plaučių ligomis, todėl tiriamosios buvo nagrinėtos pagal rūkymą. Rūkančios ir nerūkančios moterys abiejose grupėse pasiskirstė panašiai, statistiškai reikšmingų skirtumų nebuvo, $p = 0.126$. Rūkančiųjų grupėje plaučių ligomis sirgusių moterų buvo 62 proc., o nerūkančiųjų – 61,5 proc.

Nustatius visų tyrime dalyvavusių moterų *IL-4* genotipus, buvo bendrai apskaičiuota alelių ir genotipų dažniai (1 lentelė). Daugiau nei pusė tiriamųjų turėjo *CC* genotipą, kurio dažnis 0,66, o *TT* genotipo dažnis buvo labai mažas – 0,04. Apskaičiuotos genotipų dažnių reikšmės yra panašios į teorines genotipų dažnių reikšmes ir jų pasiskirstymas atitinka Hardy - Weinberg'o pusiausvyrą (1 lentelė).

1 lentelė. Tirtų moterų *IL-4* alelių ir genotipų dažniai Kauno moterų populiacijoje
Table 1. *TNF-α* genotype and allele frequencies in Kaunas women population

Genotipų dažnis <i>Genotype frequency</i>						Alelių dažnis <i>Allele frequency</i>	
<i>CC</i>		<i>CT</i>		<i>TT</i>		<i>C</i>	<i>T</i>
Teoriškai tikėtinas <i>Expected</i>	Ištirtas <i>Obtained</i>	Teoriškai tikėtinas <i>Expected</i>	Ištirtas <i>Obtained</i>	Teoriškai tikėtinas <i>Expected</i>	Ištirtas <i>Obtained</i>		
0,65	0,66	0,31	0,3	0,04	0,04	0,81	0,19

Buvo nustatytas *IL-4* alelių ir genotipų pasiskirstymas tarp sveikų ir plaučių ligomis sirgusių moterų (2 lentelė). Lyginant sveikų ir sirgusių plaučių ligomis moterų grupes, *C* alelio dažnis buvo didesnis sirgusių plaučių ligomis moterų grupėje (0,85), nei sveikųjų grupėje (0,75). *C* alelio dažnio pasiskirstymas tarp grupių buvo panašus (0,15 ir 0,22, atpatinkamai). Genotipų pasiskirstymas tarp sveikų ir plaučių ligomis sirgusių moterų atitiko Hardy-Weinberg'o dėsnį. Tarp sveikų moterų teoriškai tikėtinas dažnis

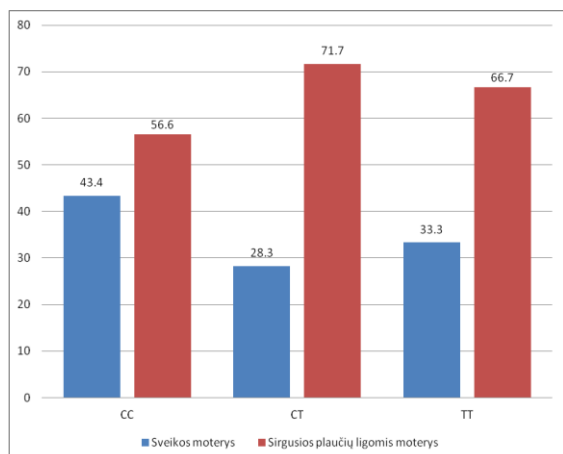
panašus į nustatytą, o tarp sirgusių plaučių ligomis visiškai sutapo (2 lentelė). Palyginus genotipų dažnius tarp sveikų ir plaučių ligomis sirgusių moterų grupių, nustatyta, kad abejose grupėse didžiausias yra *CC* (0,74 ir 0,6) genotipo dažnis, o mažiausias *TT* (0,04 ir 0,05) genotipo dažnis. Abiejų grupių tų pačių genotipų dažniai nežymiai skyrėsi vienas nuo kito, tačiau statistiškai reikšmingų skirtumų nebuvo ($p = 0,21$).

2 lentelė. *IL-4* genotipų ir alelių pasiskirstymas tarp sveikų ir plaučių ligomis sergusių individų
Table 2. *TNF-α* genotype and allele frequencies between cases and control

Tiriamųjų grupė <i>Subject</i>	Genotipų dažniai <i>Genotype frequency</i>						Alelių dažniai, P <i>Allele frequency</i>	
	<i>CC</i>		<i>CT</i>		<i>TT</i>		<i>C</i>	<i>T</i>
	Teoriškai tikėtinas, p <i>Expected</i>	Ištirtas, p (n) <i>Obtained</i>	Teoriškai tikėtinas, p <i>Expected</i>	Ištirtas, p (n) <i>Obtained</i>	Teoriškai tikėtinas, p <i>Expected</i>	Ištirtas, p (n) <i>Obtained</i>		
Sirgusios plaučių ligomis <i>Cases</i> (n=92)	0,72	0,74	0,26	0,22	0,02	0,04	0,85	0,15
Sveikos <i>Control</i> (n=59)	0,6	0,6	0,35	0,35	0,05	0,05	0,78	0,22

Lyginant genotipų pasiskirstymą tarp sveikų ir plaučių ligomis sirgusių moterų grupių, nustatyta statistiškai nereikšmingi ($p > 0,05$) skirtumai: *CC* genotipo pasiskirstymas tarp sveikų moterų buvo 43,4 proc., moterų

sirgusių plaučių ligomis – 56,6 proc. *TT* genotipo pasiskirstymas – 33,3 proc. ir 66,7 proc., atitinkamai (3 lentelė).



2 pav. Procentinis genotipų dažnių palyginimas tarp sveikų ir plaučių ligomis sirgusių moterų

Fig. 2. *IL-4* genotype prevalence between cases and control

Rezultatų aptarimas

Gauti rezultatai rodo, kad nėra statistškai reikšmingų skirtumų tarp genotipų ir alelių dažnių paplitimo tarp sveikų ir sirgusių plaučių ligomis moterų. Panašius rezultatus gavo ir Rad et al. (2010), kurie tyrė *IL-4* geno polimorfizmo skirtumus tarp sveikų ir sergančių astma individų. Gavome panašius rezultatus į Hebag et al (2004) skelbtus duomenis, kurie rodo, kad *CT* ir *TT* genotipų paplitimas yra didesnis tarp plaučių ligomis sirgusių moterų. Hebag et al. (2004) taip pat tyrė *IL-4* geno polimorfizmo skirtumus tarp sveikų individų ir sergančių lėtine obstrukcine plaučių liga. Buvo nustatyta, kad *CT* ir *TT* genotipų paplitimas buvo didesnis sergančiųjų tarpe ($p=0,410$).

Vienas iš pagrindinių įvairių plaučių ligų ir plaučių vėžio rizikos veiksnių yra tabako rūkymas. Tabako dūmuose esančios medžiagos keičia kvėpavimo takų epitelio atsaką esant genetiniam jautrumui, dėl ko greičiau vystosi kvėpavimo takų uždegimas. Rūkantys žmonės lėtiniu bronchitu serga 5,5 karto, o plaučių vėžiu - 10 kartų dažniau negu niekada nerūkiesieji. Todėl buvo svarbu įvertinti rūkymo, kaip plaučių ligų rizikos veiksnio, įtaką sergamumui plaučių ligomis tirtose Kauno moterų imtyje. Nustatyta, kad rūkymo dažnis tarp sveikų moterų ir sirgusių plaučių ligomis statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p=0,849$). Todėl galima teigti, kad rūkymas, tiriant *IL-4 -590C/T* polimorfizmą sveikų ir plaučių ligomis sirgusių moterų grupėse, žymios įtakos tyrimų rezultatas neturėjo.

Tyrimo dalyvavusios moterys anketoje buvo nurodžiusios, jog sirgo plaučių ligomis, tačiau nebuvo patikslinta ligos diagnozė, todėl šiame tyrime negalėjome įvertinti ryšio tarp konkrečiomis plaučių ligomis sirgusių moterų ir *IL-4 -590C/T* geno polimorfizmo. Tai galėjo turėti įtakos nustatant ryšio stiprumą tarp *IL-4 -590C/T* genotipų ir sergamumo plaučių ligomis.

Išvados

Lyginant genotipų dažnius tarp abiejų moterų grupių, nustatyta, kad genotipo *CC* dažnis (0,74) buvo didesnis tarp sveikų moterų, o genotipai *CT* (0,35) ir *TT* (0,05) dažniau aptikti grupėje, kurioje moterys sirgo plaučių ligomis, tačiau skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,21$). Mes negalime teigti, kad *IL-4 -590C/T* polimorfizmas susijęs su padidėjusiu sergamumu plaučių ligomis. Mūsų rezultatams galėjo turėti įtakos netiksli ligos diagnostika ir mažas tiriamųjų skaičius. Atliekant tolimesnius *IL-4* geno polimorfizmo tyrimus, reikėtų pakartoti tyrimą didesnėje tiriamųjų imtyje, o ligos atvejams priskirti dalyvius turinčius diagnozuotą kvėpavimo takų ligą.

Literatūra

1. ANOVAZZI, G., KIM, YJ., VIANA, AC., et al. Polymorphisms and haplotypes in the interleukin-4 gene are associated with chronic periodontitis in a Brazilian population. *J. Periodontol.* 2010, Vol. 81, p. 392–402.
2. CHIANG, C.H., TANG, Y.C., LIN, M.W., et al. Association between the *IL-4* promoter polymorphisms and asthma or severity of hyperresponsiveness in Taiwanese. *Respirology* 2007, Vol. 12, p. 42–48.
3. GYAN, BA., GOKA, B., CVETKOVIC, JT., et al. Allelic polymorphisms in the repeat and promoter regions of the interleukin-4 gene and malaria severity in Ghanaian children. *Clin. Exp. Immunol.* 2004, Vol. 138, p. 145–150.
4. HEGAB, AE., SAKAMOTO, T., SAITOH, W., et al. Polymorphisms of *IL4*, *IL13*, and *ADRB2* genes in COPD. *Chest*, 2004, Vol. 126, p. 1832–1839.
5. HOYERT, DL., KOCHANEK, KD., MURPHY, SL. Deaths: final data for 1997. *Natl Vital Stat Rep* 1999, Vol. 47, Iss 19, p. 1–104.
6. HUANG, FY., CHANG, TY., CHEN, MR., ET AL. The -590 C/T and 8375 A/G interleukin-4 polymorphisms are not associated with Kawasaki disease in Taiwanese children. *Hum. Immunol.* 2008, Vol. 69, p. 52–57.
7. HURD, S. The impact of COPD on lung health world wide. *Chest*, 2000, Iss. 117 p. 1–4S.
8. OBER, C, MOFFATT, MF. Contributing factors to the pathobiology. The genetics of asthma. *Clin Chest Med*, 2000, Vol. 21, p. 245–261.
9. RAD, IA., BAGHERI, M., RAHIMI-RAD, et al. *IFN-γ +874* and *IL-4 -590* Polymorphisms and Asthma Susceptibility in North West of Iran. *National Institute of Tuberculosis and Lung Disease*, 2010, Vol. 9, Iss. 4, p. 22–27.
10. ROSENWASSER, LJ., KLEMM, DJ., DRESBACK, JK., et al. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy*. 1995, Vol. 25 Suppl 2, p. 74–8.
11. TRAJKOV, D., MIRKOVSKA-STOJKOVIKJ, J., PETLICHKOVSKI, A., et al. Association of cytokine gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease in Macedonians. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2009, Vol. 8, Iss. 1, p. 31–42.
12. VAIRAKTARIS, E., YANNOPOULOS, A., VASSILIOU, S., et al. Strong association of interleukin-4 (-590 C/T) polymorphism with increased risk for oral squamous cell carcinoma in Europeans. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2007, Vol. 104, p. 796–802.
13. VARIN, A., GORDON, S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology*, 2009, Vol. 214, Iss. 7, p. 630–641.
14. VLADICH, FD., BRAZILLE, SM., STERN, D., et al. *IL-13 R130Q*, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. *J Clin Invest.* 2005, Vol. 115, Iss. 3, p. 747–54.
15. WALLEY AJ, COOKSON WO. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. *J Med Genet.* 1996, Vol. 33, Iss 8, p. 689–92.

Asta Danilevičiūtė, Ieva Mirskytė

IL-4 gene 590C / T polymorphism Kaunas women's population and il-4 gene relationship with lung diseases

Summary

Immune and inflammatory responses mediated by cytokines, play important roles in the pathophysiology of pulmonary diseases which leads to asthma susceptibility. In the protective immune reaction of organism, an immune competitive cell interacts with various signalling molecules, between which cytokines are the most important. With their help, the cells of immune system can get the information and coordinate function. Cytokines have a wide range of function. One of the biggest groups of cytokines is interleukins, which are responsible for regulation of specific immune reactions. The aim of this study was to investigate the frequencies of polymorphisms in the promoter regions *IL-4 590C/T* gene in Kaunas (Lithuania) woman population and determine single nucleotide polymorphism (SNP) between healthy women and woman with a history of pulmonary disease. In this study participated 151 woman, among them 58 healthy woman and 93 were with a history of pulmonary disease. The results showed that genotypes distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium in whole study population. CC genotype was dominant with 0.66, frequency of CT genotype - 0.30 and TT genotype - 0.04. There were no statistically significant differences ($p = 0.21$) found in the allele and genotype frequencies between healthy woman and woman with a history of pulmonary disease.

Pulmonary disease, IL-4 590C/T gene polymorphism

Gauta 2015 m. kovo mėn., atiduota spaudai 2015 m. balandžio mėn.

Ieva MIRSKYTĖ. Vytauto Didžiojo universitetas. Gamtos mokslų fakulteto Biologijos katedros magistrantė, studentė. Adresas: Vileikos 8, LT-44404, Kaunas, Lietuva. Tel. + 370 37 327 902, el. paštas: mirskyte.ieva@gmail.com

Ieva MIRSKYTĖ. Vytautas Magnus University, Faculty of Natural Sciences, Department of Biology, Master student. Address: Vileikos 8, LT-44404, Kaunas, Lithuania. Tel. + 370 37 327 902, email: mirskyte.ieva@gmail.com

Asta DANILEVIČIŪTĖ. Vytauto Didžiojo universitetas. Gamtos mokslų fakulteto Aplinkotyros katedra, Biomedicinos mokslų daktarė, lektorė. Adresas: Vileikos 8, LT-44404, Kaunas, Lietuva. Tel. +370 37 327904, el.paštas: a.danileviciute@gmf.vdu.lt

Asta DANILEVIČIŪTĖ. Vytautas Magnus University, Faculty of Natural Sciences, Department of Environmental sciences. PhD of Biomedical sciences, lector. Address: Vileikos 8, LT-44404, Kaunas, Lithuania. Tel. +370 37 327904, email: a.danileviciute@gmf.vdu.lt