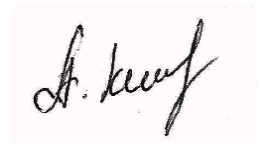


**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

Кучеренко Анастасія Михайлівна



УДК 575.11+577.21

**АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ ЦИТОКІНІВ (*IL6*, *IL8*, *IL10* ТА *IFNL4*)
У ПАЦІЄНТІВ З МОНОГЕННОЮ ТА МАСОВОЮ ПАТОЛОГІЄЮ**

03.00.22 – молекулярна генетика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ - 2015

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ та на кафедрі загальної та молекулярної генетики Навчально-наукового центру “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка, м. Київ.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Демидов Сергій Вікторович,
Навчально-науковий центр “Інститут біології”
Київського національного університету імені Тараса Шевченка, завідувач кафедри загальної та молекулярної генетики.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Терновська Тамара Костянтинівна,
Національний університет “Києво-Могилянська академія”,
м. Київ, завідувач кафедри біології факультету природничих наук;

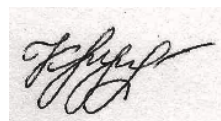
доктор медичних наук, професор
Акопян Гаяне Рубенівна,
ДУ “Інститут спадкової патології НАМН України”, м. Львів,
завідувач відділу клінічної генетики.

Захист дисертації відбудеться “27” жовтня 2015 р. о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ-680, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, 03680, м. Київ-680, вул. Заболотного, 150.

Автореферат розіслано “ ____ ” вересня 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми.

Накопичення знань про структуру та функціонування геному людини призвело до зміни уявлень про закономірності успадкування та маніфестації фенотипових ознак, а також вплинуло на підхід до аналізу спадкових захворювань людини. Окрім досліджень генів-детермінаторів, мутації в яких спричиняють патогенез моногенних патологій, розпочалися дослідження генів-модифікаторів, які відповідальні за варіювання пенетрантності та експресивності патологічних ознак у пацієнтів з однаковим генотипом за геном-детермінатором. Більше того, були сформовані уявлення про мультифакторні захворювання (МФЗ) та мультифакторні патологічні стани – полігенні ознаки, обумовлені взаємодіями між генами, а також генотипу з наявністю провокуючих факторів оточуючого середовища. До МФЗ належать більшість серцево-судинних захворювань, ожиріння, численні онкологічні та психічні патології, індивідуальні особливості відповіді на терапію, тощо (Lupski et al., 2011; Schork, 1997). Гени, окремі алельні варіанти яких в сукупності із іншими факторами визначають схильність до певних мультифакторних захворювань, отримали назву генів схильності. Молекулярно-генетичний аналіз генів схильності та відповідна індивідуалізована профілактика можуть суттєво знизити кількість осіб, у яких розвинеться мультифакторна патологія, або вплинути на стратегію лікування того чи іншого стану (Cardon and Bell, 2001).

На сьогодні, для пошуку генів, ймовірно залучених до розвитку МФЗ, існують два основні підходи. Перший з них полягає в рандомізованому дослідженні варіювання на рівні усього геному з наступним аналізом асоціації поліморфних варіантів з патологією, т. зв. GWAS (genome-wide association study). Другим є підхід вивчення генів-кандидатів. Він полягає в підборі вже відомих, відповідних функціонально генів та дослідженні асоціації їх поліморфних варіантів з певною патологією у порівнянні з контролем. Такі дослідження асоціацій дають можливість виявити залучення в патогенез МФЗ конкретних генів-кандидатів, визначити генетичні маркери підвищеного ризику захворювань (Cardon and Bell, 2001).

При використанні подібної стратегії дослідження одним з ключових моментів є вибір функціонально значущих поліморфних варіантів. На першому етапі досліджень асоціації в якості генів-кандидатів обиралися поліморфізми кодуєчих ділянок геному. Проте, значна частка поліморфних варіантів генів розташована в регуляторних частинах генів: промоторах, інтронах, 5'- та 3'- нетрансльованих ділянках. Варіації нуклеотидної послідовності ДНК цих ділянок можуть призводити до появи або зникнення цис-регуляторних елементів та регулювати таким чином різноманітні аспекти функціонування генів. Було встановлено, що поліморфізми в промоторних ділянках та першому інтроні потенційно здатні змінювати сайти посадки транскрипційних факторів та модифікувати рівень експресії як відповідного гена, так і профіль експресії всієї генної мережі. Поліморфні варіанти в інтронах можуть впливати на упізнавання меж інтрону та утворення альтернативних сплайсингових форм транскрипту. В той час як варіювання послідовності в нетрансльованих ділянках може обумовлювати стійкість транскрипту.

Таким чином, дослідження поліморфних варіантів регуляторних частин генів-кандидатів є перспективним напрямком пошуку генетичних маркерів, асоційованих з патогенезом мультифакторних патологій, хоча й вимагає значних зусиль в контексті встановлення молекулярних механізмів впливу на патогенез.

Цитокіни є важливими посередниками міжклітинних взаємодій, які регулюють імунну відповідь, клітинний цикл, беруть участь в численних фізіологічних та патологічних процесах (Turner et al., 2014). Зокрема, дослідженнями встановлено важливість координованої запальної відповіді на гіпоксичне ураження тканин головного мозку внаслідок ішемічного інсульту, яка на початкових етапах забезпечується прозапальними інтерлейкінами ІЛ-1, ІЛ-6 та хемокіном ІЛ-8 з наступним розвитком толерантності до зони ішемії, обумовленої дією протизапального ІЛ-10 (Garcia-Bonilla et al., 2014; Iadecola and Anrather, 2011). Не менш значущий вплив порушення балансу цитокінів має на підтримання вагітності. Точне чергування періодів переважання прозапальних чи протизапальних процесів дозволяє забезпечити фізіологічне протікання вагітності та толерування плоду (Lim et al., 1996). Окрім того, було доведено роль інтерлейкінів та хемокінів у забезпеченні відповіді тканин на механічне пошкодження та розвитку супутнього хронічного запалення внаслідок дисбалансу імунологічних факторів (зокрема ІЛ-6 та ІЛ-10) (Agrawal and Tsai, 2003; Reinach and Pokorny, 2008).

Водночас, поряд з серцево-судинними і репродуктивними патологіями, та хронічними запальними процесами, значною медичною проблемою сучасності є хронічні вірусні інфекції, зокрема гепатит С (Mohd Hanafiah et al., 2013). Зважаючи на той факт, що стандартним методом терапії гепатиту С є використання препаратів інтерферону, постає питання про вплив індивідуальних особливостей продукції ендогенних інтерферонів (зокрема IFN- λ , які є специфічними ефекторами на вірус гепатиту С) на ефективність подібної терапії (Tanaka et al., 2009).

Таким чином, зважаючи на значну проблему, яку становлять серцево-судинні, репродуктивні, а також хронічні запальні та інфекційні патології для України та світу, для даного дослідження в якості потенційних факторів ризику розвитку мультифакторних патологічних станів та фармакогенетичних маркерів були обрані функціональні поліморфізми генів цитокінів -174G/C гена *IL6*, -781C/T гена *IL8*, -592C/A та -1082G/A гена *IL10* та ss469415590 гена *IFNL4*, для яких доведений вплив на рівень продукції відповідних білків (Fishman et al., 1998; Heinzmann et al., 2004; Rady et al., 2004; Prokunina-Olsson et al., 2013).

Важливим обмеженням досліджень з пошуку асоціацій є необхідність врахування особливостей генетичної структури популяції, до якої належать пацієнти та індивіди контрольних груп. Вплив ефектів популяційної стратифікації також не дозволяє повноцінну екстраполяцію асоціативних досліджень, проведених в одній вибірці на інші популяційні групи (Halda and Ghosh, 2012). Таким чином, дуже важливим є пошук генів схильності у пацієнтів з МФЗ в окремих популяціях, та перевірка генетичних маркерів ризику на наявність асоціації з патогенезом МФЗ в конкретних вибірках.

На даний момент накопичено певний пул наукових робіт щодо вивчення асоціації поліморфних варіантів цитокінових генів з широким спектром

мультифакторних станів в різних світових популяціях за схемою “випадок – контроль”(Heinzmann et al., 2004; Emonts et al., 2011; Nedoszytko et al., 2014).

Проведення популяційних досліджень та пошук асоціації поліморфних варіантів генів-кандидатів з патогенезом МФЗ дозволить розширити уявлення про механізми впливу поліморфізму генів цитокінів на маніфестацію та розвиток цих станів, а також сформувати панелі інформативних генетичних маркерів для впровадження в медичну практику з метою прогнозування ризику розвитку та особливостей протікання соціально-значущих мультифакторних патологій, а також проведення персоналізованої терапії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетної теми «Молекулярно-генетичні дослідження чинників, що призводять до репродуктивних втрат та інвалідності» (шифр теми 2.2.4.13, № держ. реєстрації 0105U005341, 2011-2015 рр.). Роботу також виконано в рамках отриманих на конкурсних засадах проектів: «Молекулярні основи функціонування геному та його регуляція» (шифр теми 2.2.4.20, № держ. реєстрації 0104U000436, 2012-2016 рр.) та «Фармакогенетичне дослідження ДНК-маркерів для прогнозу перебігу та побічних ефектів лікування хронічного вірусного гепатиту С» (Грант Президента України для обдарованої молоді, договір 72/43, 2014 р.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є встановлення ролі поліморфних варіантів генів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4* як факторів спадкової схильності до ішемічного інсульту, порушень гомеостазу в системі матір – плід під час вагітності та розвитку рецидивуючих ерозій при спадкових дистрофіях строми рогівки, а також в якості генетичних чинників індивідуальної відповіді на терапію хронічного вірусного гепатиту С.

Для досягнення мети були поставлені основні завдання дослідження:

1. На основі аналізу клінічних даних сформувати групи спостереження та створити банк зразків ДНК пацієнтів з: а) різним ступенем запального процесу рогівки, зумовленого спадковою гратчастою дистрофією; б) ішемічним інсультом; в) звичним невиношуванням вагітності; г) різною ефективністю терапії хронічного гепатиту С пег-інтерфероном; - а також відповідних контрольних груп.
2. Провести біоінформаційний аналіз поліморфізму послідовності ДНК генів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4* з метою вибору функціонально значущих поліморфних варіантів.
3. Дослідити алельний поліморфізм генів *IL6*, *IL8*, *IL10*, *ESR1* та *IFNL4* в популяційній вибірці здорового населення України.
4. Проаналізувати алельний поліморфізм генів *IL6*, *IL8* та *IL10* в групах пацієнтів з а) різним ступенем запального процесу рогівки, зумовленого спадковою гратчастою дистрофією; б) ішемічним інсультом; в) звичним невиношуванням вагітності та у індивідів з відповідних контрольних груп.
5. Проаналізувати асоціацію певних алельних варіантів генів *IL6*, *IL8* та *IL10* з розвитком рецидивуючих ерозій у пацієнтів зі спадковою гратчастою дистрофією рогівки.

6. Дослідити асоціацію алельних варіантів генів *IL6*, *IL8* та *IL10* з розвитком ішемічного інсульту та певними проявами клінічного фенотипу.
7. Вивчити асоціацію алельних варіантів генів *IL6*, *IL8* та *IL10* та комбінованого генотипу за поліморфними варіантами генів *IL6* / *ESR1* зі звичним невиношуванням вагітності.
8. Проаналізувати алельний поліморфізм гена *IFNL4* в групі пацієнтів з хронічним гепатитом С та дослідити його асоціацію з різною ефективністю лікування пег-інтерфероном.

Об'єктом дослідження є молекулярно-генетичні чинники спадкової схильності до розвитку ішемічного інсульту та звичного невиношування вагітності, різного ступеню запального процесу рогівки, зумовленого спадковою гратчастою дистрофією, а також індивідуальної відповіді на терапію хронічного гепатиту С пег-інтерфероном.

Предмет дослідження - поліморфні варіанти генів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4*.

Методи дослідження - виділення та очищення геномної ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів, секвенування, біоінформатичний аналіз та статистична обробка даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Створено банк лейкоцитарної ДНК індивідів з різною ефективністю лікування хронічного гепатиту С пег-інтерфероном. Узагальнено дані про спектр поліморфізму ДНК генів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4*. Отримано дані про розповсюдження певних поліморфних варіантів цих генів у популяційних вибірках, серед пацієнтів: а) з ішемічним інсультом; б) звичним невиношуванням вагітності; в) різним ступенем запального процесу рогівки, зумовленого спадковою гратчастою дистрофією; г) різною ефективністю лікування хронічного гепатиту С пег-інтерфероном. Вперше встановлено, що алельні варіанти -174С гена *IL6*, -781С гена *IL8* та -592С гена *IL10* є модифікаторами фенотипу у пацієнтів з гратчастою дистрофією рогівки. Показано, що носійство алельних варіантів -781Т гена *IL8* та -592С гена *IL10* є фактором спадкової схильності до розвитку ішемічного інсульту. Доведено, що генотип -592 СС гена *IL10*, може розглядатися в якості маркера позитивного прогнозу на покращення стану (за шкалою Rankin) у пацієнтів з ішемічним інсультом протягом перших двох тижнів лікування. Встановлено, що генотип -592АА та носійство алеля -1082А гена *IL10* є факторами спадкової схильності до невиношування вагітності. Водночас, генотип, до складу якого входять алелі *IL6* -174G та *ESR1* -397C в гомозиготному стані може розглядатися в якості генетичного маркера успішного підтримання вагітності на ранніх термінах гестації. Доведено асоціацію поліморфізму ss469415590 гена *IFNL4* з ефективністю лікування пацієнтів з хронічним гепатитом С.

Практичне значення одержаних результатів. Створено панель діагностичних генетичних маркерів спадкової схильності до розвитку рецидивуючих ерозій у пацієнтів зі спадковими дистрофіями стромы рогівки, ішемічного інсульту, звичного невиношування вагітності та індивідуальних особливостей відповіді на лікування хронічного вірусного гепатиту С пег-інтерфероном. Отримані результати були впроваджені у відділенні реабілітації хворих з порушенням мозкового кровообігу клініки ДУ „Інститут геронтології ім.

Д.Ф. Чеботарьова НАМН України”, а також у Хмельницькій міській інфекційній лікарні, що підтверджується відповідними актами впровадження.

Особистий внесок здобувача. Весь обсяг експериментальної частини дисертації, пошук та обробку літературних даних виконано автором особисто. Планування досліджень, обговорення, аналіз, інтерпретацію отриманих даних і підготовку публікацій до друку здійснено разом із науковим керівником – завідувачем кафедри загальної та молекулярної генетики ННЦ “Інститут біології”, д.б.н., проф. С. В. Демидовим. Здобувачем особисто проведено: біоінформаційний аналіз досліджуваних поліморфних варіантів, виділення та очищення геномної ДНК із зразків периферійної крові індивідів з груп обстеження та контрольних груп, дизайн праймерів, підбір температурно-часових режимів проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР); параметрів електрофоретичного розділення продуктів ПЛР; умов проведення аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів для детекції поліморфних варіантів досліджуваних генів. Секвенування продуктів ПЛР досліджуваних фрагментів ділянок геному проведено у відділі функціональної геноміки ІМБГ НАН України. Аналіз клінічних даних проведено спільно з Дрожжиною Г. І. (ДУ “Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України”), Кузнєцовою С. М., Шульженко Д. В. (ДУ “Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України”), Хажилєнко К. Г. (ТОВ “Ісіда-IVF”), Воробійовою І. І. (ДУ “Інститут педіатрії акушерства та гінекології НАМН України”), Мороз Л. В. (Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова), Бобровою І. А. (ТОВ “Український лікувально-діагностичний центр”). З усіма перерахованими науковцями автор має спільні публікації.

Автор висловлює слова щирої вдячності завідувачу відділу геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, д.б.н., проф. Л. А. Лівшиць за допомогу в розробці стратегії досліджень, виборі підходів до проведення аналізу та узагальненні результатів досліджень.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи доповідались на вітчизняних та зарубіжних з’їздах та конференціях: VIII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, Україна, 2012), Науково-практичній конференції офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання» (Одеса, Україна, 2012), Європейській конференції з генетики людини (Нюрнберг, Німеччина, 2012), 110th DOG Congress (Берлін, Німеччина, 2012), V з’їзді Медичних генетиків України (Донецьк, Україна, 2012), V Международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Непостоянство генома» (Звенигород, Росія, 2012), Congress of the European Society of Ophthalmology (Копенгаген, Данія, 2013), Європейській конференції з генетики людини (Париж, Франція 2013), IX Всероссийской конференции с международным участием «Федоровские чтения-2013» (Москва, Росія, 2013), Європейській конференції з генетики людини (Мілан, Італія 2014), XVI міжнародній конференції “Актуальні напрямки в неврології: сьогодення та майбутнє” (Трускавець, Україна, 2014), науково-практичній конференції «Актуальні інфекційні захворювання. Клініка. Діагностика. Лікування та профілактика» (Київ, Україна, 2014).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 21 друковану працю, зокрема – 10 статей у спеціалізованих наукових виданнях, із них 6 - у фахових виданнях, та тези 11 доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях і з'їздах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів експериментальних досліджень, обговорення та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Роботу викладено на 136 сторінках стандартного друкованого тексту, проілюстровано 24 рисунками та 18 таблицями. Список використаної літератури охоплює 210 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом дослідження були зразки крові індивідів зі спадковою гратчастою дистрофією рогики, випадками ішемічного інсульту, звичним невиношуванням вагітності та різною відповіддю на противірусну комбіновану терапію хронічного гепатиту С, надані медичними закладами України: Державною установою “Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України” (Одеса), Державною установою “Інститут геронтології ім. Д.Ф.Чеботарьова НАМН України” (Київ), Державною установою “Інститут педіатрії акушерства та гінекології НАМН України” (Київ), ТОВ “Ісіда-IVF” (Київ), ТОВ “Сана-Мед” (Харків), Донецьким обласним спеціалізованим центром медичної генетики та пренатальної діагностики, Вінницьким національним медичним університетом ім. М. І. Пирогова, ТОВ “Український лікувально-діагностичний центр” (Київ). Використовувались також зразки крові індивідів з контрольних груп, які були спеціально підібрані для кожного виду патології та рекрутовані відповідними медичними закладами України. Контрольна група, яка представляла загальну популяцію України, складалась з неспоріднених донорів крові з різних регіонів України. Участь в дослідженні та забір крові проводились за умови інформованої згоди.

Виділення та очищення препаратів ДНК проводилося шляхом гідролізу лізатів клітин протеїназою К з наступною фенольною екстракцією (Маниатис и др., 1985). Ампліфікацію *in vitro* послідовностей ДНК ділянок досліджуваних генів та поліморфних локусів проводили за допомогою методу ПЛР (Saiki et al., 1988). Специфічний гідроліз ПЛР продуктів ендонуклеазами рестрикції проводили за умов, рекомендованих фірмою-виробником. Електрофоретичне розділення фрагментів ДНК проводили в 1,5-2%-ому агарозному гелі в неденатуруючих умовах. Секвенування проводилося на капілярному секвенаторі ABI Prism 3110 Genetic Analyser (Applied Biosystem, США). Статистичну обробку даних проводили за загальноприйнятими методами статистики з використанням програмних пакетів “GenePop” (Rousset F., 2007) та OpenEpi (Sullivan K., 2009). Біоінформатичний аналіз нуклеотидної послідовності досліджуваних генів та поліморфних варіантів проводили з використанням інтернет-ресурсів баз даних Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) GeneCards: The Human Gene Database (<http://www.genecards.org>), SNPinfo (<http://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/index.html>),

PROMO (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) та “1000 Genomes” (<http://browser.1000genomes.org/>).

Результати дослідження та обговорення

Вибір функціонально значущих поліморфних варіантів генів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4*. Беручи до уваги значний рівень поліморфізму нуклеотидних послідовностей, характерний для генів цитокінів, з метою вибору функціонально значущих поліморфних варіантів для дослідження в якості генетичних маркерів спадкової схильності до досліджуваних патологій і станів використовували ряд критеріїв. По-перше, поліморфізм мав корелювати з рівнем продукції відповідного білка або потенційно впливати на нього. Таку інформацію про значущість поліморфного варіанта отримували за допомогою інструментів передбачення ролі мононуклеотидної заміни онлайн-ресурсу SNPinfo. Окрім того, для мононуклеотидних заміни, розташованих в промоторних ділянках чи в першому інтроні, перевіряли можливий вплив на структуру сайтів упізнавання транскрипційних факторів з використанням програми PROMO. Окрім того, за наявності, брали до уваги результати експериментів *in vitro* та *in vivo*. По-друге, частота мінорного алеля в раніше досліджених європейських популяціях повинна була бути не менше 0,2. З урахуванням вище описаних критеріїв для дослідження були обрані наступні поліморфні варіанти: -174 G/C промоторної ділянки гена *IL6*, -781 C/T в першому інтроні гена *IL8*, -592C/A та -1082G/A промоторної ділянки гена *IL10* та ss469415590 в першому екзоні гена *IFNL4*. Серед обраних поліморфних варіантів, заміна -781C/T гена *IL8* асоційована з підвищеною продукцією відповідного білкового продукту (Hacking et al., 2004), поліморфізми *IL6* -174 C/G, *IL10* -592C/A та -1082 G/A – зі зниженим рівнем експресії відповідних генів (Fishman et al., 1998; Temple et al., 2003; Costa et al., 2009) та продукції інтерлейкінів, а ss469415590 призводить до появи рамки зчитування та синтезу IFN- λ 4 (Prokunina-Olsson et al., 2013).

Аналіз мононуклеотидних заміни -174G/C гена *IL6*, -781C/T гена *IL8*, -592C/A та -1082G/A гена *IL10* у здорових індивідів з популяції України. Для аналізу поліморфних варіантів генів *IL6*, *IL8* та *IL10*, які являють собою мононуклеотидні заміни, проводили ПДРФ-аналіз продуктів ампліфікації *in vitro* послідовностей ДНК за допомогою специфічних ендонуклеаз рестрикції з подальшим розділенням продуктів гідролізу за допомогою електрофорезу у 2% агарозному гелі (рис. 1-4).

За результатами дослідження розповсюдження поліморфних варіантів генів прозапальних та протизапальних інтерлейкінів (гени *IL6*, *IL8* та *IL10*) у вибірці, яка репрезентує населення з різних регіонів України, отримано дані про розподіл частот генотипів та алельних варіантів за досліджуваними генами. Найбільш розповсюдженими генотипами виявилися: -174GC гена *IL6* (частота – 0,443), -781CT гена *IL8* (частота – 0,450), -592CC (частота – 0,673) та -1082GA гена *IL10* (частота – 0,580). Мажорними алельними варіантами, в свою чергу, є: -174G гена *IL6*, -781C гена *IL8*, -592C та -1082G гена *IL10* - з відповідними частотами 0,563, 0,525, 0,820 та 0,520.

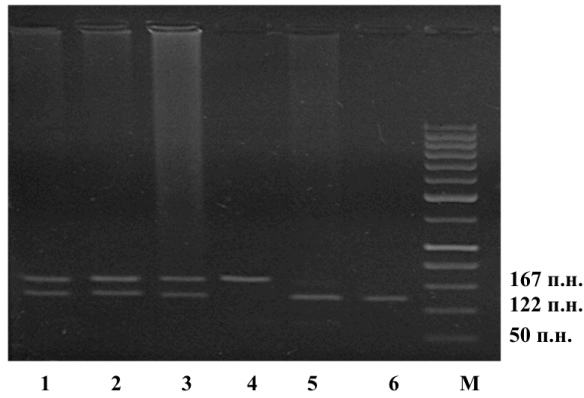


Рис. 1. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *IL6*, що утворились після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *NlaIII*: 1, 2, 3 - CG (гетерозигота); 4 - GG (гомозигота); 5, 6 - CC (гомозигота); М – маркер молекулярної маси (50 п.н.)

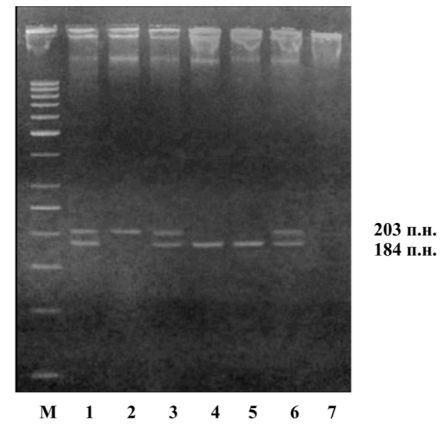


Рис. 2. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *IL8* після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *EcoRI*: М – маркер молекулярної маси (50 п.н.); 1, 3, 6 – СТ (гетерозигота); 2 – ТТ (гомозигота); 4, 5 – СС (гомозигота); 7 – негативний контроль

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за всіма поліморфними варіантами в популяційній групі свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності до співвідношення Харді-Вайнберга.

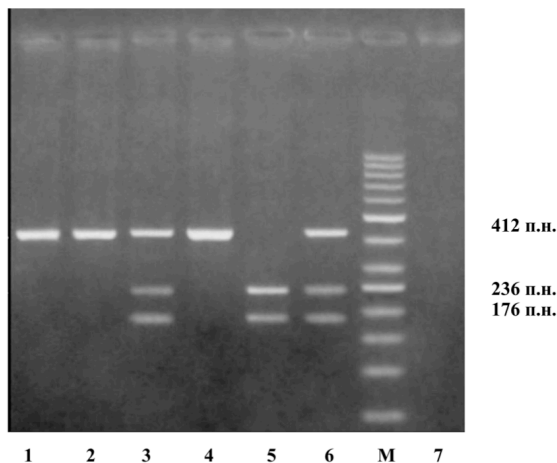


Рис. 3. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *IL10* після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *RsaI*: 1, 2, 4 - гомозиготи СС; 3, 6 – гетерозигота АС; 5 – гомозигота АА; М – маркер молекулярної маси (50 п.н.); 7 – негативний контроль (H₂O)

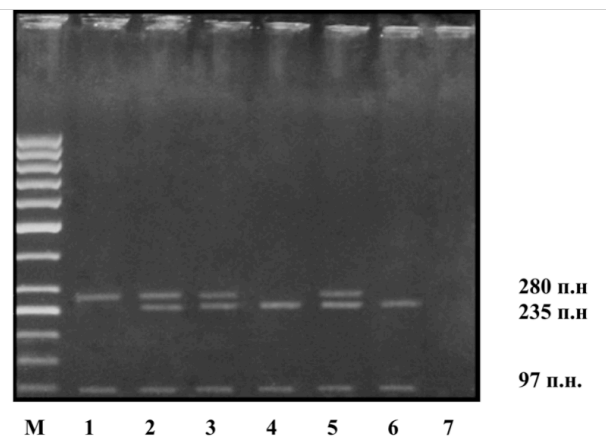


Рис. 4. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *IL10* після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *EcoNI*: 1 – АА (гомозигота); 2, 3, 5 – GА (гетерозиготи); 4, 6 – GГ (гомозигота); М – маркер молекулярної маси (50 п.н.); 7 – негативний контроль (H₂O)

Показники гетерозиготності досліджуваних локусів наведені у таблиці.

Таблиця

Фактична та теоретична гетерозиготність за досліджуваними локусами генів *IL6*, *IL8* та *IL10*

Локус	Гетерозиготність		χ^2	p
	H_o	H_e		
-174G/C ген <i>IL6</i>	0,443	0,492	0,87	0,35
-781C/T ген <i>IL8</i>	0,450	0,499	0,96	0,33
-592C/A ген <i>IL10</i>	0,290	0,289	0,00	0,97
-1082 G/A ген <i>IL10</i>	0,520	0,499	2,62	0,11

Примітка. H_o – фактична гетерозиготність; H_e – теоретична гетерозиготність

Як видно з таблиці, не було виявлено достовірної різниці між фактичною та теоретичною гетерозиготністю в усіх досліджуваних групах, що свідчить про нормальний розподіл алелів цих локусів у популяційній вибірці здорового населення з різних регіонів України.

Дослідження ролі мононуклеотидних замінів -174G/C гена *IL6*, -781C/T гена *IL8*, -592C/A гена *IL10* у пацієнтів з різним ступенем запалення, викликаним дистрофією рогівки. З метою виявлення можливої ролі досліджуваних поліморфних варіантів в якості модифікаторів фенотипу у пацієнтів з гратчастою дистрофією строми рогівки, проведено дослідження варіантів -174G/C гена *IL6*, -781C/T гена *IL8*, -592C/A гена *IL10* в групах пацієнтів з рецидивуючими ерозіями рогівки (56 осіб) та без ерозій в анамнезі (13 осіб). Частота носіїв алеля -174C гена *IL6* в контрольній популяційній групі (0,659) є достовірно ($p < 0,05$) нижчою порівняно з групою пацієнтів з ерозіями (0,780). Спостерігалася тенденція до зниження частоти носіїв алеля -174C в групі пацієнтів без ерозії (0,500) порівняно з пацієнтами з ерозіями (0,780), проте ці відмінності не є статистично достовірними.

При порівнянні розподілу генотипів в дослідній та контрольній групах виявили статистично достовірне ($p < 0,05$) перевищення частки носіїв алеля -592A гена *IL10* в групі пацієнтів з рецидивуючими ерозіями (0,483) порівняно з популяційною групою (0,327).

За результатами порівняння розподілу генотипів за алельним варіантом -781C/T гена *IL8* в досліджуваній, контрольній та популяційній групах встановлено, що частота генотипу -781TT гена *IL8*, асоційована з підвищеними рівнем продукції прозапального інтерлейкіну-8 є достовірно ($p < 0,05$) нижчою в групі пацієнтів з ерозіями (0,107) порівняно з групою пацієнтів без ерозій (0,385) та популяційним контролем (0,250) (рис. 5). Більше того, за розрахунками показника відношення шансів, встановлено, що індивіди-носії алеля -781C гена *IL8* мають вищий відносний ризик розвитку рецидивуючої ерозії рогівки, обумовленої гратчастою дистрофією (OR = 5,21; ДІ 95%: 1,28 – 21,16).

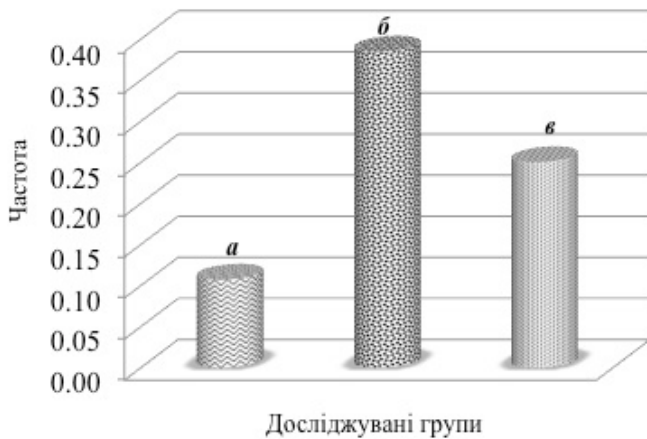


Рис. 5. Розподіл частоти індивідів з генотипом -781ТТ гена *IL8* серед:
а – пацієнтів з ерозіями;
б – контрольної групи пацієнтів без ерозій;
в – популяційної групи

Отримані результати укладаються в сучасні уявлення про механізми регенерації рогівки і, зокрема, при ерозіях. Відповідь епітелію рогівки на пошкодження обумовлена каскадом взаємодій між епітеліальними клітинами, кератоцитами строми рогівки, клітинами імунної системи і т.д., регульованих цитокинами (Agrawal and Tsai, 2003). Регенерація епітелію рогівки відбувається в кілька стадій: міграція, проліферація і диференціація, які знаходяться під контролем прозапальних цитокинів (зокрема, IL-6 та IL-8). В результаті загибелі клітин епітелію рогівки *in vivo* некротизовані клітини секретують так звані сигнали «небезпеки» (інтерферон- α , білки теплового шоку і т.п.), які ініціюють в тканинах відповідні запальні реакції (Matzinger, 2002). Ці сигнали «небезпеки» збільшують продукцію IL-6 та IL-8, які, в свою чергу, стимулюють міграцію і проліферацію епітеліальних клітин рогівки - ключові етапи в регенерації пошкодженої рогівки (Ebihara et al., 2011). Підвищений рівень прозапальних інтерлейкінів може запобігати поширенню ерозії рогівки та сприяти локалізації запального процесу за рахунок залучення моноцитів і подальшого видалення продуктів пошкодження або некрозу клітин. Швидкий фагоцитоз продуктів некрозу, ймовірно, сприяє гальмуванню механізмів самоіндукції рецидивуючих ерозій рогівки, таким чином, запобігаючи її розвитку. Відомо, що в процесах загоєння механічних пошкоджень рогівки інтерлейкін 10 відіграє роль агента, який урівноважує дію прозапальних цитокинів, забезпечує перехід від гострої фази запалення до процесів відновлення тканини та запобігає розвитку "вторинних" запальних ушкоджень (Reinach and Pokorny, 2008). Наявність алеля *IL10* -592A в генотипі зумовлює зниження рівня відповідного білка в тканинах. Тому, цілком імовірно, що баланс про-і протизапальних процесів у пацієнтів з гратчастою дистрофією рогівки - носіїв цього алеля порушується, що й створює умови для розвитку рецидивуючої ерозії.

Таким чином, можна вважати, що поліморфні варіанти інтерлейкінів *IL6*, *IL8*, *IL10* за рахунок впливу на розвиток запальної реакції, яка супроводжує рецидивуючі ерозії при стромальних дистрофіях рогівки, та дегенеративних змін можуть модифікувати прояв клінічного фенотипу гратчастої дистрофії рогівки. Отримані результати дозволяють зробити висновок про залученні досліджених поліморфізмів у формування індивідуальних особливостей запальної реакції при розвитку рецидивуючих ерозій рогівки у пацієнтів з гратчастою дистрофією рогівки.

Дослідження ролі мононуклеотидних замін -174G/C гена *IL6*, -781C/T гена *IL8*, -592C/A та -1082G/A гена *IL10* у пацієнтів з ішемічним інсультом. Молекулярно-генетичний аналіз мононуклеотидних замін -174G/C гена *IL6*, -781C/T гена *IL8*, -592C/A та -1082G/A гена *IL10* проводили в групі пацієнтів зі встановленим діагнозом ішемічний інсульт в групі пацієнтів з ішемічним інсультом (95 чоловіків та 88 жінок, середній вік $64,6 \pm 9,1$ років) та серед осіб похилого віку, без випадків інсульту в анамнезі (33 чоловіки та 55 жінок, середній вік $73 \pm 5,6$ років).

Порівняльний аналіз розподілу генотипів та алельних варіантів за поліморфними локусами -174G/C гена *IL6* та -1082G/A гена *IL10* в групі пацієнтів з ішемічним інсультом та контрольній групі показав відсутність статистично достовірних відмінностей між цими двома групами. За результатом порівняльного аналізу розподілу генотипів за локусом -781C/T гена *IL8* в досліджуваній та контрольній групі було виявлено статистично достовірно ($p < 0,05$) вищу частоту носіїв алеля *IL8* -781T у групі пацієнтів з інсультом (0,816) порівняно з контрольною групою (0,701) (рис 6). За розрахунками показника відношення шансів, встановлено, що носії алеля *IL8* -781T мають майже вдвічі вищий ризик розвитку ішемічного інсульту (OR = 1,89; ДІ 95%: 1,041–3,417).

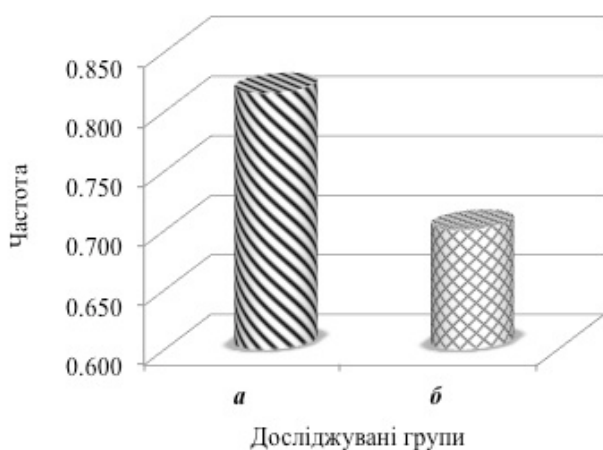


Рис. 6. Розподіл частоти індивідів носіїв алеля *IL8* -781 T серед:
а – пацієнтів з ішемічним інсультом;
б – контрольної групи

Статистично достовірно ($p < 0,05$) вища частота носіїв алеля -592C гена *IL10* спостерігалася у пацієнтів з ішемічним інсультом (0,982) порівняно з контрольною групою (0,907) (рис. 7). Носії цього алеля мають в 5 разів вищий ризик розвитку ішемічного інсульту (OR=5,71; ДІ 95%: 1,48–22,11).

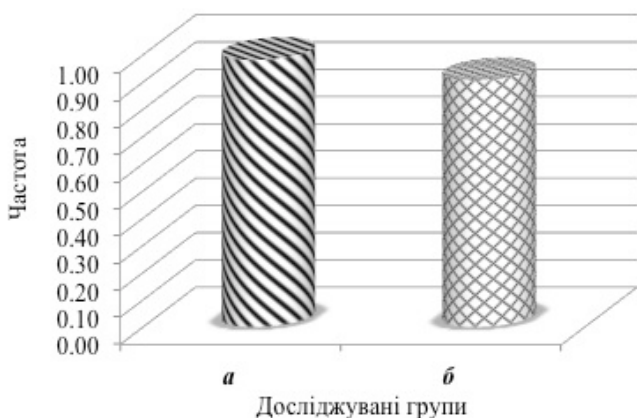


Рис. 7. Розподіл частоти індивідів носіїв алеля -592C гена *IL10* серед:
а – пацієнтів з ішемічним інсультом;
б – контрольної групи

На наступному етапі дослідження було перевірено гіпотезу про те, що генетичні особливості індивіда можуть впливати на процес відновлення після інсульту. З цією метою ми розподілили досліджувану групу пацієнтів на дві категорії – індивіди з позитивною динамікою відновлення (оцінювалась за допомогою шкали Rankin на 3 -у та 14 -у добу після інсульту) протягом перших двох тижнів – 53 особи, та індивіди без змін стану – 115 осіб. За результатами аналізу не було встановлено асоціації між генотипами за поліморфним варіантом -781 C/T гена *IL8* і динамікою стану пацієнта. При порівнянні розподілу генотипів за поліморфним локусом -592C/A *IL10* встановили статистично достовірно вищу частоту осіб, з гомозиготним генотипом -592CC (0,811) в групі пацієнтів з позитивною динамікою стану, порівняно з групою без змін у стані (0,607) (рис. 8).

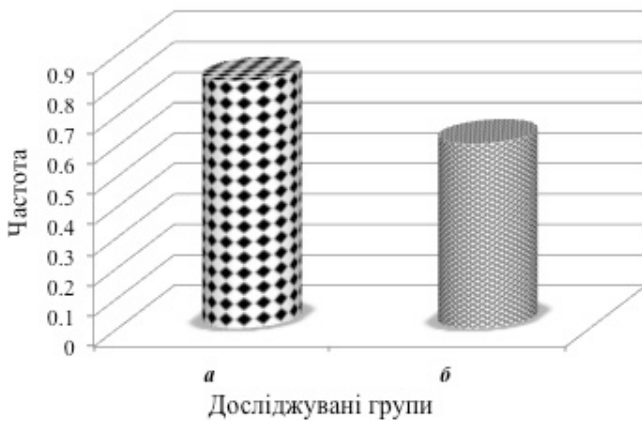


Рис. 8. Розподіл частоти індивідів з генотипом -592CC гена *IL10* серед:
а – пацієнтів з позитивною динамікою стану;
б – групи без змін у стані

У осіб гомозиготних за алелем -592C гена *IL10*, в яких розвинувся ішемічний інсульт, виявилися майже втричі вищі (OR=2,76; ДІ 95%: 1,26 – 6,07) шанси на покращення стану (за шкалою Rankin) протягом перших двох тижнів.

Пост-ішемічне запалення є результатом каскаду клітинних і молекулярних подій, викликаних раптовою відсутністю припливу крові і подальшої реперфузії зони ішемії. Воно починається в інтраваскулярному просторі одразу ж після артеріальної оклюзії. Окрім того, ішемія та наступна реперфузія призводять до активації макрофагів в периваскулярному просторі, а активовані макрофаги в свою чергу продукують прозапальні цитокіни. Ці прозапальні медіатори сприяють експресії генів молекул адгезії в ендотеліоцитах, а також призводять до порушень цілісності гематоенцефалічного бар'єру та інфільтрації нейтрофілів, моноцитів і лімфоцитів (Garcia-Bonilla et al., 2014). На наступному етапі розвитку запальної відповіді починається процес загибелі клітин. За рахунок високої щільності кровоносних судин в тканинах мозку, прозапальні медіатори, вивільнені паренхімальними клітинами у відповідь на клітинну загибель, за принципом зворотного зв'язку посилюють експресію генів цитокінів, хемокінів та молекул адгезії в судинному та периваскулярному компартменті (Moskowitz et al., 2010). Ці молекули, в свою чергу сприяють інфільтрації клітин з кровоносного русла в ішемічну тканину. Окрім цього, втрата міжклітинних контактів нейронів з гліальними клітинами внаслідок загибелі перших також індукує запальний сигналінг та активацію клітин мікроглії (Benakis et al., 2014). Таким чином, загибель нейронів починається у вогнищі ішемії і поширюється на оточуючі тканини (т.зв.

зону пенумбри). Паралельно з цим вивільнення нейротрансмітерів та зміни взаємодії нейронів з гліальними тканинами призводять до інтенсифікації пост-ішемічного запалення. За результатами *in vitro* та *in vivo* експериментальних досліджень показано, що наявність алеля -781T асоційована з підвищеним рівнем експресії гена *IL8* та продукції інтерлейкіну 8 (Hacking et al., 2004). Можемо припустити, що у індивідів носіїв алеля -781T підвищений рівень експресії інтерлейкіну 8 за умов пост-ішемічної імунної відповіді може сприяти інфільтрації клітин з кровоносного русла в ішемічну тканину, поширенню зони ішемічного ураження та сприяти перетворенню зони ішемії на зону церебрального інфаркту за рахунок пришвидшення переходу до стадії аутоімунної клітинної відповіді.

Відомо, що алельний варіант -592C асоційований з підвищеним рівнем продукції інтерлейкіну 10. Можна припустити, що у таких осіб порушена первинна захисна запальна відповідь на церебральну ішемію, внаслідок підвищеного вмісту протизапального інтерлейкіну 10. За таких умов тканини мозку, ймовірно, повільніше реагують на гіпоксію, що розвивається внаслідок ішемії та несвоєчасно відновлюють кровопостачання уражених ділянок, сприяючи некротичній загибелі клітин в зоні ураження (Moskowitz et al., 2010; Iadecola and Anrather, 2011).

Нами було показано, що у осіб гомозиготних за алелем -592C гена *IL10*, в яких розвинувся ішемічний інсульт шанси на покращення стану (за шкалою Rankin) протягом перших двох тижнів були майже втричі вищі. Таку закономірність можна пояснити з урахуванням існуючих даних про функцію інтерлейкіну 10 на більш пізніх етапах ішемічного пошкодження тканин мозку. Інтерлейкін 10 є імунорегуляторним цитокином, для якого показана як протизапальна дія, так і нейропротекторна активність (Garcia-Bonilla et al., 2014; Iadecola and Anrather, 2011). Його продукція пригнічує процес презентації антигенів, послаблюючи аутоімунну реакцію на пошкоджені ішемією тканини та розвиток толерантності до цих тканин.

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 позитивного прогнозу на відновлення пацієнта в перші два тижні лікування.

Асоціація мононуклеотидних замін -174G/C гена IL6, -781C/T гена IL8, -592C/A та -1082G/A гена IL10 зі звичним невиношуванням вагітності. Проаналізовано розподіл частот генотипів і алельних варіантів за цими поліморфними локусами в групі жінок зі звичним невиношуванням вагітності (110 осіб) та контрольній групі жінок, які народили хоча б одну дитину, зачату природнім шляхом та не мали ускладнень вагітності в анамнезі (106 осіб).

Інтерлейкін 6 є важливим цитокином для підтримання вагітності. Експерименти на модельних лініях мишей, а також дослідження цитокинового профілю абортівних тканин вказують на асоціацію низького рівня продукції цього цитокіну з втратами вагітності (Prins et al., 2012). Даний цитокин продукується переважно Th17-клітинами та є необхідним для підтримання балансу між Т-регуляторними та Th17-клітинами. Промоторний поліморфний варіант гена *IL6* -174 G/C асоційований зі змінами рівня інтерлейкіну 6 в тканинах. Більше того, він є чутливим до дії комплексу естроген-естрогеновий рецептор (Kristiansen, 2003). Нами було зроблено

припущення, що комбінація алелів за поліморфними варіантами генів *IL6* та *ESR1* може мати функціональну роль та бути асоційована з ризиком невиношування вагітності. За результатами порівняльного аналізу розподілу генотипів та алельних варіантів за поліморфними локусами -174G/C гена *IL6* та -397 C/T гена *ESR1* в групі пацієнтів з втратами вагітності та контрольній групі не виявлено статистично достовірних відмінностей. Проте аналіз розподілу комбінованих генотипів виявив статистично достовірно ($p < 0,05$) нижчу частоту осіб, гомозиготних за *IL6* -174G та *ESR1* -397C алелями в досліджуваній групі (0,026) порівняно з контрольною групою (0,094). Алель *IL6* -174 G асоційований з нормальним та високим рівнем продукції інтерлейкіну 6. За результатами досліджень на гестаційних тканинах жінок схильних до абортів було показано необхідність високого вмісту інтерлейкіну 6 для підтримання вагітності (Jasper et al., 2007). Експериментальні роботи з генетичними конструктами, які містили різні алелі за поліморфним варіантом *IL6* -174G/C показали, що наявність комплексу естроген-естрогеновий рецептор робить промотори з варіантом -174G чутливішими до факторів стимуляції експресії (Kristiansen, 2003). Враховуючи, що алель -397C гена *ESR1* асоційований з нормальною продукцією рецептора $ER\alpha$, комбінація цих алелів в гомозиготному стані в одному генотипі ймовірно призводить до добре регульованого та відносно високого рівня інтерлейкіну 6 в гестаційних тканинах. Таким чином, генотип, до складу якого входять алелі *IL6* -174G та *ESR1* -397C в гомозиготному стані може розглядатися в якості генетичного маркера успішного підтримання вагітності на ранніх термінах гестації.

За результатами порівняльного аналізу встановлено, що частота генотипу -592AA та за геном *IL10* статистично достовірно вища ($p < 0,05$) серед жінок з історією невиношування вагітності (0,064) в порівнянні з індивідами з контрольної групи (0,009). В свою чергу також встановлено, що частота індивідів-носіїв алеля--1082 A за геном *IL10* статистично достовірно вища ($p < 0,05$) серед жінок з історією невиношування вагітності (0,873) в порівнянні з індивідами з контрольної групи (0,764) (рис. 9).

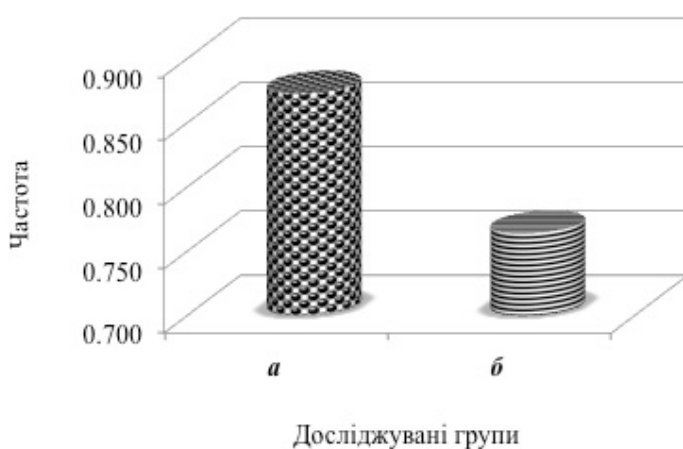


Рис. 9. Розподіл частоти індивідів-носіїв алеля -1082A гена *IL10* серед:
а – пацієнтів зі звичним невиношуванням вагітності;
б – контрольної групи

Показник відношення шансів свідчить про те, що у носіїв алеля -1082A ризик невиношування вдвічі вищий, ніж у індивідів без цього алеля в генотипі (OR = 2,12; ДІ 95 %: 1,03 - 4,34).

Численні роботи останніх років засвідчують, що рівень продукції цитокінів знаходиться під чітким генетичним контролем. Оскільки за даними багаточисленних публікацій серед Th2-цитокінів значну роль в процесі підтримання вагітності, відіграє IL-10, можна передбачити, що його функціональні поліморфні варіанти є потенційними маркерами схильності до звичного невиношування вагітності. Обидва алелі, -592A та -1082A є асоційованими зі зниженим рівнем продукції інтерлейкіну 10. Дані попередніх досліджень цих поліморфних варіантів в групах жінок з різними порушеннями вагітності, в тому числі й звичним невиношуванням, є суперечливими (Choi and Kwak-Kim, 2008). Попри те, що деякими дослідницькими групами показано зв'язок між генотипом за геном *IL10* та ризиком розвитку репродуктивних ускладнень, результати мета-аналізів спростовують ці результати. Подібні розбіжності, багато в чому можуть бути обумовлені неоднорідністю досліджуваних груп. Саме тому в нашому дослідженні особлива увага була приділена формуванню групи за чіткими критеріями з метою уніфікації пацієнтів за клінічним діагнозом та виключенням інших факторів ризику, окрім імуногенетичних. Наші результати свідчать на користь гіпотези про важливість нормального вмісту інтерлейкіну 10 в гестаційних тканинах для підтримання вагітності.

Дослідження ролі поліморфного варіанта *ss469415590* гена *IFNL4* у здорових індивідів з популяції України. Для проведення молекулярно-генетичного аналізу поліморфного варіанта *ss469415590* гена *IFNL4* нами було розроблено методику з використанням сайт-специфічної ПЛР (рис. 10).

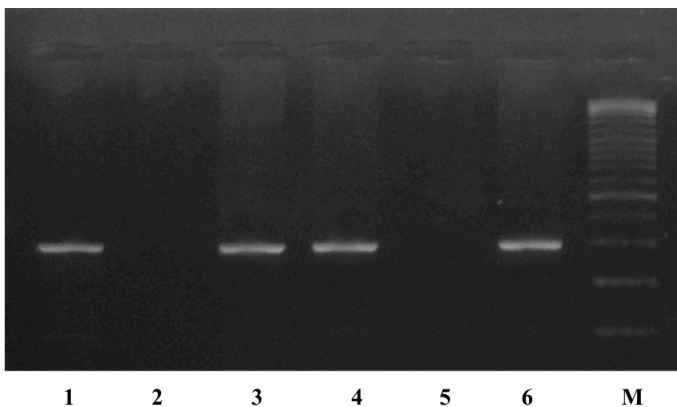


Рис. 10. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *IFNL4*, в 2%-ому агарозному гелі:

1, 2 – TT/TT (гомозигота);
 3, 4 – TT/ΔG (гетерозигота);
 5, 6 – ΔG/ΔG (гомозигота);
 М – маркер молекулярної маси (100 п.н.)

Контрольний зразок, гетерозиготний за поліморфним варіантом *ss469415590* був верифікований за допомогою повного секвенування нуклеотидної послідовності продуктів ампліфікації 1-го екзона гена *IFNL4* (рис. 11).

Розподіл генотипів та алелів за варіантом *ss469415590* гена аналізували серед 100 неспоріднених донорів з різних регіонів України з попередньо встановленим генотипом за варіантом *rs12979860* в гені *IL28B*. Частоти генотипів за обома досліджуваними варіантами відповідали очікуваними за рівновагою Харді-Вайнберга. Розподіл частот алелів для *ss469415590* становив TT – 0,665, ΔG – 0,335. Частоти алелів за *rs12979860* складала: С – 0,655, Т – 0,345.

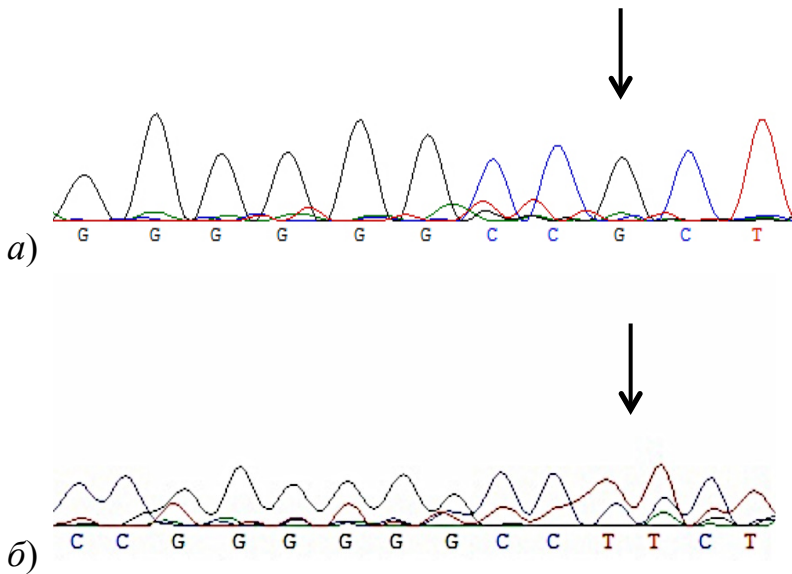


Рис. 11. Хроматограма секвенування продукту ПЛР гена *IFNL4* зразка ДНК індивіда, гетерозиготного за поліморфним варіантом ss469415590:

а) – алель ss469415590 ΔG;

б) – алель ss469415590 TT

Результати тесту відношення правдоподібності вказують на нерівновагу за зчепленням між досліджуваними поліморфізмами ($p < 0,0001$), мажорні алелі ss469415590 TT та rs12979860 C знаходяться в фазі зчеплення.

Дослідження ролі поліморфного варіанта ss469415590 гена *IFNL4* у пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С з різною ефективністю терапії пег-інтерфероном. Для дослідження можливої ролі поліморфного варіанта ss469415590 гена *IFNL4* в якості фармакогенетичного маркера прогнозу ефективності протівірусної комбінованої терапії пег-інтерфероном, нами було проведено аналіз розподілу генотипів та алельних варіантів за цим локусом в групі пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С зі стійкою вірусологічною відповіддю – 63 індивіда та зі слабкою, або відсутньою відповіддю на терапію – 29 індивідів. За результатами порівняльного аналізу встановлено достовірно ($p < 0,05$) вищу частоту носіїв алельного варіанту ss469415590 ΔG в групі пацієнтів з поганою відповіддю на протівірусну терапію пег-інтерфероном (0,862) порівняно з групою пацієнтів зі стійкою вірусологічною відповіддю (0,518) (рис. 12).

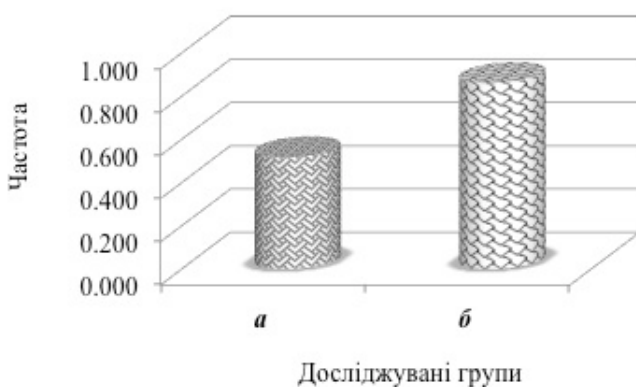


Рис. 12. Розподіл частоти індивідів-носіїв алеля ss469415590 ΔG гена *IFNL4* серед:

а – пацієнтів зі стійкою відповіддю на терапію пег-інтерфероном;

б – пацієнтів з поганою відповіддю на терапію пег-інтерфероном

Отримані дані про асоціацію алеля ss469415590 ΔG з поганою відповіддю на терапію вкладається в адитивну модель успадкування, тобто значення пенетрантності для гетерозигот є проміжним між значеннями пенетрантності ознаки для обох гомозигот. За результатами розрахунку показника відношення шансів, наявність алеля ss469415590 ΔG в генотипі пов'язана з трикратним збільшенням відносного ризику поганої відповіді на противірусну терапію пег-інтерфероном (OR = 3,06; ДІ 95%: 1,61 – 5,82).

На відміну від інших інтерферонів III типу, IFN- $\lambda 4$ має, очевидно, негативний вплив на механізми противірусного захисту. Точні шляхи впливу рівня IFN- $\lambda 4$ на ефективність противірусної терапії гепатиту С поки нез'ясовані. На даний момент сформовано декілька гіпотез. Перша з них сфокусована на впливі IFN- $\lambda 4$ на експресію інтерферон-стимульованих генів. Доведено, що IFN- $\lambda 4$ долучається до сигнального каскаду за рахунок утворення комплексу з IFN- λ рецептором та може індукувати експресію IFN-стимульованих генів через JAK-кіназний шлях передачі і активації транскрипційного сигнального шляху (Hamming et al., 2013). Особи, які мають ss469415590 ΔG алель, що створює відкриту рамку зчитування для транскрипції *IFNL4*, можуть продукувати певні невисокі рівні IFN- $\lambda 4$ білка, який в свою чергу індукує хоча й слабку, але стійку експресію інтерферон-стимульованих генів в печінці, що робить ці клітини менш чутливими до стимуляції за допомогою інтерферону- α (Prokunina-Olsson et al., 2013; Hamming et al., 2013). Було показано, що у таких осіб базальний рівень експресії інтерферон-стимульованих генів дещо вищий, і вони з меншою вірогідністю ефективно реагують терапію пег-інтерфероном та рибавірином (Ака et al., 2014; Meissner et al., 2014). З іншого боку, друга гіпотеза бере до уваги вплив продукції і секреції IFN- $\lambda 4$ на стан гепатоцитів. Існують експериментальні свідчення про порушення процесу секреції IFN- $\lambda 4$ клітинами печінки, ймовірно, за рахунок неефективного пост-транскрипційного глікозилювання (Hamming et al., 2013). Це призводить до інтрацелюлярного накопичення неглікозилюваного IFN- $\lambda 4$, який може мати цитотоксичну дію та сприяти загибелі гепатоцитів. Такий вплив може додатково погіршувати стан пацієнтів з ХВГС, посилюючи негативний вплив інфекційного процесу на стан печінки (Hamming et al., 2013; O'Brien et al., 2014).

Таким чином, алельний варіант ss469415590 ΔG є інформативним фармакогенетичним маркером прогнозу ефективності лікування пег-інтерфероном у пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С генотипу 1.

ВИСНОВКИ

Вирішення поставлених в даній роботі завдань дозволило охарактеризувати алельний поліморфізм генів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4*, а також асоціації поліморфних варіантів досліджуваних генів з патологічними станами та запропонувати інформативні маркери спадкової схильності до різного ступеню запального процесу рогівки, зумовленого спадковою гратчастою дистрофією, розвитку ішемічного інсульту та звичного невиношування вагітності, та різною ефективністю лікування пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С пег-інтерфероном.

1. Вперше проаналізовано та встановлено, що алельні варіанти -174С гена *IL6*, -781С гена *IL8* та -592А гена *IL10* є модифікаторами ступеню запального процесу у пацієнтів з спадковою гратчастою дистрофією рогівки.
2. Встановлено, що носійство алельних варіантів -781Т гена *IL8* та -592С гена *IL10* є фактором спадкової схильності до розвитку ішемічного інсульту.
3. Доведено, що генотип -592 СС гена *IL10*, може розглядатися в якості маркера позитивного прогнозу на відновлення (за шкалою Ренкін) у пацієнтів з ішемічним інсультом.
4. Показано, що генотип -592 АА та алель -1082 А гена *IL10* є факторами спадкової схильності до звичного невиношування вагітності. Водночас, комбінований генотип за алелями -397СС гена *ESR1* та -174GG гена *IL6* може розглядатися в якості генетичного маркера успішного підтримання вагітності на ранніх термінах гестації.
5. Доведено, що поліморфний варіант ss469415590 гена *IFNL4* є фармакогенетичним маркером ефективності лікування хронічного гепатиту С пег-інтерфероном.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Analysis of allelic polymorphism in the *ESR1* gene in the Ukraine's population / G. B. Livshyts, A. M. Kucherenko, S. S. Podlesna, S. A. Kravchenko, L. A. Livshits // *Cytology and Genetics*. – 2012. – Vol. 46, №. 4. – P. 220–226. *Особистий внесок здобувача - генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних.*
2. Особливості генетичного поліморфізму гена інтерлейкіну-6 у вагітних жінок / І. І. Воробйова, В. Б. Ткаченко, А. М. Кучеренко, Л. А. Лівшиць, Т. С. Толкач // *Перинатологія та педіатрія*. – 2012. - Т. 52, №. 4. – С. 43–44. *Особистий внесок здобувача – поповнення банку ДНК, узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами.*
3. *IL1B, IL6 and IL8 gene polymorphisms involvement in recurrent corneal erosion in patients with hereditary stromal corneal dystrophies* / A. M. Kucherenko, V. M. Pampukha, G. I. Drozhyna, L. A. Livshits // *Cytology and Genetics*. – 2013. – Vol. 47, №. 3. – P. 42–45. *Особистий внесок здобувача – узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних, узагальнення результатів.*
4. Особливості поліморфізму гену ІІ-10 (-592 С/А) та (-1082 G/A) у вагітних жінок / І. І. Воробйова, Т.С. Толкач, В. Б. Ткаченко, А. М. Кучеренко, С. М. Толкач // *Перинатологія та педіатрія*. – 2013. – Т. 53, №. 1. – С. 24–25. *Особистий внесок здобувача – поповнення банку ДНК, узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами.*
5. Особливості поліморфізму гену інтерлейкіну-8 (-781 С/Т) у вагітних жінок / І. І. Воробйова, А. М. Кучеренко, Т. С. Наквасюк, С. М. Толкач, Т. С. Черненко // *Перинатологія та педіатрія*. – 2013. – Т. 54, №. 2. – С. 22–25. *Особистий внесок здобувача – поповнення банку ДНК, узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних,*

генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами.

6. The role of *IL6* and *ESR1* gene polymorphisms as immunological factors of pregnancy maintenance / A. M. Kucherenko, I. I. Vorobiova, N. V. Rudakova, L. A. Livshits // *Biopolymers and Cell*. – 2013. - Vol. 29, №.5. – P. 402–405. *Особистий внесок здобувача – узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних, узагальнення результатів.*

7. Association of *IL8* and *IL10* gene allelic variants with ischemic stroke risk and prognosis / A. M. Kucherenko, D. V. Shulzhenko, S. M. Kuznetsova, S. V. Demydov, L. A. Livshits// *Biopolymers and Cell*. – 2014. – Vol. 30, №. 3. – P. 234–238. *Особистий внесок здобувача – узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних, узагальнення результатів.*

8. Recurrent pregnancy loss association with allelic variants of *IL8* and *IL10* genes / A. M. Kucherenko, R. V. Gulkovskyi, K. G. Khazhylenko, I. I. Vorobiova, T. S. Nakvasiuk, L. A. Livshits // *ScienceRise*. – 2014. – Vol. 2, №. 2. – P. 7–10. *Особистий внесок здобувача – узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних, узагальнення результатів.*

9. Study of *IFNL4* gene ss469415590 variant in Ukrainian population / A. M. Kucherenko, V. M. Pampukha, L. A. Livshits // *Biopolymers and Cell*. – 2014. - Vol. 30, №. 5. – P. 400–402. *Особистий внесок здобувача – розробка метода детекції поліморфних варіантів гена *IFNL4*, узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування популяційної вибірки за досліджуваним поліморфним варіантом, статистична обробка даних, узагальнення результатів.*

10. Поліморфізм гена *IFNL4* – новий фармакогенетичний маркер ефективності терапії хронічного вірусного гепатиту С / А. М. Кучеренко, К.Ю. Романчук, В.М. Пампуха, Л.В. Мороз, Л.А. Лівшиць // *Гепатологія*. – 2015. – Т. 27, №. 1. – С. 21–26. *Особистий внесок здобувача – розробка метода детекції поліморфних варіантів гена *IFNL4*, узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних, узагальнення результатів.*

11. Поліморфізм -592С/А гена ІІ-10 та 781С/Т гена ІІ-8 у жінок з клінічним діагнозом звичне невиношування вагітності / Р. Гулковський, В. Пампуха, А. Кучеренко, Л. Лівшиць // VIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, 3–6 квітня 2012.: тези доп. – Львів, 2012. – С. 130–131. *Особистий внесок здобувача - генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних.*

12. Ассоциация полиморфных вариантов генов интерлейкинов *IL1B*, *IL8*, *IL10* с развитием рецидивирующих эрозий у пациентов с наследственными дистрофиями стромы роговицы / Г. И. Дрожжина, В. Н. Пампуха, А. М. Кучеренко, Л. А. Лившиц // Научно-практична конференція офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання», 24–25 травня 2012.: тези доп. – Одеса, 2012. – С.9–10. *Особистий внесок здобувача –узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних.*

13. *IL1B* and *IL8* polymorphisms involvement in recurrent corneal erosion in patients with hereditary stromal corneal dystrophies / A.M. Kucherenko, V.M. Pampukha, G.I. Drozhzhyna, R.V. Gulkovskiy, L.A. Livshits // European human genetics conference, 23 - 26 June 2012.: abstracts. – Nürnberg, 2012. – P. 393–394. *Особистий внесок здобувача – генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних, узагальнення результатів.*
14. *IL1B* And *IL8* Polymorphisms Involvement In Recurrent Corneal Erosion In Patients With Hereditary Stromal Corneal Dystrophies / G.I. Drozhzhyna, A.M. Kucherenko, V.M. Pampukha, R.V. Gulkovskiy, L.A. Livshits // 110th DOG CONGRESS, 20-23 September 2012.: abstracts. – Berlin, 2012. – P. 81 – 82. *Особистий внесок здобувача – узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних.*
15. The role of *IL-6* and *ESR1* gene polymorphisms in pregnancy maintenance / Kucherenko A. M., Rudakova N. V., Vorobiova I. I., Livshits L. A. // V з'їзд Медичних генетиків України, 11-13 жовтня 2012.: тези доп. – Донецьк, 2012. – Т. 21, N. 2. – С.237. *Особистий внесок здобувача – поповнення банку ДНК, узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних, узагальнення результатів.*
16. *IL6* -174G/C вариант – модификатор фенотипа при наследственной дистрофии роговицы / А. М. Кучеренко, В. Н. Пампуха, Г. И. Дрожжина, Л. А. Лившиц // V Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Непостоянство генома», 3-7 декабря 2012.: тезисы док. – Звенигород, 2012 – С. 40. *Особистий внесок здобувача – поповнення банку ДНК, узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних.*
17. *IL1B*, *IL6* and *IL8* gene polymorphisms involvement in recurrent erosion in patients with lattice corneal dystrophy / G. Drozhzhyna, A. Kucherenko, V. Pampukha, T. Gaydamaka, L. Livshits // Congress of the European Society of Ophthalmology (SOE), 8–11 June 2013.: abstracts. – Copenhagen, 2013. – P. 65. *Особистий внесок здобувача – узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних.*
18. The role of *IL-6*, *IL-8*, and *IL-10* gene polymorphisms in the pathogenesis of recurrent pregnancy loss / A. Kucherenko, R. Gulkovskiy, I. Vorobiova, N. Rudakova, K. Khazhilenko, L. Livshits // European human genetics conference 8–11 June 2013.: abstracts. – Paris, 2013. – P. 592. *Особистий внесок здобувача – поповнення банку ДНК, узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних.*
19. Ассоциация полиморфных вариантов генов интерлейкинов ИЛ1β, ИЛ8, ИЛ10 с развитием воспалительной реакции при рецидивирующих эрозиях роговицы у пациентов с решетчатой дистрофией роговицы / А. М. Кучеренко, Г. И. Дрожжина, В. Н. Пампуха, Л. А. Лившиц // IX Всероссийская конференция с международным участием «Федоровские чтения-2013», 21-22 июня 2013.: тезисы док. – Москва, 2013. – С. 141–142. *Особистий внесок здобувача – поповнення банку ДНК, узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними*

варіантами, статистична обробка даних.

20. Allelic variants of *IL8* and *IL10* genes influence ischemic stroke risk and prognosis / A. Kucherenko, D. Shulzhenko, S. Kuznetsova, L. Livshits // European human genetics conference 1 - 4 June 2014.: abstracts. – Milano, 2014. – P. 420. *Особистий внесок здобувача – поповнення банку ДНК, узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних.*

21. Алельні варіанти генів *IL8* та *IL10* як маркери спадкової схильності до ішемічного інсульту / А. М Кучеренко., С. М. Кузнєцова, Д. В. Шульженко, Л. А. Лівшиць // XVI Международная конференция "Современные стратегии и тактика в неврологии", 23—25 апреля 2014 года.: тезисы док. – Трускавець, 2014 – С. 38–41. *Особистий внесок здобувача –узагальнення отриманих клініко-генеалогічних даних, генотипування індивідів за досліджуваними поліморфними варіантами, статистична обробка даних.*

АНОТАЦІЯ

Кучеренко А.М. Алельний поліморфізм генів цитокінів (*IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4*) у пацієнтів з моногенною та масовою патологією. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 - молекулярна генетика. - Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2015.

Дисертаційна робота здобувача присвячена дослідженню ролі поліморфних варіантів генів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4* як факторів спадкової схильності до ішемічного інсульту, порушень гомеостазу в системі “матір–плід” під час вагітності та розвитку рецидивуючих ерозій при спадкових дистрофіях строми рогівки, а також в якості генетичних чинників індивідуальної відповіді на терапію хронічного вірусного гепатиту С .

Вперше встановлено, що алельні варіанти -174С гена *IL6*, -781С гена *IL8* та -592С гена *IL10* є модифікаторами фенотипу у пацієнтів з гратчастою дистрофією строми рогівки. Показано, що носійство алельних варіантів -781Т гена *IL8* та -592С гена *IL10* є фактором спадкової схильності до розвитку ішемічного інсульту. Доведено, що генотип -592СС гена *IL10* є генетичним маркером позитивної динаміки стану пацієнта (за шкалою Rankin) протягом перших двох тижнів лікування. Встановлено, що генотип -592АА та носійство алеля -1082А гена *IL10* є факторами спадкової схильності до невиношування вагітності. Генотип, до складу якого входять алелі *IL6* -174G та *ESR1* -397С в гомозиготному стані може розглядатися в якості генетичного маркера успішного підтримання вагітності на ранніх термінах гестації. Доведено асоціацію поліморфізму ss469415590 гена *IFNL4* з ефективністю лікування хронічного гепатиту С пегільованим інтерфероном у пацієнтів з генотипом вірусу І.

Ключові слова: алельний поліморфізм, мононуклеотидна заміна, гени цитокінів, ішемічний інсульт, звичне невиношування вагітності, ерозія рогівки, ефективність терапії.

АННОТАЦИЯ

Кучеренко А.М. Аллельный полиморфизм генов цитокинов (*IL6*, *IL8*, *IL10* и *IFNL4*) у пациентов с моногенной и массовой патологией. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.22 - молекулярная генетика. - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2015.

Диссертационная работа соискателя посвящена исследованию роли полиморфных вариантов генов *IL6*, *IL8*, *IL10* и *IFNL4* в качестве факторов наследственной предрасположенности к ишемическому инсульту, нарушению гомеостаза в системе «мать-плод» во время беременности и развитию рецидивирующих эрозий при наследственных дистрофиях стромы роговицы, а также как генетических факторов индивидуального ответа на терапию хронического вирусного гепатита С.

Впервые установлено, что аллельные варианты -174С гена *IL6*, -781С гена *IL8* и -592С гена *IL10* являются модификаторами фенотипа у пациентов с решетчатой дистрофией стромы роговицы. Показано, что носительство аллелей -781Т гена *IL8* и -592С гена *IL10* является фактором наследственной предрасположенности к развитию ишемического инсульта. Доказано, что генотип -592СС гена *IL10* является генетическим маркером положительной динамики состояния пациента (по шкале Rankin) в первые две недели лечения. Установлено, что генотип -592АА и носительство аллеля -1082А гена *IL10* являются факторами наследственной предрасположенности к невынашиванию беременности. Генотип, в состав которого входят аллели *IL6* -174G и *ESR1* -397С в гомозиготном состоянии, может рассматриваться в качестве генетического маркера успешного протекания беременности на ранних сроках гестации. Доказана ассоциация полиморфизма ss469415590 гена *IFNL4* с эффективностью лечения хронического гепатита С пегилированным интерфероном у пациентов с генотипом вируса I.

Ключевые слова: аллельный полиморфизм, мононуклеотидная замена, гены цитокинов, ишемический инсульт, привычное невынашивание беременности, эрозия роговицы, эффективность терапии.

SUMMARY

Kucherenko A.M. Allelic polymorphism of cytokine genes (*IL6*, *IL8*, *IL10* and *IFNL4*) in patients with monogenic disorders and mass pathology. – Manuscript.

Thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, specialty 03.00.22 - molecular genetics. – Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

The study presented in the thesis aimed to clarify *IL6*, *IL8*, *IL10* and *IFNL4* gene polymorphic variants role as factors of genetic susceptibility to ischemic stroke, disturbance of homeostasis in the mother-foetus system, and recurrent erosion development in patients with hereditary corneal stromal dystrophy, as well as genetic factors of individual response to standard therapy of chronic viral hepatitis C.

IL6 gene -174G/C, *IL8* gene -781C/T, and *IL10* gene -592 C/A and -1082 G/A have been selected to study their role as modifying factors of recurrent corneal erosion (RE)

development in patients with lattice corneal dystrophy (LCD). Case group consisted of 56 individuals with RE history and 13 - without. It was found that *IL6* gene -174C allele carriers frequency in group without RE (0,500) was significantly lower comparing to patients with RE (0,780). Frequency of -781TT genotype was significantly lower in group with erosion (0,107) comparing to patients without erosion (0,385) and control (0,250). Carriers of *IL8* -781C allele with LCD have 5-fold increased risk of RE development (OR=5,208; 95% CI: 1,282 - 21,16). The frequency of *IL10* gene -592A allele carriers was significantly higher in group with RE (0,482) comparing to control group (0,327). Concluding, our results support the hypothesis of possible role of *IL6* gene -174G/C, *IL8* gene -781C/T and *IL10* gene -592 C/A polymorphisms as modifiers of inflammatory reaction development leading to corneal erosion.

The role of *IL6*, *IL8*, *IL10* polymorphic variants as genetic markers of ischemic stroke risk was studied in a group of 183 non-related patients with ischemic stroke. Control group included healthy individuals older than 65 years without history of ischemic stroke. The carriers of *IL8* -781T allele have increased risk of ischemic stroke development (OR=1,886; 95% CI: 1,041 - 3,417). The significantly higher frequency of *IL10* gene -592C allele carriers was observed in patients with ischemic stroke (0,982) comparing to control group (0,907). The carriers of this allele have almost 6-fold increased risk of ischemic stroke development (OR = 5,71; 95% CI: 1,48 - 22,11).

In order to evaluate the role of individual's genotype in the process of post-stroke improvement genotype distributions for studied polymorphic variants have been analysed in group of patients with decreased stroke severity (assessed using Rankin scale on the 3rd and the 14th days of treatment) and no changes in state. Individuals homozygous for *IL10* gene -592C allele have higher chances of improvement during the first two weeks of treatment (OR = 2,76; 95% CI: 1,26 - 6,07). Based on obtained significant differences it was established that *IL8* -781T and *IL10* -592C variants may be considered as the genetic markers of ischemic stroke development risk. On the other hand, *IL10* gene -592CC genotype is associated with positive post-stroke improvement prognosis.

Aiming to evaluate the association of *IL6* gene -174G/C, *IL8* gene -781C/T, and *IL10* gene -592 C/A and -1082G/A polymorphisms with disturbance of homeostasis in the mother-foetus system, we analysed them in case group of 110 unrelated women with history of idiopathic recurrent pregnancy loss (RPL). A control group consisted of 106 unrelated healthy women (aged $26,23 \pm 2,99$ years) with no history of RPL, who have given birth to at least one child conceived in natural way. The frequency of individuals with -592AA genotype was significantly higher in RPL group (0,066) comparing to control group (0,009). The -1082A allele carriers have RPL risk increased up to 2-fold (OR = 2,12; 95% CI: 1,03 - 4,34). Analysis of combined genotype frequencies revealed a statistically significant lower frequency of individuals homozygous both for *IL6* -174G and *ESR1* -397C alleles in case group (0,026) comparing to control group (0,094). Genotype comprising *IL6* -174G and *ESR1* -397C alleles in homozygous state could be considered as a genetic marker of successful pregnancy maintenance during early stages of gestation.

The next task of the study was to determine genotype and allele distribution for *IFNL4* gene ss469415590 in Ukrainian population and examine it for linkage with *IL28B*

gene rs12979860. Study group consisted of 100 unrelated donors of Eastern European origin representing the population of Ukraine. Allelic distribution for ss469415590 was: TT – 0,665, ΔG – 0,335. Allelic frequencies of rs12979860 were: C – 0,655, T – 0,345. The results of likelihood ratio test indicated linkage disequilibrium between studied variants ($p < 0,0001$), major alleles ss469415590TT and rs12979860C are in phase. Considering a linkage between ss469415590 variant and rs12979860 – crucial genetic marker of chronic hepatitis C treatment efficiency – in Ukrainian population, this polymorphism appears as a promising target for further investigation as a pharmacogenetic marker.

In order to examine association between *IFNL4* gene ss469415590 and treatment efficiency in group of Ukrainian PEG-interferon/ribavirin-treated chronic hepatitis C patients the study was conducted in a group of 92 patients with viral genotype I. According to the viral load changes, all the patients were distributed into two groups: case group – 29 patients with late or absent virological response, and control group – 63 patients with sustained virological response (SVR). Frequency of ss469415590ΔG carriers was significantly higher in patients without SVR (0,862) comparing to group with SVR (0,508). Obtained results imply ss469415590 TT/TT genotype positive association with SVR, whereas ss469415590 ΔG/ΔG genotype is associated with poor virological response. This association fits into additive model of inheritance, ss469415590 ΔG/ΔG homozygotes have 3,6-times higher risk of poor response to PEG-interferon/ribavirin combination therapy (OR = 3,62; 95% CI: 1,12 – 11,67). Concluding, in this study we present the evidence of ss469415590 being a valuable pharmacogenetic marker of chronic hepatitis C treatment efficiency in Ukrainian patients. While rs12979860 is in tight linkage disequilibrium with ss469415590 and is informative as well, the wide range of functional changes promoted by IFN-λ4 production makes ss469415590 more favourable and feasible genetic marker.

Keywords: allelic polymorphism, SNP, cytokine genes, ischemic stroke, recurrent pregnancy loss, corneal erosion, therapy effectiveness.