

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

На правах рукопису

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник
Демидов Сергій Вікторович,
д.б.н., професор

КИЇВ – 2015

ЗМІСТ

	стр.
СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	15
1.1 Сучасний погляд на фізіологічну роль цитокінів	15
1.1.1. Прозапальні інтерлейкіни як медіатори імунних реакцій	17
1.1.2. Роль протизапальних інтерлейкінів в регуляції імунної відповіді	19
1.2. Роль цитокінів в патофізіології поширених мультифакторних станів	20
1.2.1 Ген <i>IL6</i> та структурно-функціональна характеристика його білкового продукту	23
1.2.2. Ген <i>IL8</i> та структурно-функціональна характеристика його білкового продукту	26
1.2.3. Ген <i>IL10</i> та структурно-функціональна характеристика його білкового продукту	29
1.3. Інтерферони лямбда - важливі компоненти противірусного імунітету	31
1.3.1 Ген <i>IFNL4</i> та структурно-функціональна характеристика його білкового продукту	32
1.4. Підсумок	35
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	36
2.1. Обґрунтування вибору напрямку досліджень	36
2.2. Матеріали дослідження	37
2.3. Методи дослідження	39
2.3.1. Аналіз клінічних даних та формування вибірок	39
2.3.2. Виділення ДНК з лімфоцитів периферійної крові	42
2.3.3. Дизайн праймерів та оптимізація умов для проведення специфічної полімеразної ланцюгової реакції	43
2.3.4. Ампліфікація ДНК <i>in vitro</i>	44

	3
2.3.5. Ідентифікація мутацій методом ПДРФ	44
2.3.6. Електрофоретичне фракціонування фрагментів ДНК в агарозному гелі	44
2.3.7. Аналіз одонуклеотидних замін в генах <i>IL6</i> , <i>IL8</i> та <i>IL10</i> методом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів	45
2.3.8. Аналіз моонуклеотидної заміни -397 С/Т гена <i>ESR1</i>	46
2.3.9. Аналіз поліморфного варіанта ss469415590 гена <i>IFNL4</i> методом алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції	47
2.3.10 Використання біоінформатичних ресурсів та баз даних	49
2.3.11. Статистична обробка отриманих результатів	50
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	52
3.1. Вибір функціонально значущих поліморфних варіантів генів <i>IL6</i> , <i>IL8</i> , <i>IL10</i> та <i>IFNL4</i>	52
3.2. Аналіз моонуклеотидних замін -174G/С гена <i>IL6</i> , -781С/Т гена <i>IL8</i> , -592С/А та -1082G/А гена <i>IL10</i> у здорових індивідів з популяції України	54
3.3. Дослідження ролі моонуклеотидних замін -174G/С гена <i>IL6</i> , -781С/Т гена <i>IL8</i> , -592С/А гена <i>IL10</i> у пацієнтів з різним ступенем запалення, викликаним дистрофією рогівки	65
3.4. Дослідження ролі моонуклеотидних замін -174G/С гена <i>IL6</i> , -781С/Т гена <i>IL8</i> , -592С/А та -1082G/А гена <i>IL10</i> у пацієнтів з ішемічним інсультом	71
3.5. Дослідження ролі моонуклеотидних замін -174G/С гена <i>IL6</i> , -781С/Т гена <i>IL8</i> , -592С/А та -1082G/А гена <i>IL10</i> у пацієнтів зі звичним невиношуванням вагітності	79
3.6. Дослідження ролі поліморфного варіанта ss469415590 гена <i>IFNL4</i> у здорових індивідів з популяції України	87
3.7. Дослідження ролі поліморфного варіанта ss469415590 гена <i>IFNL4</i> у пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С з різною ефективністю терапії пег-інтерфероном	90

	4
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	
ДОСЛІДЖЕНЬ	93
ВИСНОВКИ	111
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	112
ДОДАТКИ	133

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

dNTP	–	суміш дезоксирибонуклеотид трифосфатів
IFN	–	інтерферон
IL	–	інтерлейкін
а.к.з.	–	амінокислотний залишок
БСА	–	бичачий сироватковий альбумін
ЗНВ	–	звичне невиношування вагітності
кДа	–	кілодальтон
МНЗ	–	мононуклеотидна заміна
МФЗ	–	мультифакторні захворювання
п.н.	–	пара нуклеотидів
ПДРФ	–	поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція
РЕ	–	рецидивуюча ерозія рогівки
т.п.н.	–	тисяча пар нуклеотидів
Тріс	–	тріс(гідроксиметил)амінометан
ХВГС	–	хронічний вірусний гепатит С

ВСТУП

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 спричинюють 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 цієї групи захворювань належать більшість серцево-судинних захворювань, ожиріння, численні онкологічні та психічні патології, індивідуальні особливості відповіді на терапію, тощо [1, 2]. В патогенез МФЗ залучено багато різних функціонально пов'язаних генів (генні мережі), які включають окрім детермінуючих генів, відповідальних за маніфестацію патології, другорядні, так звані гени-модифікатори, ефект яких значною мірою визначається факторами середовища. Гени, окремі алельні варіанти яких в сукупності із іншими факторами визначають схильність до певних мультифакторних станів 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 [3].

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) [4].

Альтернативним є підхід вивчення генів-кандидатів. Він полягає в підборі вже відомих, відповідних функціонально генів та дослідженні асоціації їх поліморфізмів 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 та на цій основі виявити групи осіб із підвищеним генетичним ризиком розвитку МФЗ [2, 3].

При використанні другої стратегії дослідження одним з ключових моментів є вибір функціонально значущих поліморфних варіантів. На першому етапі досліджень асоціації в якості генів-кандидатів обиралися поліморфізми кодуючих ділянок геному. Проте, переважна частка поліморфних варіантів генів розташована в регуляторних частинах генів: промоторах, інтронах, 5'- та 3'-нетрансльованих ділянках [5]. 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. Регуляція генів цитокінів, цитокінових рецепторів та цитокін-асоційованих білків є надзвичайно складно організованим процесом, який забезпечує фізіологічно необхідний баланс [6]. Зокрема, встановлено важливість координованої запальної відповіді на гіпоксичне ураження тканин головного мозку внаслідок ішемічного інсульту, яка на початкових етапах забезпечується прозапальними інтерлейкінами IL-1, IL-6 та хемокіном IL-8 з наступним розвитком толерантності до зони ішемії, обумовленої дією протизапального IL-10 [6, 7]. Не менш значущий вплив порушення балансу цитокінів має на підтримання вагітності. Точне чергування періодів переважання прозапальних чи протизапальних процесів дозволяє забезпечити фізіологічний перебіг вагітності та толерування плоду [9]. 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 IL-6 та IL-10) [9, 10].

Водночас, поряд з серцево-судинними і репродуктивними патологіями та хронічними запальними процесами, значною медичною проблемою сучасності є хронічні вірусні інфекції, зокрема гепатит С [12]. 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 [13].

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 *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4*, для яких доведений вплив на рівень продукції відповідних білків [14–17].

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 [18]. 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” [14, 18, 19].

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 перебігу 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*.

У роботі використовувались наступні **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 -781С 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 -592 АА 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 строми рогівки, ішемічного інсульту, звичної втрати вагітності та індивідуальних особливостей відповіді на лікування хронічного вірусного гепатиту С пег-інтерфероном. Отримані результати роботи 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”), Воробйовою 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 та 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Сучасний погляд на фізіологічну роль цитокінів

Протягом останніх 50 років спостерігається швидке зростання кількості досліджень, присвячених запальним захворюванням [6]. Накопичення інформації в цій галузі призвело до переосмислення дослідниками і лікарями патогенезу багатьох захворювань, включаючи серцево-судинні хвороби, хворобу Альцгеймера, діабет 1 та 2 типу, ожиріння, та визначення їх як запальних захворювань. Значно вплинули на формування цієї нової точки зору дослідження, які показали, що у індивідів з хронічними запальними захворюваннями спостерігається підвищений рівень в крові С-реактивного білка та інших маркерів запалення [21]. Відносно незначні запальні захворювання, такі як травми або алергії, також можуть підготувати ґрунт для більш серйозних хронічних запальних процесів, а багато запальних захворювань фактично розвиваються як кластери [6]. Запалення контролюється позаклітинними медіаторами та регуляторними молекулами організму-господаря, у тому числі цитокінами, факторами росту, ейкозаноїдами (простагландинами, і т.д.), системою комплементу і пептидами. Насправді, саме відкриття багатьох з цих посередників за останні 20 років покращило наше розуміння регуляції запального процесу, в той же час розкриваючи її складність [6]. Ці позаклітинні події доповнюються складними внутрішньоклітинними механізмами контролю сигналіngu, регульованими за рахунок здатності клітин формувати складний набір сигнальних шляхів, по мірі переходу з неактивного в активний стан у відповідь на індукцію запалення.

Цитокіни являють собою невеликі, гормоноподібні, сигнальні пептиди, які виробляються в клітинах, які активовані індукторами запалення [20]. Цитокіни були спершу названі лімфокінами або монокінами, з метою підкреслення клітини походження. В даний час термін "цитокіни" використовується тому, що будь-які ядерні клітини можуть секретувати їх. На сьогоднішній день описано більше 100 цитокінів з різними функціями і різним походженням [20]. Цитокіни, загалом, не накопичуються в клітинах, а синтезуються *de novo* після активації клітин. До цитокінів відносять лімфокіни, монокіни, інтерлейкіни, інтерферони, фактори росту і хемокіни. Цитокіни, на відміну від ендокринних гормонів, можуть діяти локально в тканинах, впливаючи на сусідні клітини (паракринна дія) або на самі цитокін-продукуючі клітини (аутокринна дія). У разі тривалої дії сильного запального стимулу, продукція цитокінів може стати надмірною. У такому випадку вони можуть потрапити в плазму крові та впливати на клітини віддалені від місця первинного запалення ендокринним чином.

Цитокіни діють через специфічні мембранні рецептори, знайдені на всіх клітинах, що утворюють людський організм [20]. Рецептори цитокінів також можуть зустрічатися в крові у вільній формі. Молекула цитокіну здатна стимулювати клітини тільки тоді, коли вона знаходиться в комплексі з відповідним клітинним рецептором. В той же час, зв'язування молекули цитокіну з розчинною вільною формою рецептору нейтралізує її. Структури рецепторів цитокінів значною мірою гомологічні, саме тому багато цитокінів мають різноспрямовані плейотропні ефекти. Деякі з цитокінів на додаток до їх плейотропної дії можуть здійснювати синергетичний вплив на одних клітинах, а на інших діяти антагоністично [19, 21]. Для цитокінів характерний клітино-специфічний механізм впливу. В результаті в кожній тканині формується складна і точно регульована цитокінова мережа [22].

Цитокіни контролюють всі етапи імунної відповіді: індукцію, ефекторну фазу і термінацію. Вони регулюють як вроджені механізми імунітету, так і специфічну клітинну та гуморальну імунну відповідь, впливаючи на проліферацію клітин, диференціювання та активацію В і Т-лімфоцитів, а також НК клітин, моноцитів /

макрофагів, гранулоцитів і кератиноцитів. Цитокіни також здійснюють вплив на функціонування та міграцію зрілих нейтрофілів, мастоцитів, базофілів і еозинофілів шляхом активації молекул адгезії і синтезу факторів хемотаксису [5, 19, 21]. На основі активності *in vivo* цитокіни можна розділити на прозапальні, протизапальні, гематопоетичні, мітогени (регулятори росту і проліферації клітин), та хемокіни [20].

Узагальнюючи вищенаведені дані можемо стверджувати, що цитокіни є ключовими модуляторами запальних процесів в людському організмі. Вони беруть участь в процесах гострого та хронічного запалення через складну і іноді, здавалося б, суперечливу мережу взаємодій. Краще розуміння того, як відбувається регуляція молекулярних шляхів запалення сприятиме більш точній ідентифікації медіаторів запальних процесів і нових мішеней для терапії запальних хвороб.

1.1.1. Прозапальні інтерлейкіни як медіатори імунних реакцій.

Первинна ланка захисту організму людини від мікроорганізмів та інших потенційно шкідливих стимулів представлена епітеліальними клітинами та макрофагами слизових оболонок. Ці клітини здатні розпізнавати консервативні молекули на поверхні клітин мікроорганізмів за допомогою різноманітних рецепторів та рекрутувати і активувати імунні клітини, зокрема нейтрофіли, до зони ураження [23]. Індукція каскаду захисних реакцій відбувається за рахунок продукції цими клітинами алармінів та прозапальних цитокінів, які в свою чергу сприяють вивільненню оточуючими клітинами хемокінів, цитокінів хемоаттракції, активуючи міграцію імунних клітин [23, 24].

Найпоширенішими прозапальними цитокінами є інтерлейкіни (наприклад ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12, ІЛ-15, ІЛ-17 і ІЛ-18). Вони здатні стимулювати як клітинну, так і гуморальну запальну відповідь - активацію, адгезію і агрегацію нейтрофілів та мастоцитів, проліферацію лімфоцитів, продукцію антитіл В-лімфоцитами [20]. Первинним цитокінами запалення є ІЛ-1 та фактор некрозу пухлин альфа (TNF- α), які продукуються у відповідь на запальні стимули [6]. Вони в свою чергу активують клітини до виробництва вторинних запальних цитокінів (ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-

12, IL-15, IL-17 і IL-18) [22]. Тригером експресії генів прозапальних інтерлейкінів, окрім інфекції, можуть також слугувати травми, ішемічне ушкодження тканин, вплив токсинів.

Попри важливу захисну функцію, прозапальні інтерлейкіни можуть мати негативний вплив на стан тканин та органів. Це пов'язано з тим, що тривалий запальний процес призводить до загибелі клітин, руйнування тканин та втрати ними можливості виконувати свої фізіологічні функції [6, 25]. Блокування шляхів активації каскадів IL-1 та TNF- α є ефективною терапевтичною стратегією при лікуванні низки запальних хвороб (ревматоїдний артрит, хронічне запалення кишечника, тощо) [27].

Виходячи з вищезазначеного, очевидним стає те, що порушення регуляції експресії генів прозапальних інтерлейкінів може мати значний внесок в патогенез деяких захворювань. На підтвердження цього умовиводу, низкою експериментальних досліджень на культурах клітин та біоптатах уражених тканин було показано значні зміни як рівня експресії генів прозапальних інтерлейкінів, так і вмісту відповідних білкових продуктів у порівнянні з фізіологічно здоровими тканинами [27, 28]. Одним з поширених чинників впливу на рівень експресії генів цитокінів є генетичний поліморфізм генних регуляторних ділянок, зокрема промоторних та інтронних [5]. Поліморфні варіанти послідовності ДНК в цих ділянках можуть призводити до зникнення чи появи *cis*-ділянок посадки транскрипційних факторів, змінюючи ефективність транскрипції та, в деяких випадках, вміст відповідного білкового продукту в тканинах [4, 18, 29]. Широке коло дослідників зосередило свої наукові інтереси на пошуку асоціацій між генотипом індивіда за певними поліморфними варіантами генів інтерлейкінів та ризиком розвитку патологій, пов'язаних з порушеннями запальної відповіді організму [14, 30, 31]. Варто зазначити, однак, що сама по собі функціональна значущість поліморфного варіанту не є запорукою його інформативності як генетичного маркера ризику розвитку тієї чи іншої патології. Окрім того, в процесі пошуку подібних асоціацій, було виявлено значні популяційно-специфічні розбіжності [17, 32].

1.1.2. Роль протизапальних інтерлейкінів в регуляції імунної відповіді.

Протизапальні цитокіни – це імунорегуляторні молекули, які контролюють дію прозапальних цитокінів. Тоді як прозапальні інтерлейкіни відповідають за розвиток гострої фази запального процесу, на противагу їм протизапальні цитокіни призводять до затихання імунних реакцій, розвитку толерантності оточуючих тканин до зони запалення та переходу до фази відновлення структури і функції пошкоджених запаленням тканин [24]. Основними протизапальними цитокінами є ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-11, ІЛ-13 та антагоніст рецептора ІЛ-1 (ІЛ-1RA). Специфічні рецептори цитокінів для ІЛ-1, TNF- α та ІЛ-18 функціонують як інгібітори прозапальних цитокінів. Вони здатні пригнічувати транскрипцію генів прозапальних цитокінів в клітинах-продуцента, індукувати синтез рецепторних антагоністів інтерлейкінів, посилювати експресію розчинних рецепторів і за допомогою регуляції знижувати щільність прозапальних рецепторів на клітинах [19, 21]. Так, ІЛ-4 та ІЛ-10 в моноцитах і макрофагах пригнічують продукцію ІЛ-12 та диференціацію Th1-клітин, а також блокують продукцію ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-8 в лімфоцитах, інгібуючи синтез ІЛ-2, інтерферону- γ . Крім того, ІЛ-10 сприяє руйнуванню рецепторів до TNF та активує продукцію рецепторних антагоністів інтерлейкінів [33–35].

Між прозапальними цитокінами та протизапальними компонентами імунної системи людини існує динамічний баланс. Регуляція запалення цитокінами та інгібіторами цитокінів ускладнюється тим, що імунна система має численні, іноді дубльовані, шляхи та багато елементів з подібними фізіологічними ефектами [36]. Крім того, всі протизапальні цитокіни, за винятком ІЛ-1RA, мають прозапальні властивості [37]. Ефекти будь-якого цитокіну залежать від строків його вивільнення, умов локального середовища, у якому він діє, присутності конкурентних або синергічних елементів, щільності рецепторів цитокіну та здатності тканини до відповіді [6,22,36].

Вищевикладене свідчить про те, що баланс між прозапальними і протизапальними цитокінами є важливим моментом в регуляції запальної реакції, і від нього багато в чому залежить характер перебігу хвороби та її результат.

Багато дослідників вважають, що цитокіновий дисбаланс є основою для розвитку хронічних запальних захворювань [20,36,38].

1.2 Роль цитокінів в патофізіології поширених мультифакторних станів

Зважаючи на широкий спектр фізіологічних процесів, до яких залучені цитокіни, обґрунтованим є дослідження порушень роботи цитокінової мережі, як чинника патогенезу широкого спектру мультифакторних патологій. Яскравим прикладом таких досліджень є роботи щодо з'ясування впливу цитокінів на загоєння механічних та хімічних пошкоджень епітелію рогівки [10,39,40]. Відновлення цілісності рогівки відбувається в результаті складного каскаду взаємодій між епітеліоцитами, кератоцитами стромы рогівки, сльозними залозами та нервовими клітинами, який регулюється цитокінами [10]. Так, прозапальні цитокіни IL-1, IL-6 та IL-8 регулюють проліферацію клітин рогівки, їх міграцію та деградацію залишків колагену, а також захищають зону ураження від бактеріальних інфекцій [10,28]. Паралельно з цим, з метою уникнення вторинного пошкодження рогівки інтенсивним запальним процесом, протизапальні цитокіни, зокрема IL-10, балансують та, з часом, інгібують продукцію прозапальних молекул [10,39]. На жаль, досліджень щодо асоціації поліморфних варіантів генів цитокінів з таким порушенням процесу загоєння рогівки як рецидивуюча ерозія не проводилось.

Запалення та імунна відповідь є ключовими елементами патофізіології ішемічного інсульту. Запальний процес починається у внутрішньосудинному компартменті, коли у відповідь на гіпоксію зростає продукція активних форм кисню, які в свою чергу активують систему комплементу, тромбоцити та ендотеліоцити [41–43]. Ішемічне пошкодження та реперфузія активують макрофаги периваскулярного простору, які починають продукувати прозапальні цитокіни, що сприяє інфільтрації лейкоцитів в уражену зону, але, водночас,

додатково пошкоджує цілісність гематоенцефалічного бар'єру [44]. Пошкоджені та гинучі клітини в зоні ішемічного пошкодження вивільнюють пурини та інші «сигнали небезпеки», сприяючи прогресії запалення та зростанню продукції цитокінів і хемокінів (зокрема IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, IL-20) [45,46]. Розгортання ішемічного каскаду призводить до розширення вогнища ураження, однак активний запальний процес має і позитивний вплив, знижуючи ймовірність інфекційного пошкодження тканин головного мозку, яке є однією з головних причин смертності після ішемічного інсульту [38]. Постішемічне запалення є самообмеженим процесом, який, в підсумку, стихає і готує підґрунтя для структурної та функціональної реорганізації пошкоджених тканин мозку. Все більше даних свідчить про те, що завершення стадії запалення організовано взаємодією великої кількості медіаторів, які активно пригнічують запальну відповідь, змінюють співвідношення Т-клітин різного типу, сприяють видаленню відмерлих клітин та розвитку протизапального середовища [47,48]. Низка досліджень була присвячена пошуку асоціації між генотипом за поліморфними варіантами генів прозапальних цитокінів з ризиком розвитку ішемічного інсульту, однак отримані результати є суперечливими та не дозволяють зробити чіткий висновок про наявність чи відсутність такої асоціації [49–52].

Серед причин ідіопатичного непліддя щоразу частіше розглядається імуногенетичні механізми. Для нормального перебігу вагітності необхідно, щоб імунна система матері була здатна її розпізнати [53,54]. В 50-их роках минулого століття було перше висунуто гіпотезу, згідно з якою плід розглядається як напівалогенний трансплантат. Незважаючи на те, що з цього часу було проведено багато досліджень в галузі імунології репродукції, з'ясовані лише деякі механізми імунологічної толерантності материнського організму до плоду [55]. На стадії імплантації та ранніх стадіях розвитку ембріона толерантність забезпечується переважно неспецифічними механізмами, такими як гормональна імуносупресія (хоріонічний гонадотропін, прогестерон) [56,57] та певними специфічними властивостями трофобласта та плаценти [53,58,59].

Одними із перших змін в периферичній імунній відповіді є збільшення кількості лейкоцитів [53,59]. Найбільш вивченими є зміни стану Т-лімфоцитів. При цьому особливий інтерес приділяється ролі балансу функціональних типів Т-хелперів Th1/Th2/Th17 – як ключової ланки у втратах вагітності імунної природи [60–62]. Т-хелпери утворюються шляхом диференціації наївних Th0 клітин в один з чотирьох типів: Th1/Th2/Th17/Treg. Кожен з них характеризується унікальним цитокіновим профілем та функціями. Th1-клітини стимулюють запалення та клітинний імунітет шляхом активації цитотоксичних Т-клітин та макрофагів. На противагу, Th2-клітини продукують протизапальні інтерлейкіни та виступають в ролі антагоністів для Th1-клітин [63]. Th17-клітини селективно виробляють IL-17 і беруть участь в процесах аутоімунної відповіді та відторгнення тканин [64]. Treg-клітини відповідають за підтримання периферійної толерантності до тканин [65]. Докази, отримані в ході досліджень в когортах жінок, а також на тваринних моделях, вказують на позитивний ефект переважання Th2-цитокінів над Th1 [66,67]. Показано, що зниження кількості Treg-клітин може бути асоційоване з порушеннями імплантації, а переважання Th17-клітин – зі звичним невиношуванням вагітності [60,68]. Дослідження цитокінового профілю жінок зі звичним невиношуванням вагітності показало знижені рівні цитокінів IL-6, IL-8 та IL-10, порівняно з жінками без репродуктивних патологій [66,69]. В світі проводяться численні дослідження асоціації функціональних поліморфних варіантів генів цитокінів зі звичним невиношуванням вагітності. Однак більшість з них не підтверджують попередні знахідки, залишаючи відкритим питання про залучення поліморфізмів в патогенез ЗНВ [70].

Таким чином, пошук асоціацій між генотипом індивіда за певними поліморфними варіантами генів прозапальних інтерлейкінів та ризиком розвитку мультифакторних патологій є перспективним напрямом дослідження, який може дозволити одночасно поглибити знання щодо молекулярно-генетичних механізмів розвитку тієї чи іншої патології, а також встановити потенційні мішені для пошуку нових терапевтичних стратегій.

1.2.1 Ген *IL6* та структурно-функціональна характеристика його білкового продукту. Інтерлейкін 6 (IL-6) - плеїотропний цитокін, який в основному виробляється при гострих і хронічних запаленнях [71]. IL-6 продукується рядом клітин, зокрема мононуклеарними фагоцитами, Т-клітинами, В-лімфоцитами, фібробластами, ендотеліальними клітинами, кератиноцитами, гепатоцитами, клітинами кісткового мозку та міоцитами [72,73] Даний цитокін бере участь в гематопоезі, є необхідним для фінального дозрівання В-клітин та плазмоцитів, що продукують антитіла [34, 35], активації Т-клітин, диференціації та регуляції Th2 та Treg фенотипів [36, 37], а також секреції білків гострої фази клітинами печінки [78]. Особливу роль IL-6 відіграє у стимуляції імунної відповіді при травматичному ураженні тканини, опіках, механічних та ішемічних пошкодженнях, що ведуть до запалення [28,40,79].

Вперше мРНК IL-6 було ідентифіковано двома незалежними дослідницькими групами в ході експериментів зі стимуляції фібробластів [39, 40]. Протягом наступних кількох років було ідентифіковано декілька білків (протеїн 26 кДа [82,83], стимулюючий фактор В-клітин 2 [84], фактор росту гібридом [85]), які пізніше виявилися одним і тим самим білком, якому дали назву IL-6 [86].

Ген інтерлейкіну-6 (*IL6*, Gene ID: 3569) людини розташований на короткому плечі 7-ої хромосоми в хромосомному локусі 7p21 [87], складається з 6 екзонів та 5 інтронів (рис.1.1).

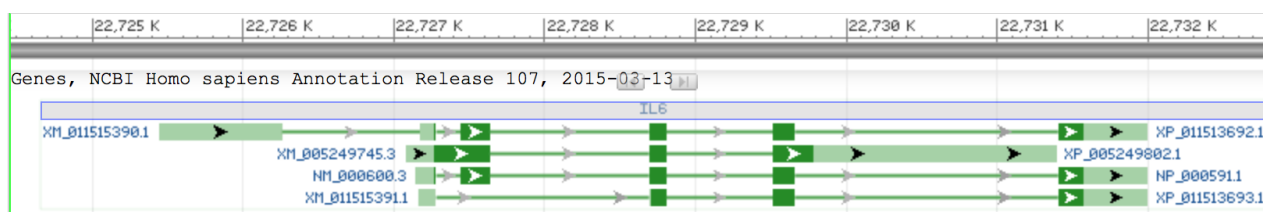


Рис. 1.1. Структурна організація гена *IL6*. Блакитним боксом позначено ген, зеленим – транскрипти з відповідними референсними номерами послідовностей [88]

Для даного гена підтверджено наявність чотирьох альтернативних сплайс-форм, проте найпоширенішим продуктом гену є білок з 212 а.к.з., разом із

сигнальним пептидом, який складається з 29 а.к.з., молекулярною масою 23,7 кДа, який містить 4 альфа-спіралі. В результаті відщеплення сигнального пептиду, секретується білок довжиною 184 а.к.з., молекулярна маса якого варіює від 21 до 28 кДа, залежно від ступеню глікозилювання [89].

В послідовності гена *IL6* відомо 416 валідованих поліморфних варіантів, для 173 з яких наявні дані щодо частоти в різних популяціях. Більшість з поліморфізмів розташовані в інтронах та ділянці 2 т.п.н. апстрім від гена, 8% поліморфних варіантів припадає на промоторну ділянку гена (рис. 1.2.).

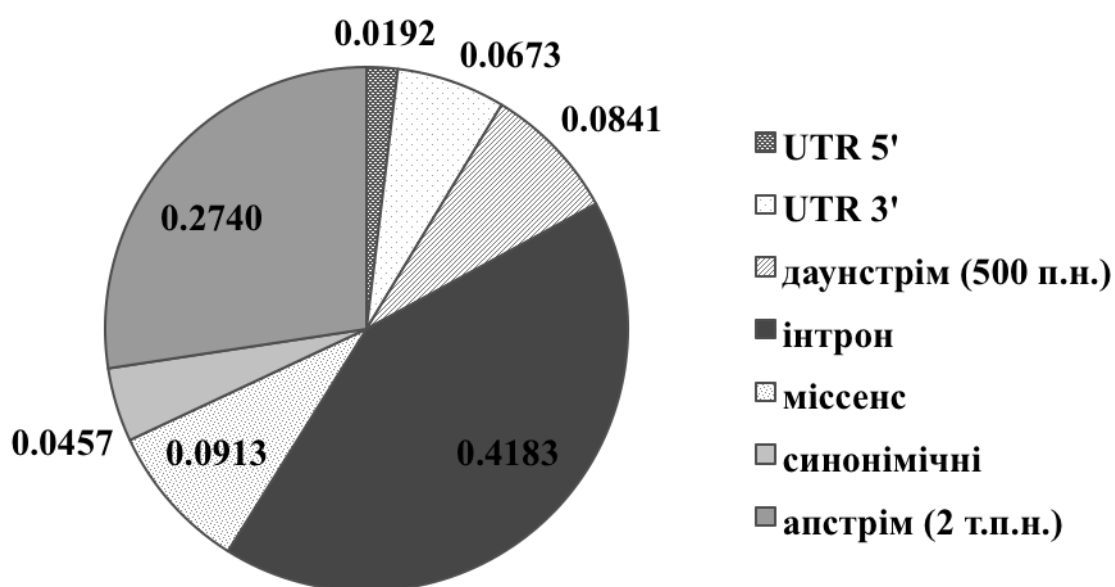


Рис. 1.2. Розподіл поліморфізмів по структурних частинах гена *IL6* [90]

IL-6 реалізує свою дію шляхом утворення рецепторного комплексу на мембранах клітин-мішеней. Рецепторний комплекс складається з двох частин: специфічного рецептора IL-6 і неспецифічного трансмембранного рецептора gp130. Існують два види специфічного рецептора IL-6: пов'язаний з мембраною клітин (IL-6R) і вільний, який циркулює в крові (sIL-6R). Обидва рецептора активуються при приєднанні IL-6. В свою чергу gp130 складається з двох однакових субодиниць, які утворюють ложе для IL-6 - рецептора [91].

Дія інтерлейкіну-6 розпочинається з того, що gp130 розпізнає рецептор IL-6R чи sIL-6R, включає його в своє "ложе", активується і забезпечує проведення сигналу IL-6 всередину клітини. Gp130 функціонально і просторово асоційований з транскіназами (JAK1, JAK2, Tyk2). У результаті формування рецепторного комплексу IL-6 (IL-6R/gp130 або sIL-6R/gp130) янус-тирозинкінази активуються, що сприяє фосфорилуванню gp130. Фосфорилування gp130 - вирішальна ланка в передачі сигналу IL-6 всередину клітини. Потім до фосфорильованого gp130 приєднується фактор транскрипції STAT3 (signal transducer and activator of transcription). В результаті фосфорилується тирозин, що сприяє утворенню димеру, який складається з двох молекул STAT3. Цей димер транслокується в ядро клітини і регулює експресію генів, які мають відповідні цис-елементи [71,91].

Цей сигнальний каскад знаходиться під жорстким контролем супресорів сигналіngu цитокінів (SOCs), які пригнічують дію IL-6 [92]. Однак, за відсутності SOCs IL-6 починає функціонувати подібно до IL-10, інгібуючи макрофаги та дендритні клітини [93,94]. Таким чином стає можливою ситуація, коли на ранніх етапах запальної відповіді IL-6 виступає в якості прозапального агента, але підтримання рівня IL-6 з часом обмежує інтенсивність запалення.

Класична сигналізація рецептора IL-6 через мембранний рецептор дозволяє контролювати центральні процеси гомеостазу та імунологічної відповіді, такі як відповідь гострої фази, метаболізм глюкози, кровотворення та регуляція нейроендокринної системи, а також гіпертермія, втома і втрата апетиту [95]. На противагу цьому, моделювання коліту, фіброзу тканини, запального артрити, алергії, інфекції, нейрозапалення і серцево-судинних захворювань показало, що каскад IL-6 транс-сигналізації через циркулюючий рецептор значно розширює спектр клітин, які підпадають під вплив IL-6 та є важливим для рекрутування та апоптозу лейкоцитів, підтримання ефекторних функцій Т-клітин, а також запальної активації стромальних тканин [96–98].

Інтерлейкін-6 бере участь в патофізіології різноманітних запальних процесів (наприклад, системний ювенільний ревматоїдний артрит, хвороба Крона), метаболічних захворювань, таких як цукровий діабет 2 типу, ожиріння та

дуже істотно впливає на роботу гепато-біліарної, ендокринної, нервової та серцево-судинної систем [71,96,99–102]. Блокада ІЛ-6 шляхом нокауту гена або за рахунок дії антитіл на тваринних моделях показала ефективність у лікуванні ревматоїдного артриту, вовчака, склеродерми [103–105]. Наразі лікарський засіб тоцилизумаб, який представляє собою моноклональні антитіла до ІЛ-6 рецептора проходить клінічні випробування для цілого спектру аутоімунних та хронічних запальних захворювань [106].

Доведено роль поліморфізму гена *IL6* в патогенезі низки захворювань, таких як: остеопенія і остеопороз, системний ювенільний ревматоїдний артрит, ожиріння, саркома Капоші, інсулінонезалежний цукровий діабет та цукровий діабет 1 та 2 типів, деякі серцево-судинні захворювання. [107–112]. В якості ймовірних факторів ризику цих хвороб розглядають зокрема два поліморфних варіанта, розташованих в промоторній ділянці гена *IL6*: -597G/A та -174 G/C. Для цих варіантів показаний певний ступінь зчеплення та асоціація з рівнем продукції відповідного білка та рівнем циркулюючого С-реактивного протеїну [113]. Однак, не зважаючи на зростання кількості досліджень в даній сфері, накопичувані дані часто протиречать попереднім результатам [114–116], тож пошук асоціації поліморфних варіантів гена *IL6* з патогенезом мультифакторних станів залишається актуальною проблемою.

1.2.2 Ген *IL8* та структурно-функціональна характеристика його білкового продукту. Інтерлейкін 8 (ІЛ-8), або фактор атракції нейтрофілів (NAP-1), відноситься до групи хемоатрактивних пептидів – α -хемокінів (типу Cys-X-Cys) і опосередковує активацію і міграцію нейтрофілів в тканини з периферичної крові [117]. Основними клітинами-продуцентами ІЛ-8 є моноцити та ендотеліоцити. Крім того, до синтезу ІЛ-8 здатні Т-лімфоцити, епітеліоцити, тромбоцити, фібробласти, гепатоцити і деякі інші клітини [118]. Індукція синтезу ІЛ-8 може бути спровокована декількома факторами: безпосередньою активацією компонентами клітинних стінок бактерій і вірусами, впливом інших прозапальних медіаторів (ІЛ-1, TNF і т.д.) і внутрішньосудинним згортанням крові. ІЛ-8 має широкий спектр біологічної дії, основним напрямком якого є

захист організму від патогенних факторів. Крім того, він підвищує секреторну активність макрофагів і викликає хемотаксис еозинофілів [119]. Цитокін ІЛ-8 функціонує не тільки як медіатор імунної відповіді, а ще й як фактор росту і ангиогенезу [120], а також має нейропротекторні та нейротрофічні функції [121]. Припускається, що ІЛ-8 здатний стимулювати міграцію та інвазію клітин трофобласту [122].

Ген інтерлейкіну 8 (*IL8* Gene ID: 3576) локалізований на довгому плечі хромосоми 4 (4q13-q21) серед кластера генів інших хемокінів [123]. Розмір гена становить 3156 п.н. Він складається з чотирьох екзонів і трьох інтронів (рис 1.3).

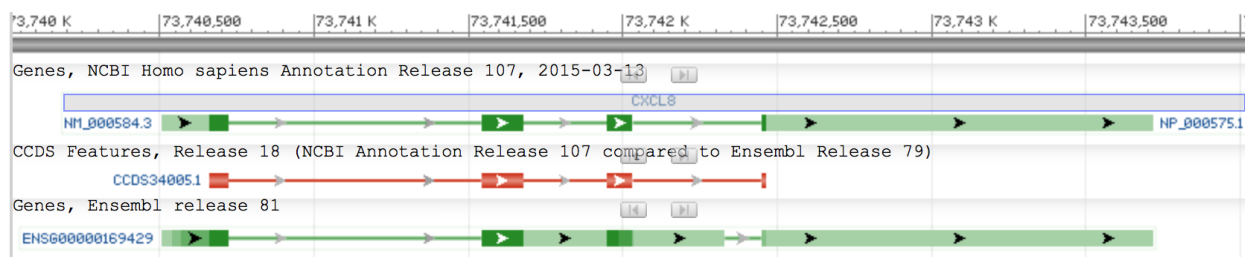


Рис. 1.3. Структурна організація гена *IL8*. Блакитним боксом позначено ген, зеленим та червоним – транскрипти з відповідними референсними номерами послідовностей [88]

Для даного гена характерний лише один кодуєчий транскрипт, з якого транлюється білок-попередник молекулярною масою близько 11 кДа, що складається з 99 амінокислотних залишків, N-кінцева частина якого представлена сигнальним пептидом, який відщепляється в процесі секреції. Зрілий ІЛ-8 існує в декількох формах, що розрізняються за довжиною поліпептидного ланцюга. Відомі форми ІЛ-8, що складаються з 69, 70, 72 і 77 амінокислотних залишків. Найбільшу біологічну активність має ІЛ-8, який складається з 77 амінокислотних залишків [124].

В послідовності гена *IL8* відомо 315 валідованих поліморфних варіантів, для 84 з яких наявні дані щодо частоти поширеності в різних популяціях. Більшість з поліморфізмів розташовані в інтронах та ділянці 2 т.п.н. апстрім від гена, 7% поліморфних варіантів припадає на промоторну ділянку гена (рис. 1.4). В

5'-нетрансльованій ділянці гена знаходиться кілька регуляторних елементів, що включають зони зв'язування NF-κB, AP-1 і ряду інших транскрипційних факторів, окрім того є експериментальні дані про асоціацію деяких поліморфних варіантів гена *IL8* з рівнем продукції білка [125].

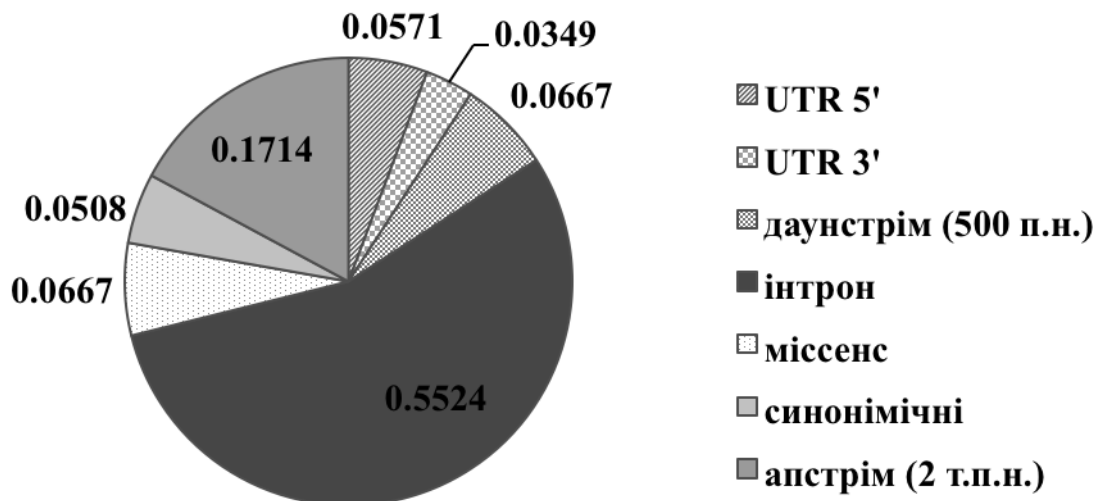


Рис. 1.4. Розподіл поліморфізмів по структурних частинах гена *IL8* [90]

IL-8 може існувати у формі мономера та димеру у клітині, але незалежно від цього, він здійснює свої функції шляхом зв'язування з рецепторами CXCR1 та CXCR2 [126]. Зв'язування з рецептором ініціює каскад взаємодій, які активуються в клітинах-мішенях та індуюють хемотаксис і дегрануляцію [127]. Будучи прозапальним медіатором, IL-8 займає одне з ключових положень у формуванні запальної реакції організму, в тому числі і при деяких хронічних захворюваннях та патологічних станах. IL-8 бере безпосередню участь в патохімічній стадії алергії та інших респіраторних порушеннях, запаленні тканин ока, модифікації фенотипу у пацієнтів з муковісцидозом [120,125,128,129]. Підвищений рівень IL-8 спостерігають і при внутрішньоматкової інфекції в амніотичній рідині та при передчасних пологах [69,130].

Зважаючи на широке коло фізіологічних функцій, які виконує IL-8, дослідження асоціації його функціональних поліморфізмів з патологіями

запальної природи являє великий науковий інтерес. За результатами досліджень були знайдені докази залучення поліморфних варіантів цього гена в патогенез респіраторних, серцево-судинних та інших порушень імунологічної природи [19,125,128,131]. Проте, як часто буває в дослідженнях асоціації, відтворюваність отриманих результатів доволі низька, тому пошук генетичних маркерів серед поліморфізмів даного гена продовжується.

1.2.3 Ген *IL10* та структурно-функціональна характеристика його білкового продукту. Інтерлейкін 10 (IL-10) є одним з ключових протизапальних цитокінів [36]. Про його відкриття майже одночасно повідомили дві незалежні групи науковців. В одному дослідженні був ідентифікований медіатор, який продукували В-лімфоцити, що стимулював проліферацію активованих тимоцитів [132]; у другому вивчалась гетерогенність Т-лімфоцитів [133]. Доведене існування різних їх субпопуляцій – Т-хелперів типу 1 та Т-хелперів типу 2. Встановлено, що супернатант з активованих Т-лімфоцитів Th2 клону здатний пригнічувати секрецію цитокінів Th1 клонів клітин [133]. Ця активність названа спочатку фактором пригнічення синтезу цитокінів (*cytokine synthesis inhibitory factor*). Після отримання відповідного рекомбінантного ДНК-клону [134] стало зрозумілим, що цей фактор є багатофункціональним, і він був названий IL-10.

Ген *IL10* (Gene ID: 3586) локалізований на хромосомі 1 в регіоні 1q31-q32, він має в своєму складі 5 екзонів та 4 інтрони, та має протяжність 4,7 т.п.н. [135].

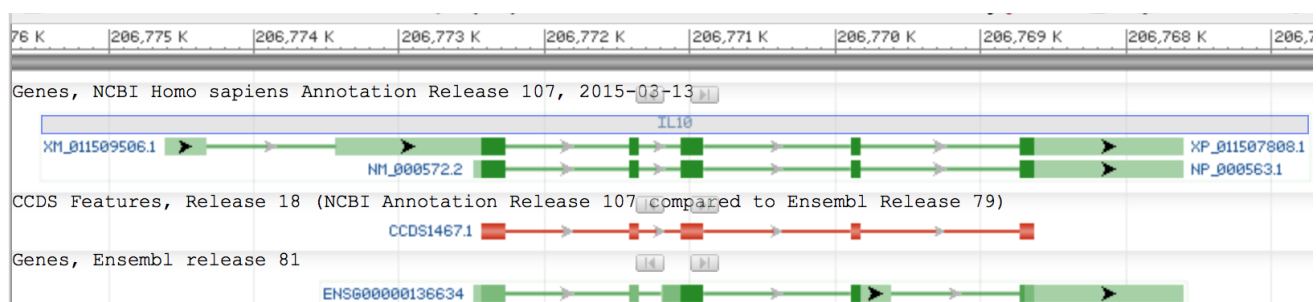


Рис. 1.5. Структурна організація гена *IL10*. Блакитним боксом позначено ген, зеленим та червоним – транскрипти з відповідними референсними номерами послідовностей [88]

В послідовності гена *IL10* відомо 304 валідованих поліморфних варіантів, для 132 з яких наявні дані щодо частоти. Більшість з поліморфізмів розташовані в інтронних ділянках та ділянці 2 т.п.н. апстрім від гена, трохи менше 7% поліморфних варіантів припадає на промоторну ділянку гена (рис. 1.6). В промоторі даного гена знайдено кластер поліморфних варіантів, теоретично здатних впливати на рівень продукції білка [16,136]

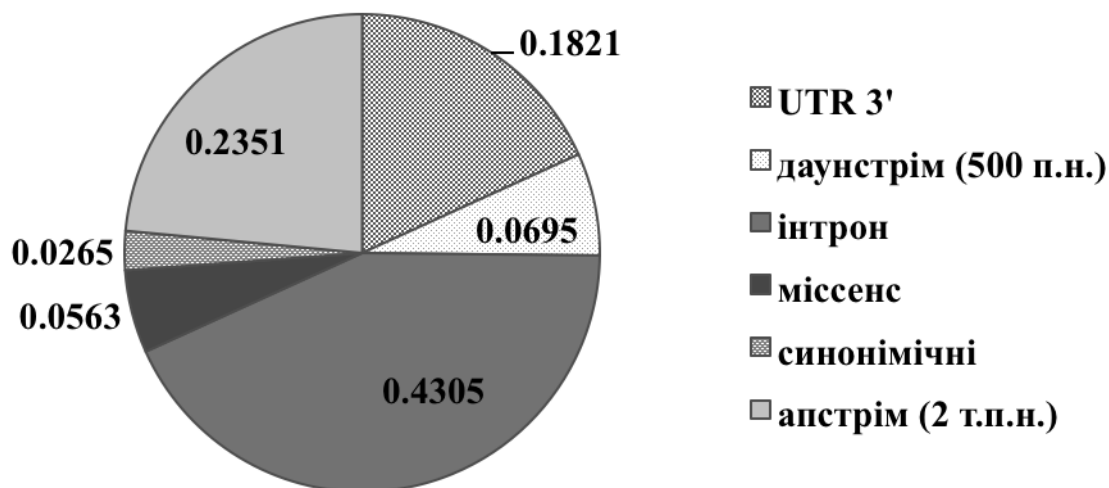


Рис. 1.6. Розподіл поліморфізмів по структурних частинах гена *IL10* [90]

В результаті транскрипції гена може утворюватись три альтернативних транскрипти, проте лише один з них є кодуєчим. Продуктом гена *IL10* людини є білок зі 178 а.к.з, 18 з яких припадають на сигнальний пептид, з молекулярною масою 18 кДа [137].

IL-10 переважно синтезується CD4⁺ Th2-клітинами, моноцитами, В-клітинами та циркулює в формі гомодимеру [138]. Після зв'язування з високоафінним рецептором IL-10R він набуває здатність інгібувати продукцію TNF-а, IL-1, IL-6, IL-8 та IL-12, макрофагами [34,35]. Окрім цього даний цитокін пригнічує поверхневу експресію молекул головного комплексу гістосумісності та стимулює деградацію мРНК прозапальних цитокінів [36,138]. IL-10 секретується на рівні матково-плацентарного бар'єру, забезпечує контроль над імунною відповіддю, що спрямована на елімінацію плода. Було доведено, що IL-10 та його рецептори є

нормальними складовими ендометрію і ранньої децидуальної оболонки [139].

Однією з найважливіших функцій IL-10 є забезпечення переходу від фази гострого запалення до стадії толерантності та відновлення тканин. Такий перехід є надзвичайно важливим в процесах пост-ішемічного відновлення та загоєння механічних ушкоджень [7,140,141].

Поліморфні варіанти гена *IL10* є перспективними маркерами для пошуку асоціації з захворюваннями, в патогенезі яких відіграє роль порушення балансу про- та протизапальних цитокінів. Є дані про асоціацію функціональних поліморфізмів даного гена з репродуктивними [70,136], церебральними [50], аутоімунними патологіями [31]. Два поліморфні варіанти даного гена є анотованими маркерами ризику ревматоїдного артриту та відторгнення трансплантату [142,143].

1.3 Інтерферони лямбда - важливі компоненти противірусного імунітету

Інтерферони, названі так завдяки їх здатності перешкоджати (від англ. “interfere with”) вірусній реплікації, є цитокінами з потужною імуномодулюючою дією. Відповідно до їх структури та хромосомної локалізації їх генів, були описані три типи інтерферонів. Інтерферони I типу (IFN α та IFN β) виробляються майже всіма типами клітин у відповідь на сигналізацію, основним джерелом їх є макрофаги та епітеліальні клітини [144,145]. Ці цитокіни сприяють активації дендритних клітин, активують T-клітини, чим сприяють Th1-диференціації, активують ефекторні функції CD8⁺ цитотоксичних T-клітин і регулюють рекрутування імунних клітин шляхом індукції хемокінів [146]. Одночасно, існують дані, які підтверджують концепцію, що IFN першого типу можуть також мати протизапальну дію [147] та інгібувати деякі ефекти IFN γ [148]. Лікування IFN α є ефективним у хворих з вірусними гепатитами B і C, тому декілька підтипів

IFN α (13 генів підтипів на хромосомі 9), які мають різну рецепторну афінність та біологічні ефекти, добре вивчені відносно їх потенційної противірусної або імуномодулюючої активності [149,150]. Деякі побочування з приводу використання IFN α викликають дані про спектр побічних ефектів при терапії, зокрема різноманітні цитопенії та депресивні синдроми [151].

Інтерферони II типу представлені одним цитокином, IFN γ , який виробляється переважно натуральними кіллерами та активованими Th1-клітинами. IFN γ є потужним активатором ефекторних функцій фагоцитарних клітин, збільшуючи їх лізосомальну ферментативну активність і окислювальний вибух [152]. Крім того, цей цитокін відіграє важливу роль в індукції адаптивних реакцій сприяючи презентації антигенів дендритними клітинами, частково шляхом позитивної регуляції молекул головного комплексу гістосумісності [153]. В цьому відношенні, рекомбінантний IFN γ , був випробуваний в якості додаткової терапії опортуністичних інфекції [154,155].

Інтерферони типу III можуть бути синтезовані більшістю типів клітин, стимульованих інфекційними агентами через сигналізацію толл-подібних рецепторів [156,157], та інших шляхів, подібних до інтерферонів типу I [158]. Цей клас інтерферонів включає IFN- λ 1 (IL-28A), IFN- λ 2 (IL-28B) і IFN- λ 3 (IL-29), а також нещодавно відкритий IFN- λ 4 - цитокін, структурно подібний до IL-10 [159]. Останнім часом активізувалися дослідження IFN III типу. Це обумовлено накопиченням даних про їхню високу ефективність як противірусного агента з одного боку та більшою спрямованістю їх дії внаслідок того, що відповідні рецептори синтезуються лише вузьким колом клітин, що зменшує ризик побічних ефектів з боку органів та систем не залучених в безпосередню боротьбу з вірусною інфекцією [157,160,161].

1.3.1 Ген *IFNL4* та структурно-функціональна характеристика його білкового продукту. Інтерферон λ 4 є нещодавно відкритим цитокином з родини IFN III типу. Його відкриття було пов'язано з детекцією невідомого на той час транскрипту в клітинах печінки, активованих вірусом гепатиту C [17]. Подальше дослідження дозволило встановити, що послідовність, з якої відбувався синтез

мРНК, розташована на хромосомі 19 в локусі 19q13.2 та раніше вважалася псевдогеном. Поява відкритої рамки зчитування з якої транскрибується знайдена мРНК відбувається за наявності динуклеотидного поліморфного варіанту ss469415590 ($\Delta G/TT$) у випадку делеції відбувається зсув рамки зчитування [17]. Встановлено, що новоутворений ген *IFNL4* містить щонайменше 5 екзонів. (рис. 1.7).

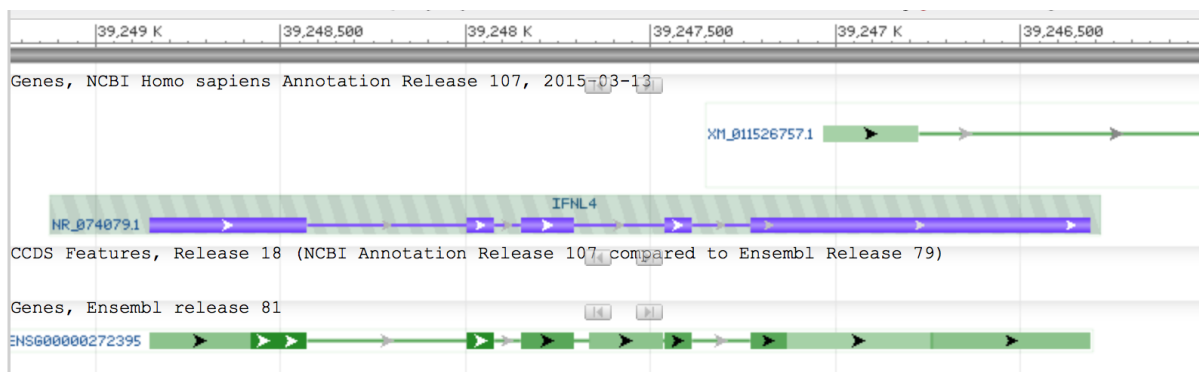


Рис. 1.7. Структурна організація гена *IFNL4*. Заштрихованим боксом позначено ген, зеленим та фіолетовим – транскрипти з відповідними референсними номерами послідовностей [88]

В послідовності гена *IFNL4* відомо 155 валідованих поліморфних варіантів, для 93 з яких наявні дані щодо частоти. Більшість з поліморфізмів розташовані в ділянці 2 т.п.н. апстрім від гена та інтронних ділянках (рис. 1.8).

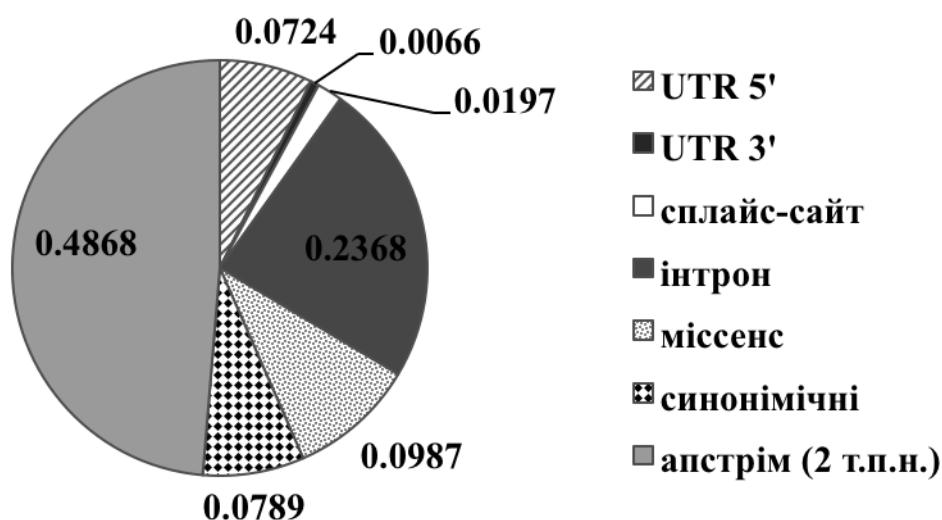


Рис. 1.8. Розподіл поліморфізмів по структурних частинах гена *IFNL4* [90]

Білковий продукт даного гена нараховує 179 амінокислотних залишків та відрізняється високим ступенем гомології до інших білків родини IFN III типу, зокрема до IL-28B [17].

Особливий інтерес до гена *IFNL4* та поліморфного варіанту ss469415590 викликаний повідомленнями про нерівновагу за зчепленням в деяких популяціях між цим поліморфізмом та rs12979860 – відомим фармакогенетичним маркером ефективності протівірусної терапії хронічного вірусного гепатиту С пег-інтерфероном. Вже давно відома висока інформативність rs12979860 в якості фармакогенетичного маркера, особливо у випадку інфікування вірусом гепатиту С з 1-им генотипом, проте функціональна значущість даного поліморфізму була невідомою [13]. Відкриття гена *IFNL4* відкриває нові можливості для фармакогенетичних досліджень в галузі ефективності протівірусної терапії, зокрема гепатиту С [17,162]. Так, деякими дослідженнями встановлено асоціацію між експресією гена *IFNL4* та зниженою протівірусною активністю, а також поганою відповіддю на терапію пег-інтерфероном [163,164].

Додатковим доказом на користь важливості інтерферона- $\lambda 4$ є дані про те, що саме алель ss469415590 ΔG , який обумовлює продукцію цього білка є алелем дикого типу, який був достатньо швидко витіснений в популяціях Азії та Європи поліморфним алелем s469415590 TT, що свідчить про наявність еволюційної переваги даного алеля, яка не може бути пояснена виключно впливом розповсюдженості гепатиту С в останні роки [162].

Таким чином, ss469415590 гена *IFNL4* є перспективним поліморфізмом - кандидатом для дослідження індивідуальних особливостей відповіді на протівірусну терапію та перебігу вірусних інфекцій загалом.

1.4 Підсумок

Виходячи з вищеприведеного, цитокіни є важливими регуляторними молекулами, які беруть участь в численних фізіологічних та молекулярних процесах в здоровому організмі. Зважаючи на їхнє залучення, в багатьох випадках, на ключових стадіях захисних реакцій організму, логічно впливає також порушення роботи цитокінової мережі в якості істотного чинника патогенезу багатьох станів, зокрема мультифакторних.

Беручи до уваги значний ступінь поліморфності регуляторних ділянок генів цитокінів, вони є перспективними мішенями для дослідження в якості кандидатів, як факторів ризику розвитку патологій, пов'язаних з порушенням перебігу запальних реакцій організму. До таких реакцій можуть належати як захисні реакції тканин на механічне чи ішемічне ушкодження, так і процеси, пов'язані з відповіддю на чужорідні антигени, такі як алогенний зародок в процесі імплантації, чи вірусні інфекційні агенти.

Попри значний пул робіт з пошуку асоціації поліморфних варіантів генів цитокінів з патологічними станами, більшість з отриманих результатів не піддається відтворенню. Тому, першим завданням даного дослідження є розробка такої стратегії дослідження, яка б дозволила отримати достовірні дані та зробити висновок про роль поліморфізмів генів цитокінів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNLA* в патогенезі 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.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Обґрунтування вибору напрямку досліджень

Вивчення генетичних аспектів розвитку мультифакторних патологій, модифікацій фенотипу моногенних захворювань та формування індивідуальної відповіді на терапію лікарськими засобами пов'язано з деякими серйозними методологічними обмеженнями. До них належать: складність отримання повної інформації для формування однорідної вибірки, фенотипова гетерогенність досліджуваних патологій, одночасний вплив та взаємодія факторів ризику, що робить неможливим застосування прямих методів, як, наприклад, аналіз зчеплення [3,165]. Недостатність відтворюваності багатьох генетичних досліджень, присвячених пошуку асоціації генотипу індивіда з клінічним фенотипом призвела до накопичення суперечливих даних про молекулярно-генетичну природу та кількість генів схильності [166].

Саме тому важливим кроком при плануванні стратегії подібних досліджень є урахуванням обмежень, які можуть вплинути на достовірність отриманих результатів. Найпоширенішими помилками дизайну досліджень асоціації є: недостатній розмір досліджуваної групи, некоректно підібрана контрольна група та нехтування ефектами популяційної стратифікації [3,167].

Самою поширеною стратегією для пошуку генетичної асоціації є дослідження за типом “випадок-контроль”. З метою коректного підбору досліджуваної групи необхідно врахувати, що пацієнти в ній мають бути максимально однорідним з клінічної точки зору, адже значна клінічна гетерогенність може завадити адекватній оцінці асоціації генетичного чинника з

патогенезом. Більше того, важливим є урахування впливу на ризик розвитку МФЗ у пацієнта середовищних факторів або інших генетичних чинників. У такому разі проблематично виокремити вплив конкретно досліджуваних генетичних маркерів. Таким чином, в процесі планування даного дослідження першим кроком стане формування низки критеріїв для відбору пацієнтів, розроблених разом з медиками спеціалістами.

Не менш важливий , аспект – це підбір контрольної групи. Адже саме від цього залежатиме достовірність дослідження по типу “випадок – контроль”. Чітке визначення критеріїв відбору в групу дослідження допоможе з вибором аналогічних критеріїв відбору контролю. Важливим етапом формування вибірок буде врахування ефектів популяційної стратифікації [168,169]. На жаль, в Україні ще не проводилося дослідження генетичної структури популяції стосовно поліморфізму досліджуваних генів цитокінів, тобто важливим кроком в даній роботі має стати вивчення загальної популяції.

Лише за умови виконання описаних вище вимог можна отримати достовірні дані стосовно асоціації поліморфних варіантів генів цитокінів з патогенезом певних мультифакторних станів. Адже тільки на стійкому статистичному підґрунті можна робити висновки про достовірність отриманих результатів та їх запровадження в медичну практику, з метою вирішення нагальних проблем, створених такими соціально-значущими патологіями, як ішемічний інсульт, репродуктивні втрати та вірусний гепатит С.

2.2. Матеріали дослідження

Матеріалом дослідження були зразки крові індивідів зі спадковою гратчастою дистрофією рогівки, 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), а також індивідів з відповідних 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.

Для перевірки та дизайну послідовностей олігонуклеотидних праймерів користувалися базою даних NCBI з використанням пошукової системи BLAST SEARCH [191]. Олігонуклеотидні праймери для полімеразної ланцюгової реакції досліджуваних генів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4* в ділянках локалізації досліджуваних поліморфізмів, синтезовані у відділі геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України на олігосинтезаторі Biosset (Росія), методом твердофазного фосфоамідитного синтезу.

Реактиви. Для проведення ПЛР використовували термостабільну Taq-ДНК-полімераза, ампліфікаційний буфер та набори дезоксинуклеозидтрифосфатів виробництва фірми „ Thermo Scientific” (Литва).

В роботі були використані додецилсульфат натрію (ДСН або SDS), сахароза, TRITON X-100™, етилендіамінтетраамінооцтова кислота (ЕДТА), гідроксиметилметилен-амін (Трис), агароза, бромід етидія, бромфеноловий синій, ксиленціанол виробництва фірми "SIGMA". Решта реактивів – вітчизняного виробництва марки «Макрохім».

Робочі розчини, які використовувались для досліджень:

- буфер TE – 10mM Трис-НСl; 1mM ЕДТА;
- 5x TBE буфер – 0,89М Трис-НСl; 0,89М борна к-та; 20mM ЕДТА;
- сахарозний буфер – 0,32 М сахароза; 5mM Трис-НСl; 1x TRITON X100; 0,1М MgCl₂;
- протеїназний буфер – 10mM Трис-НСl; 1mM ЕДТА (рН 8,0); 100mM NaCl;
- ампліфікаційний буфер для ПЛР – комерційний 10 кратний розчин, який містить (NH₄)₂SO₄, оптимізований для ПЛР із використанням Таq-полімерази;
- буфер для нанесення проб ДНК на агарозний гель – 0,1% бромфеноловий синій, 0,1% ксиленціанол, 30% гліцерол.

2.3. Методи дослідження

2.3.1. Аналіз клінічних даних та формування вибірок. В рамках даної роботи було обстежено сім груп неспоріднених індивідів з різних регіонів України. Згідно з основними правилами біоетики при використанні людини в якості об'єкту дослідження, нами була отримана інформована згода на проведення даного дослідження від усіх досліджуваних індивідів, та було введено номенклатуру зразків ДНК, яка включала числовий код.

Популяційна група

В якості популяційної вибірки досліджувалася група здорового населення з різних регіонів України, яка складалась з 101 неспорідненої особи: 50 чоловіків та 51 жінка (середній вік 36,2±6,7 та 34,4±4,4 років відповідно).

Дослідження пацієнтів зі спадковою дистрофією строми рогівки.

Для включення в дане дослідження були відібрані пацієнти з гратчастою дистрофією рогівки I типу та проміжного I / IIIA типу, які проходили лікування в ДУ “Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України”

(n=69). З 69 пацієнтів у 56 спостерігалися рецидивуючі ерозії рогівки, у 13 рецидивуючі ерозії були відсутні. Асептичне запалення рогівки було підтверджено для всіх пацієнтів за допомогою мікробіологічних досліджень. Клінічний фенотип гратчастої дистрофії рогівки у всіх пацієнтів був підтверджений результатами молекулярно-генетичних досліджень. Мутації Arg124Cys та Hys626Arg в гені *TGFBI* були виявлені у всіх пацієнтів з гратчастою дистрофією рогівки I-го та проміжного I / IIIA типу відповідно. У всіх пацієнтів була проведена оцінка ступеню тяжкості запальної реакції, що супроводжує рецидивуючі ерозії.

Дослідження пацієнтів з клінічним діагнозом інсульт.

У досліджувану групу увійшли 183 пацієнти, які вижили після ішемічного інсульту та знаходились на стаціонарному лікуванні у відділенні реабілітації хворих з порушенням мозкового кровообігу ДУ „Інститут геронтології АМН України”. Всі 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 ступеню споріднення); неврологічний огляд; оцінку ступеню порушення функцій та якості реабілітації за допомогою шкали Rankin при госпіталізації хворого у відділення та при виписці через два тижні лікування; ультразвукове дуплексне дослідження судин голови та шиї на приладі EN VISOR (Philips), ехокардіографію на апараті MicroMaxx (SonoSite), електроенцефалографію на приладі «Neurofax EEG - 1100K» (Nihon Kohden). Для верифікації характеру, розміру та локалізації вогнища ураження використовували комп'ютерну томографію або магнітно-резонансну томографію головного мозку. Середній вік хворих чоловіків та жінок складав $64,1 \pm 9,4$ та $65,2 \pm 8,9$ років відповідно та статистично вірогідно не відрізнявся ($p > 0,05$), кількість чоловіків та жінок складала 95 та 88 осіб (51,9 % та 48,1% відповідно). За шкалою Rankin у всіх хворих на інсульт при поступленні у відділення ступінь порушених функцій була від помірної до важкої (3-4 бали). Всі обстежені хворі на інсульт за принципом півкульної локалізації вогнища розподілились рівномірно: 45,6%

хворих з право та лівопівкульною локалізацією вогнища, лише 8,8% з локалізацією вогнища ураження у вертебро-базиллярному басейні. В якості контрольної було сформовано групу осіб похилого віку (старших за 65 років), у яких не було в анамнезі випадків інсульту. Кількість чоловіків та жінок була 35 та 53 осіб (40,2 та 59,8% відповідно). Середній вік чоловіків та жінок був $73 \pm 5,6$ та $74,4 \pm 7,4$ років відповідно та статистично вірогідно не відрізнявся ($p > 0,05$). Для цих осіб також проводилось анкетування для збору клінічних даних стосовно наявних хронічних захворювань та артеріальної гіпертензії.

Дослідження пацієнтів з звичною втратою вагітності.

Всі пацієнти перед включенням в дане дослідження проходили загальний медичний огляд згідно рекомендацій МОЗ. Усі пацієнти групи мали не менше двох випадків втрати вагітності до 20-ти тижнів гестації в анамнезі. До складу групи увійшли 110 жінок (середній вік $34,15 \pm 4,49$ років; кількість втрат вагітності $2,73 \pm 0,87$). З метою виключення інших факторів ризику, окрім імуногенетичних, для дослідження були обрані пацієнти з такими клінічними характеристиками: відсутність обтяженого сімейного гінекологічного анамнезу, виключені анатомічні дефекти генітального тракту (підтверджені УЗД або гістеросальпінгографією), відсутність маркерів аутоімунних процесів (анти-нуклеарні, анти-фосфоліпідні антитіла, вовчаночний антикоагулянт), виключені порушення тироїдної функції, цукровий діабет 2-го типу, гіперпролактинемія та урогенітальні інфекції, відсутність тромбофілії (в тому числі спадкової за мутаціями *F5 G1691A* та *F2 G20210A*), нормальний каріотип пацієнтки та її партнера. В якості контрольної була сформована група зі 106 неспоріднених здорових жінок (середній вік $26,23 \pm 2,99$ років) без випадків втрати вагітності, які народили хоча б одну дитину зачату природнім шляхом.

Дослідження пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С.

В дану групу увійшли пацієнти з підтвердженим клінічним діагнозом хронічний вірусний гепатит С ($n=92$). В досліджувану групу увійшли пацієнти виключно з 1-им генотипом вірусу. У всіх пацієнтів було детектовано РНК вірусу протягом не менш ніж 6-ти місяців та були виключені супутні вірусні інфекції

(ВІЛ, гепатит В) та хвороби печінки. Рівень вірусологічного навантаження до початку терапії визначався за допомогою кількісної ПЛР з чутливістю детекції 75 МО/мл. Проміжну оцінку вірусологічного навантаження проводили на 4, 12, 24, 48 тижні лікування та через 24 тижні після завершення терапії. В дослідженні брали участь особи, які раніше не отримували протівірусної комбінованої терапії. Більшість пацієнтів (55) отримували пег-інтерферон- α 2a (Пегасис) в дозуванні 180 мкг на тиждень, а інші 45 отримували пег-інтерферон- α 2b (Пегінтрон) в дозуванні 1,5 мкг/кг на тиждень. Додатково всі пацієнти отримували 15 мкг/кг рибавірину (Копегус або Ребетол) на день. Показанням для передчасного переривання терапії слугувало зниження рівня вірусної РНК менш ніж в 2 \log_{10} до 12 тижня, або стійка віремія до 24 тижня. Відповідно до динаміки вірусологічного навантаження пацієнти були розподілені на групу з пізньою або відсутньою відповіддю (n=29) та контрольну групу зі стійкою вірусологічною відповіддю (n=63).

2.3.2. Виділення ДНК з лімфоцитів периферійної крові. ДНК виділяли за допомогою стандартного методу – шляхом гідролізу лізатів клітин протеїназою К з наступною фенольною екстракцією. Для виділення ДНК із крові до 1 об'єму холодної крові (1 мл) додавали 7-9 об'ємів холодного сахарозного буферу (див. пункт 2.2.) для лізису лейкоцитів з наступним осадженням клітинних ядер шляхом центрифугування при 2500 об./хв. при температурі 4°C протягом 15 хвилин. Осад ядер ресуспендували в 460 мкл протеїназного буфера (див. пункт 2.2.). Далі додавали 10%-ий розчин додецилсульфату натрію до кінцевої концентрації 0,5% і протеїназу К до кінцевої концентрації 100 мкг/мл. Інкубації лізатів ядер тривала протягом 12-16 годин при температурі 37°C. Після інкубації здійснювали депротейнізацію ядер шляхом послідовної екстракції фенолом (рН 8,0), сумішшю рівних об'ємів фенолу і хлороформу та хлороформом до зникнення інтерфазы після центрифугування. Осад ДНК отримували додаванням 2-2,5 об'ємів холодного 96% етилового спирту, з наступним центрифугуванням та промиванням 70% етиловим спиртом. Отриманий осад підсушували і розчиняли в ТЕ (див. пункт 2.2.) [170].

Якість препаратів ДНК визначали за спектральними характеристиками, а також шляхом електрофорезу в 1%-ому агарозному гелі. Для визначення спектральних характеристик та концентрації ДНК використовували прилад ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, США) у діапазоні λ_{220} – λ_{300} . При оцінці спектральних характеристик звертали увагу, щоб в зразках відношення оптичної щільності, визначеної відповідно при λ_{260} та при λ_{280} , вкладалося в рамки між 1,9 та 2,0, що показує чистоту препарату ДНК по відношенню до білків. Відношення $\lambda_{260}/\lambda_{230}$ для нативної ДНК без органічних домішок має складати 2,0. Окрім цього проби ДНК перевіряли на наявність залишків фенолу, який поглинає при λ_{270} . Відношення $\lambda_{260}/\lambda_{270}$ для ДНК без фенолу становить 1,2.

2.3.3. Дизайн праймерів та оптимізація умов для проведення специфічної полімеразної ланцюгової реакції. Аналіз послідовностей праймерів на специфічність проводили з використанням комп'ютерної бази даних BLAST SEARCH за умов сканування геномної послідовності ДНК досліджуваного гена. Основні вимоги до дизайну були наступні: висока специфічність; якомога нижчий вміст гуанідину в послідовності; однакові температури плавлення для кожного з членів пари праймерів.

Оптимальні умови проведення полімеразної ланцюгової реакції – склад реакційної суміші та температурно-часовий режим – дозволяють отримати достатню для детекції кількість високо специфічного продукту ампліфікації ДНК *in vitro*. З метою створення таких умов проведення реакції нами проводився аналіз послідовностей ДНК-матриць для ПЛР та відповідних фланкуючих праймерів. Критичними параметрами для реакційної суміші були: концентрація іонів магнію, кількість ферменту – термостабільної Taq-полімерази та концентрація праймерів. Критичними параметрами температурних режимів були: температура відпалення праймерів на ДНК-матриці та температура синтезу. Важливими параметрами часових режимів були: співвідношення періоду денатурації до періоду відпалення праймерів та оптимальний час фази синтезу, а також загальна кількість повних циклів реакції.

2.3.4. Ампліфікація ДНК *in vitro*. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в автоматичному режимі на термоциклерах “2720 Thermal Cycler” фірми “Applied Biosystems”, а також iCycler виробництва фірми „BIO-RAD” (США). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила: ампліфікаційний буфер (див. пункт 2.2.); $MgCl_2$ – 2,5 мМ; бичачий сироватковий альбумін – 170 мкг/мл; dNTP – 400 мкМ кожного типу; термостабільну ДНК-полімеразу – 0,5 одиниць активності; олігонуклеотидні праймери – по 5 мкМ кожного; ДНК – 100–300 нг.

Надалі пробірки з сумішшю вміщували в термоциклер, використовували оптимізовані режими проведення полімеразної ланцюгової реакції. Після ампліфікації зразки охолоджували при кімнатній температурі. Якщо зразки не підлягали аналізу відразу після закінчення полімеразної ланцюгової реакції, то їх зберігали при $+4^{\circ}C$.

2.3.5. Ідентифікація мутацій методом ПДРФ. Даний метод аналізу нуклеотидної послідовності, оснований на ампліфікації *in vitro* фрагмента послідовності ДНК гена, що містить ділянку локалізації поліморфного варіанту з наступним гідролізом продукту ПЛР ендонуклеазою рестрикції, сайт впізнання для якої з'являється або зникає в результаті мононуклеотидної заміни (МНЗ). У тих випадках, коли не вдається підібрати ендонуклеазу рестрикції для такого аналізу, використовується один з варіантів методу полімеразної ланцюгової реакції – метод наведення відповідного сайту рестрикції шляхом сайт-спрямованого мутагенезу за допомогою ПЛР із неповністю гомологічними нуклеотидній послідовності ДНК-матриці олігонуклеотидними праймерами. Аналіз послідовності досліджуваних генів на наявність сайтів впізнавання для ендонуклеаз рестрикції проводили з використанням програми Invitrogen Vector NTI Advance 10.

2.3.6. Електрофоретичне фракціонування фрагментів ДНК в агарозному гелі. Для проведення електрофорезу готували 5-кратний TBE-буферний розчин (див. пункт 2.1.). Для електрофорезу використовували 0,5 кратний TBE- буферний розчин.

Продукти ПЛР фракціонували в 1,5-2% агарозному гелі та забарвлювали

1% розчином етидіум броміду (інтеркалюючий барвник ДНК). Продукти ПЛР перед нанесенням на гель змішували з відповідним розчином для нанесення (див. пункт 2.2.) у співвідношенні 3:1. Електрофорез проводили на приладі фірми „HELICON” (Росія) при кімнатній температурі та напруженості електричного поля 10-15 В/см гелю до візуального розділення аналізованих фрагментів. Візуалізацію проводили на УФ-транслюмінаторі.

2.3.7. Аналіз однонуклеотидних замінів в генах *IL6*, *IL8* та *IL10* методом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів. Аналіз поліморфних варіантів досліджуваних генів проводили за допомогою ПЛР з наступним ПДРФ аналізом з використанням раніше описаних методик з власними модифікаціями [192-195]. Послідовність праймерів, використаних в даному аналізі, температурні режими проведення реакцій та ендонуклеази рестрикції представлені в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Послідовності олігонуклеотидних праймерів, температурно-часові режими для проведення ПЛР та ендонуклеази рестрикції використані для проведення аналізу ПДРФ

Ген	Локус	Послідовності олігонуклеотидних праймерів	Відпалювання t °C	Ендонуклеази рестрикції
1	2	3	4	5
<i>IL6</i>	-174 G/C	F 5'-TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT-3' R 5'-CTGATTGGAAACCTTATTAAG-3'	58 (5 циклів) 54 (30 циклів)	<i>NlaIII</i>
<i>IL8</i>	-781 C/T	F 5'- CTCTAACTCTTTATATAGGAATT -3' R 5'- GATTGATTTTATCAACAGGCA -3'	58 (5 циклів) 53 (30 циклів)	<i>EcoRI</i>

1	2	3	4	5
<i>IL10</i>	-592 C/A	F 5'- GGTGAGCACTACCTGACTAGC -3' R 5'- CCTAGGTCACAGTGACGTGG -3'	58 (5 циклів) 55 (30 циклів)	<i>RsaI</i>
	-1082 G/A	F 5'- CCAAGACAACACTACTAAGGCT -3' R 5'- GCTTCTTATATGCTAGTCAGGTA - 3'	58 (5 циклів) 55 (30 циклів)	<i>EcoNI</i>

Ампліфікацію *in vitro* специфічної послідовності ДНК досліджуваних локусів проводили в автоматичному режимі, який складався із 2 стадій. Після початкової денатурації при 94°C протягом 5 хвилин кожна стадія відбувалася в 3 етапи: денатурація - 94°C (30 с), відпалювання праймерів (30-45 с), елонгація - 72°C (30-40 с); при цьому на I стадії – 5 циклів температура відпалювання праймерів була вищою, для запобігання ампліфікації неспецифічних ПЛР-продуктів, а II стадія – 25 циклів із пониженням температури відпалювання. Фінальна елонгація тривала 7 хвилин при 72°C (табл. 2.1).

Успішність проходження реакції ПЛР, а також та відсутність контамінації реакційної суміші аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі. У випадку успішного проведення ПЛР у зразки додавали специфічні для кожної МНЗ ендонуклеази рестрикції в кількості 3 в.о.а та проводили рестрикцію протягом 12-16 годин при температурі 37°C. Продукти гідролізу ампліфікованих послідовностей аналізували за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі.

2.3.8. Аналіз мононуклеотидної заміни -397 С/Т гена *ESR1*. Для проведення аналізу поліморфного варіанта -397 С/Т гена *ESR1* нами було розроблено методику, сутність якої полягає в проведенні ПЛР з наступним ПДРФ-аналізом. В процесі ПЛР ампліфікується продукт 522 п.н. з першого

інтрона гена *ESR1*. Послідовність праймерів, використаних в даному аналізі та температурний режим проведення реакцій представлений в табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Послідовності олігонуклеотидних праймерів та температурний режим, використані для проведення ампліфікації *in vitro*

Ген	Локус	Послідовності праймерів	Температурний режим
<i>ESR1</i>	-397 С/Т	FOR 5'-CAGGGAGCTTTGAGGCTGACCT-3' REV 5'-GCGGAAGAATGTGTCAGCCTCA-3'	95°C – 5 хв 95°C – 45 сек 60°C – 45 сек 28 циклів 72°C – 45 сек 72°C – 7 хв

Для подальшого аналізу мононуклеотидних замін гена *ESR1* у випадку успішного проведення ПЛР в проби додавали по 3 в.о.а. ендонуклеази рестрикції *PvuII* та інкубували при 37°C протягом 12 годин. Продукти гідролізу ампліфікованих послідовностей аналізували за допомогою електрофорезу в 2%-му агарозному гелі. Гелі забарвлювали бромистим етидієм і сканували на УФ-трансліюмінаторі.

2.3.9. Аналіз поліморфного варіанта ss469415590 гена *IFNL4* методом алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції. Для проведення аналізу поліморфного варіанта ss469415590 гена *IFNL4* нами було розроблено методику з використанням сайт-специфічної ПЛР. Для проведення сайт-специфічної ПЛР використовували 3 специфічних олігонуклеотидних праймери, один спільний та два специфічних для кожного з алельних варіантів - ss469415590ΔG та ss469415590TT. В процесі дизайну праймерів для аналізованої послідовності враховували наступні обмеження. По-перше, між послідовностями генів родини

інтерферонів λ існує високий ступінь гомології. По-друге, послідовність ДНК, яка фланкує досліджуваний поліморфізм здатна утворювати димери та шпильки з показниками вільної енергії до $-4,7$ ккал/моль. З метою підвищення специфічності роботи праймерів та уникнення формування димерів в олігонуклеотидні послідовності були внесені некомплементарні основи. Отримані послідовності праймерів наведені в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Послідовності олігонуклеотидних праймерів, використані для проведення аналізу поліморфного варіанта ss469415590 гена *IFNL4*

Ген	Локус	Послідовності олігонуклеотидних праймерів	Відпалювання t °C
<i>IFNL4</i>	ss469415590	Com 5'-TCCTTTACACGGTGATCGCAGC-3' ΔG 5'-TCCTTTACACGGTGATCGCAGAA-3' TT 5'-TGATTGACCCTGAGCCTGCG-3'	62

Температурно-часові умови ампліфікації були наступними: початкова денатурація - 94°C (5 хв), 30 циклів: денатурація - 94°C (30 с), відпалювання праймерів – 62°C (30-45 с), елонгація - 72°C (30-40 с); фінальна елонгація - 72°C (5 хв). Для кожного індивіда проводили дві ПЛР реакції, використовуючи дві ПЛР суміші зі спільним праймером та з одним із специфічних праймерів для кожного з алельних варіантів. ПЛР продукти аналізували в 2%-ому агарозному гелі. Розмір ампліфікованих фрагментів становить 299 п.н.

Секвенування фрагментів гена *IFNL4*. З метою перевірки точності диференціації алелів в процесі сайт-специфічної ПЛР нами було проведено секвенування продуктів ПЛР гена *IFNL4*, отриманих з використанням вище описаної методики.

Після проведення ампліфікації продукти реакції фракціонували у 2% агарозному гелі з метою перевірки на наявність неспецифічних продуктів

ампліфікації. Далі зразки підлягали обробці екзонуклеазою *EcoI* (Thermo Fisher Scientific Inc., США) згідно протоколів фірми-виробника. Пряме секвенування було проведено з використанням набору „ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits”. Всі послідовності ДНК були проаналізовані в обох напрямках на приладі ABI Prism 3110 Genetic Analyser (Applied Biosystem, США). Встановлені послідовності нуклеотидів порівнювалися за допомогою програми Invitrogen Vector NTI Advance 10 із відповідною опублікованою послідовністю гена *IFNL4*, яка наведена у базі даних NCBI.

2.3.10 Використання біоінформатичних web-ресурсів та баз даних.

Пошук послідовностей проводили в базах даних нуклеїнових кислот на сайті Національного центра біотехнологічної інформації США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Аналіз послідовності гена проводили з допомогою програми Invitrogen Vector NTI Advance 10. Програма дозволяє в інтерактивному режимі проводити пошук заданих послідовностей, що використовували для пошуку місць одонуклеотидних замін та перевірки правильності підбору ендонуклеаз рестрикції для їх ідентифікації. Вбудований інструмент „PCR”, призначений для підбору ПЛР праймерів до заданої послідовності, здійснює пошук праймерів із збалансованими параметрами, а також дозволяє окремо аналізувати вже підібрані послідовності олігонуклеотидів на можливість утворення вторинних структур та визначати їх термодинамічні показники. Вбудований інструмент „Gel Display Window” – дозволяє проводити моделювання реального процесу розділення фрагментів в текстовій та графічній формі в агарозному чи акриламідному гелі, в залежності від попередньо заданих умов.

Перевірку специфічності праймерів проводили за допомогою програмного інструменту BLAST, розміщеного на порталі Національного центра біотехнологічної інформації (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Біоінформатичний аналіз нуклеотидної послідовності досліджуваних генів та поліморфних варіантів проводили з використанням інтернет-ресурсів баз даних GeneCards: The Human Gene Database (<http://www.genecards.org>), SNPinfo

(<http://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/index.html>), PROMO (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) та “1000 Genomes” (<http://browser.1000genomes.org/>).

2.3.11. Статистична обробка отриманих результатів. Для розрахунку частот алелів та теоретично очікуваного розподілу генотипів, показників фактичної і теоретичної гетерозиготності, розрахунку показника χ^2 використовували пакет комп'ютерних програм “Genepop”[171]. В цьому ж програмному пакеті розраховували точний двосторонній критерій Фішера для виявлення значимих відмінностей між досліджуваними групами.

У дослідженнях типу “випадок-контроль” з метою оцінки сили асоціації генетичного чинника з патологією розраховували показник відношення шансів (OR) – співвідношення шансів прояву певного стану дихотомічної змінної в двох групах суб'єктів [172,173]. Для розрахунку відношення шансів обчислювали вірогідність впливу факторів ризику (в даному випадку, поліморфного алеля або певного генотипу) в контрольній та дослідній групах:

Шанс знайти генетичний маркер в дослідній групі = $(A(A+B))/(B(A+B)) = A/B$;

Шанс знайти генетичний маркер в контрольній групі = $(C(C+D))/(D(C+D)) = C/D$,

де

A – кількість осіб з генетичним маркером в дослідній групі,

B – кількість індивідів без маркера в дослідній групі,

C – кількість осіб з генетичним маркером в контрольній групі,

D – кількість індивідів без маркера в контрольній групі.

Таким чином показник OR, розраховується за формулою:

$$OR = (A/B)/(C/D) = (A \times D)/(B \times C)$$

Інтерпретацію розрахованого показника проводили наступним чином. Якщо $OR = 1$, то досліджуваний маркер не впливає на прояв ознаки. $OR > 1$ означає, що маркер асоційований з підвищеними шансами прояву ознаки, а $OR < 1$, навпаки – зі зниженими.

З метою оцінки точності OR розраховували 95% довірчий інтервал (ДІ). Чим більший інтервал, тим менша точність OR. Якщо в довірчий інтервал входила

одиниця, показник OR вважали недостовірним. Слід мати на увазі, що саме по собі значення OR не є чутливим до розміру вибірки, однак від розміру вибірки залежить розмір стандартного відхилення та довірчий інтервал [173]. Розрахунок OR проводили з використанням програмного пакету “OpenEpi”[174].

Для того щоб з більшою точністю детектувати асоціацію генетичного чинника з патологічним станом, для кожного поліморфного маркера тестували три можливі генетичні моделі: доміную, рецесивну та адитивну. Для цього використовували тест Кохрана-Армітаджа, зважаючи на його нечутливість до відповідності розподілу генотипів рівновазі Харді-Вайнберга в групі “випадків”. В результаті, з трьох моделей обирали найбільш достовірну статистично, надаючи в спірних випадках перевагу адитивній моделі [167,172].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. 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 наступні критерії. 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 замін, 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 досліджених європейських популяціях повинна була бути не менше 0,2.

За результатами проведеного аналізу послідовності регуляторних ділянок гена *IL6* нами була обрана для дослідження МНЗ гуаніну на цитозин в положенні -174 промоторної ділянки гена. За результатами передбачення впливу цього поліморфізму на структуру сайтів упізнавання транскрипційних факторів ми встановили, що МНЗ знаходиться в сайті упізнавання фактора NRD і може призводити до зникнення цис-сайту з промоторної ділянки. Аналіз літературних

даних показав наявність досліджень *in vitro*, в яких спостерігали знижений рівень експресії конструктів з алелем -174 C [14]. Окрім цього, було показано, що наявність цієї МНЗ також впливає на здатність комплексу естроген-естрогеновий рецептор регулювати активність промотору гена *IL6* [110].

Аналіз ділянки промотору та першого інтрона гена *IL8* дозволив нам обрати для дослідження поліморфний варіант rs2227306 (синоніми -781C/T, +781C/T, 65-204C/T), який розташований в позиції 781 першого інтрона і є МНЗ цитозину на тимін. Обраний поліморфний варіант призводить до появи сайту упізнання для транскрипційного фактора C/EBP, здатного підвищувати рівень експресії гена. Подібний ефект був задокументований в ході експериментальних досліджень [125].

За результатами аналізу промоторної ділянки гена *IL10* нами було обрано одразу дві МНЗ: rs1800872 - трансверсія цитозину на аденін в положенні -592, та rs1800896 – транзиція гуаніну на аденін в позиції -1082. За результатами передбачення функціонального впливу даних поліморфних варіантів на регуляторні сайти промотору гена *IL10* ми встановили, що rs1800872 призводить до зникнення сайту упізнання транскрипційного фактора Sp1. За умови наявності алеля rs1800896А зникає сайт упізнання для фактора C/EBP. Таким чином, можна передбачити, що обидві заміни будуть асоційовані зі зниженим рівнем експресії гена та продукції відповідного білка, що підтверджується результатами експериментальних досліджень [30,31]. Варто зазначити, що для даних МНЗ показаний певний рівень нерівноваги за зчепленням.

При виборі поліморфного варіанту гена *IFNL4* для дослідження керувались експериментальними даними щодо появи нового транскрипту у осіб з динуклеотидним поліморфізмом ss469415590 TT/ΔG (синонім rs368234815) в першому екзоні гена та нерівноваги за зчепленням цього варіанта з rs12979860 [17] для якого раніше була показана асоціація з ефективністю противірусної терапії для пацієнтів з хронічним гепатитом С з України [175].

Таким чином, 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, поліморфізми *IL6* -174 C/G, *IL10* -592C/A та -1082 G/A – зі зниженим рівнем експресії відповідних генів та продукції інтерлейкінів, а ss469415590 призводить до появи рамки зчитування та синтезу IFN- λ 4.

Основні результати пункту опубліковані в роботах:

1. *IL1B, IL6 and IL8 gene polymorphisms involvement in recurrent corneal erosion in patients with hereditary stromal corneal dystrophies* / Kucherenko A.M., Pampukha V.M., Drozhzhyna G.I., Livshits L.A. // *Cytology and Genetics*. – 2013. – Vol. 47, № 3. – P. 164 – 166.
2. *Recurrent pregnancy loss association with allelic variants of IL8 and IL10 genes* / A. M. Kucherenko, R. V. Gulkovskiy, K. G. Khazhylenko, I. I. Vorobiova, T.S. Nakvasiuk, L. A. Livshits // *ScienceRise*. – 2014. – Vol. 2, № 2. – P. 7-10.

3.2. 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 є мононуклеотидними замінами, нами були модифіковані раніше опубліковані методики, які базуються на ПДРФ-аналізі продуктів ампліфікації *in vitro* послідовностей ДНК, що містять обрані для дослідження мононуклеотидні заміни [14,15,30,31]. Ендонуклеази рестрикції, як і більшість комерційних наборів ферментів, комплектуються концентрованими буферними розчинами, проте необхідність їх використання знижує технологічність процесу аналізу, через те, що додаються дві додаткові операції: переосадження продукту ПЛР та додавання концентрованого розчину, для якого потрібно провести розрахунок необхідного

об'єму буферного розчину залежно від виходу в кожній окремі ПЛР. В процесі виконання великих серій аналізів такі процедури вимагають додаткових витрат часу та реактивів. В даному дослідженні ми проводили специфічну рестрикцію без використання додаткових буферів, а безпосередньо в ПЛР суміші, що містить продукт ПЛР. Це є можливим, оскільки склад реакційної суміші подібний до складу рекомендованих робочих буферних розчинів, адже рН реакційної суміші (7,8-8,0 при 37°C) та іонна сила відрізняються від таких для рекомендованого виробником буферного розчину несуттєво.

Попередньо було проведено випробування на можливість проведення рестрикції без використання рекомендованих буферів для всіх ендонуклеаз рестрикції, необхідних для генотипування досліджуваних поліморфних варіантів. Це було реалізовано наступним чином. Паралельно проводили дві серії гідролізу: в першому випадку гідроліз проводили за схемою, рекомендованою фірмою-виробником (з використанням буферу для ендонуклеаз рестрикції), в другому – без використання буфера. В обох реакційних сумішах спостерігали гідроліз ПЛР-продуктів за всіма наявними сайтами рестрикції. Таким чином, було встановлено, що відмінності в складі реакційної суміші та рекомендованого буферу дійсно виявилися не настільки критичними, щоб зашкодити процесу гідролізу. Варто зазначити, що з метою компенсації можливого зниження активності ферменту за умови відсутності буферного розчину, ендонуклеаза рестрикції додавалася в невеликому надлишку.

Для аналізу послідовності ділянки ДНК промоторної ділянки гена *IL6*, що містить мононуклеотидну заміну -174 G/C використовували метод ПЛР ампліфікації (див. пункт 2.3.7.), з наступним гідролізом продукту ендонуклеазою рестрикції *NlaIII* та з подальшою візуалізацією у 2%-ому агарозному гелі.

У випадку МНЗ з'являється один з сайтів впізнавання для ендонуклеази *NlaIII*. Тому у індивідів без мононуклеотидної заміни -174 G/C ми спостерігаємо фрагменти довжиною 167 п.н. та 31 п.н., у гетерозиготних носіїв мононуклеотидної заміни -174 G/C спостерігаються рестрикційні фрагменти довжиною 167 п.н., 122 п.н., 45 п.н. та 31 п.н., а у гомозиготних носіїв

мононуклеотидної заміни -174 G/C – рестрикційні фрагменти довжиною 122 п.н., 45 п.н. та 31 п.н.

На рис. 3.1. зображена електрофореграма розділення фрагментів, що утворились після гідролізу продукту ампліфікації гена *IL6* ендонуклеазою рестрикції *NlaIII* в 2% агарозному гелі. Фрагменти 45 п.н. та 31 п.н. не візуалізуються через їх невелику масу.

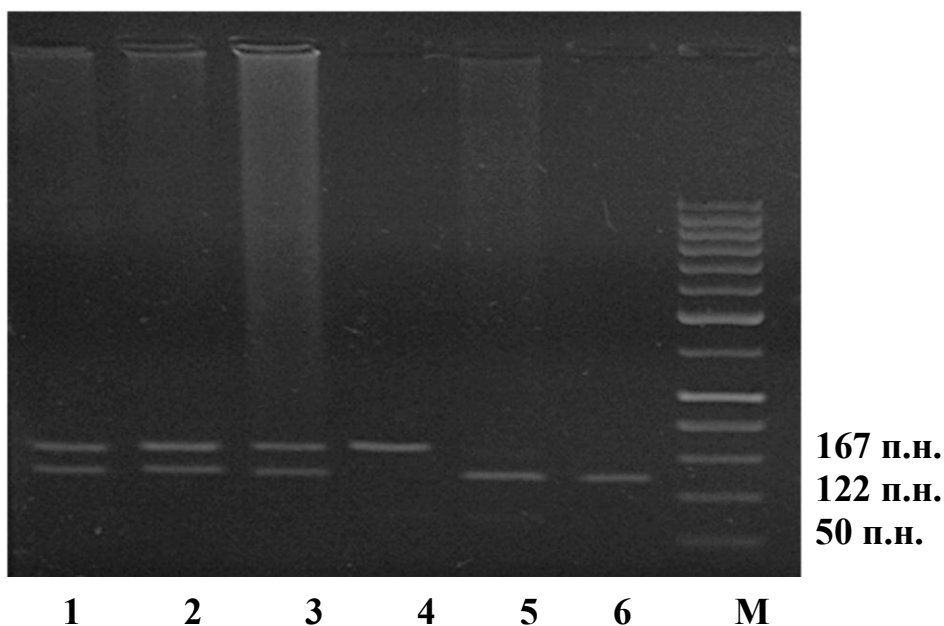


Рис. 3.1. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *IL6*, що утворились після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *NlaIII*: 1, 2, 3 - CG (гетерозигота); 4 - GG (гомозигота); 5, 6 - CC (гомозигота); M – маркер молекулярної маси (50 п.н.)

Поліморфізм -781C/T локалізований у 1-му інtronі гена *IL-8* і являє собою однонуклеотидну заміну цитозину на тимін. Результатом даної заміни є зникнення сайту впізнавання для ендонуклеази рестрикції *EcoRI*. Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму 781C/T проводився на основі методу ПЛР (див. пункт 2.3.7.), з наступним гідролізом продуктів ПЛР специфічною ендонуклеазою рестрикції *EcoRI*. ПЛР-продукт, що утворюється при використанні зазначених праймерів має розмір 203 п.н. В результаті гідролізу ампліфіковані фрагменти ДНК алеля -781C розщеплюються на два фрагменти, розмір одного з яких

становить 184 п.н., а розмір іншого – 19 п.н. Фрагмент 19 п.н. не візуалізується на електрофореграмі. Продукт ампліфікації алеля -781Т залишається інтактним. Наявність продуктів ампліфікації та розділення фрагментів ПЛР продукту гена *IL8*, після гідролізу ферментом аналізували за допомогою електрофорезу в 2%-му агарозному гелі (рис. 3.2).

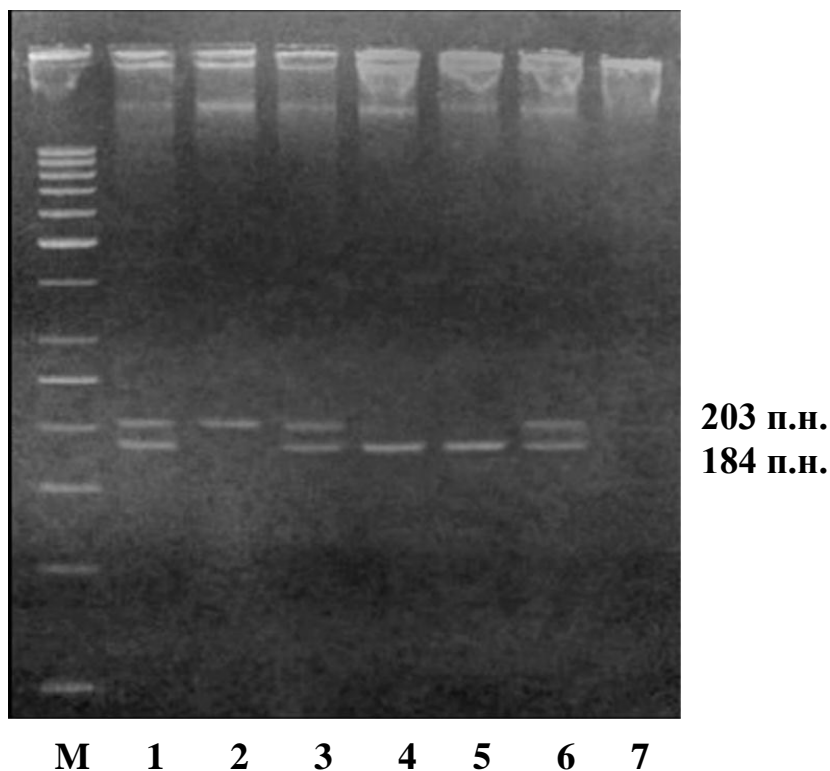


Рис. 3.2. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *IL8* після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *EcoRI*: М – маркер молекулярної маси (50 п.н.); 1, 3, 6 – СТ (гетерозигота); 2 – ТТ (гомозигота); 4, 5 – СС (гомозигота); 7 – негативний контроль

Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму -592С/А гена *IL10* проводився на основі методу ПЛР (описаного в розділі 2.3.7.) з наступним рестрикційним аналізом методом ПДРФ. Поліморфізм -592С/А являє собою однуклеотидну заміну С на А в промоторній ділянці гена *IL10*. Заміна -592С/А веде до появи сайту рестрикції, що призводить до диференційного гідролізу різних алельних варіантів гена *IL10* ендонуклеазою рестрикції *RsaI* і дає можливість їх ідентифікувати. Наявність продуктів ампліфікації та розділення фрагментів ПЛР

продукту гена *IL10*, після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *RsaI* аналізували за допомогою електрофорезу в 2%-му агарозному гелі (рис. 3.3).

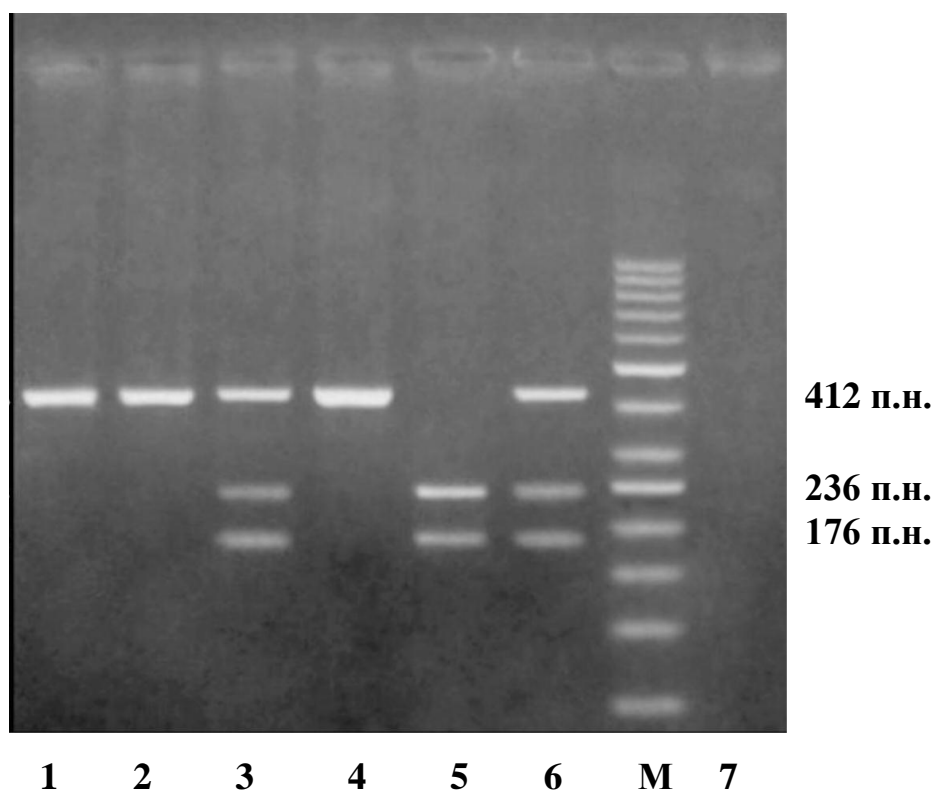


Рис. 3.3. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *IL10* після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *RsaI*: 1, 2, 4 - гомозиготи СС; 3, 6 – гетерозигота АС; 5 – гомозигота АА; М – маркер молекулярної маси (50 п.н.); 7 – негативний контроль (H₂O)

ПЛР-продукт, що утворюється, має розмір 412 п.н. Таким чином, після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції, продукт ампліфікації алеля -592А гена *IL-10* буде розщеплений на два фрагменти, довжиною 236 п.н. та 176 п.н. Продукт ампліфікації алеля -592С (дикий тип) не буде гідролізуватися.

Поліморфізм -1082G/A локалізований у промоторному регіоні гена *IL10* і являє собою однонуклеотидну заміну G на A. Результатом даної заміни є зникнення сайту впізнавання для ендонуклеази рестрикції *EcoNI*. Тому для детекції поліморфізму -1082G/A гена *IL10* проводили ампліфікацію *in vitro* нуклеотидних послідовностей відповідної ділянки даного гена методом ПЛР з

подальшим гідролізом продуктів ПЛР ферментом *EcoNI*. Розділення фрагментів ПЛР продукту гена *IL-10*, після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *EcoNI* аналізували за допомогою електрофорезу в 2%-му агарозному гелі (рис. 3.4).

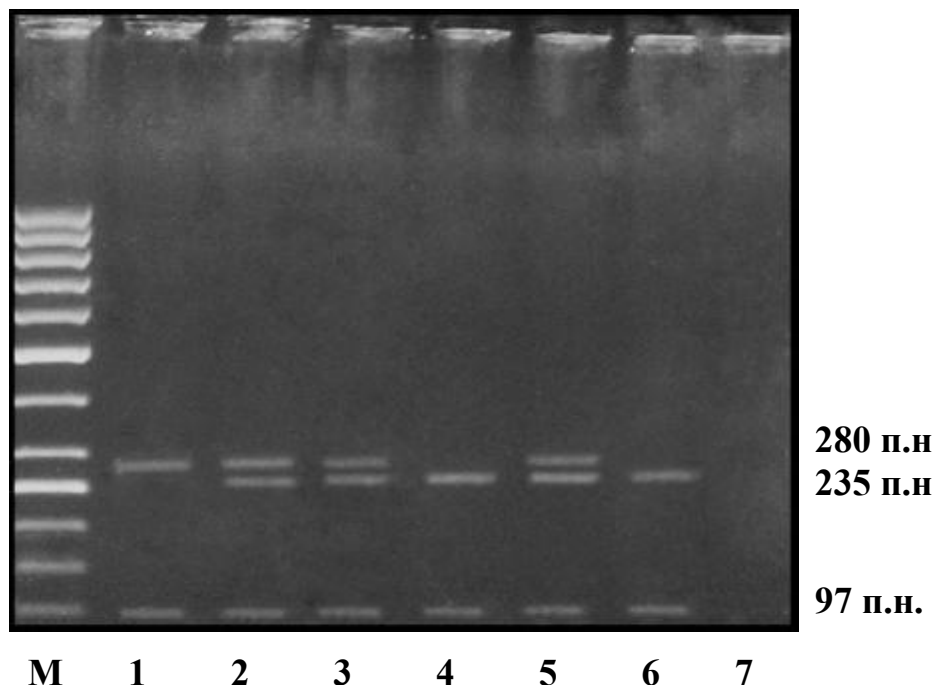


Рис. 3.4. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *IL10* після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *EcoNI*: 1 – AA (гомозигота); 2, 3, 5 – GA (гетерозиготи); 4, 6 – GG (гомозигота); М – маркер молекулярної маси (50 п.н.); 7 – негативний контроль (H_2O)

ПЛР-продукт, що утворюється, має розмір 377 п.н. Фрагменти ДНК, отриманих після гідролізу ампліфікованих фрагментів ДНК алеля -1082A мають розмір 97 п.н. та 280 п.н. Після рестрикції ампліфікованих фрагментів ДНК алеля -1082G на електрофореграмі спостерігаємо два фрагменти розміром 97 та 253 п.н. (фрагмент розміром 27 п.н. на електрофореграмі не ідентифікується).

Із використанням описаних методик аналізу алельного поліморфізму генів *IL6*, *IL8* та *IL10* за обраними поліморфними варіантами нами проведено молекулярно-генетичний аналіз в популяційній вибірці здорового населення з різних регіонів України, яка складалась з 101 особи, 50 чоловіків та 51 жінка

(середній вік чоловіків та жінок був $36,2 \pm 6,7$ та $34,4 \pm 4,4$ років відповідно).
Результати розподілу генотипів в даній групі індивідів наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

**Розподіл генотипів та алелів за поліморфізмами -174G/C гена *IL6* ,
-781C/T гена *IL8* , -592C/A та -1082G/A гена *IL10* у індивідів з України**

Генотип / алель	Кількість (частота)
1	2
-174G/C ген <i>IL6</i>	
Загалом	88
GG	30 (0,341)
GC	39 (0,443)
CC	19 (0,216)
Алель G	99 (0,562)
Алель C	77 (0,438)
-781C/T ген <i>IL8</i>	
Загалом	100
CC	30 (0,300)
CT	45 (0,450)
TT	25 (0,250)
Алель C	105 (0,525)
Алель T	95 (0,475)
-592C/A ген <i>IL10</i>	
Загалом	101
CC	68 (0,673)
CA	29 (0,287)
AA	3 (0,030)
Алель C	164 (0, 820)
Алель A	36 (0,180)

1	2
-1082 G/A ген <i>IL10</i>	
Загалом	100
GG	23 (0,230)
GA	58 (0,580)
AA	19 (0,190)
Алель G	104 (0,520)
Алель A	96 (0,480)

Отже, за результатами дослідження розповсюдження поліморфних варіантів генів *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, як видно з табл. 3.1 виявилися: -174GC гена *IL6* (частота – 0,443) , -781CT гена *IL8* (частота – 0,450), -592CC (частота – 0,673) та -1082GA гена *IL10* (частота – 0,580). Відповідно, 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.

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за всіма поліморфними варіантами в популяційній групі свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга. Показники гетерозиготності досліджуваних локусів наведені у таблиці 3.2.

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.

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>	0,580	0,499	2,62	0,11

Примітка. H_o – фактична гетерозиготність; H_e – теоретична гетерозиготність

Зважаючи на локалізацію обраних поліморфних варіантів гена *IL10* нами було перевірено наявність нерівноваги за зчепленням між цими МНЗ у популяційній вибірці здорового населення з України. Отримані результати щодо розподілу генотипів та алельних варіантів наведені у таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Розподіл генотипів та алелів за варіантами гена *IL10* у здорових індивідів з популяції України

		-1082 G/A ген <i>IL10</i>			D'	r^2
		<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>		
-592C/A ген <i>IL10</i>	<i>CC</i>	22	36	10	0,818	0,154
	<i>CA</i>	1	21	7		
	<i>AA</i>	0	1	2		

Примітка. D' – нормалізований коефіцієнт нерівноваги; r^2 – коефіцієнт кореляції

За результатами проведених розрахунків встановлено, що між двома досліджуваними поліморфними локусами гена *IL10* у вибірці індивідів з України існує нерівновага за зчепленням ($p < 0,001$).

Наступним етапом дослідження мононуклеотидних замін -174G/C гена *IL6*, -781C/T гена *IL8*, -592C/A та -1082G/A гена *IL10* у здорових індивідів з популяції

України було порівняння розподілу генотипів та алельних варіантів залежно від статі. Отримані результати щодо розподілу генотипів та алельних варіантів наведені у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

**Розподіл генотипів та алелів за мононуклеотидними замінами
-174G/C гена *IL6* , -781C/T гена *IL8* , -592C/A та -1082G/A гена *IL10* у
здорових жінок та чоловіків з популяції України**

Локус	Генотип	Жінки		Чоловіки		P*
		n	f	n	f	
1	2	3	4	5	6	7
-174 G/C ген <i>IL6</i>	<i>GG</i>	18	0,391	12	0,286	0,759
	<i>GC</i>	17	0,369	22	0,524	
	<i>CC</i>	11	0,240	8	0,190	
	<i>Усього</i>	46		42		
	Алель G	53	0,576	46	0,548	0,771
	Алель C	39	0,424	38	0,452	
-781 C/T ген <i>IL8</i>	<i>CC</i>	16	0,320	14	0,280	0,889
	<i>CT</i>	21	0,420	24	0,480	
	<i>TT</i>	13	0,260	12	0,240	
	<i>Усього</i>	50		50		
	Алель C	53	0,530	52	0,520	0,830
	Алель T	47	0,470	48	0,480	
-592 C/A ген <i>IL10</i>	<i>CC</i>	35	0,700	33	0,660	0,715
	<i>CA</i>	14	0,280	15	0,300	
	<i>AA</i>	1	0,020	2	0,040	
	<i>Усього</i>	50		50		
	Алель C	84	0,840	81	0,810	0,710
	Алель A	16	0,160	19	0,190	

1	2	3	4	5	6	7
-1082 G/A ген <i>IL10</i>	GG	12	0,240	10	0,200	1,000
	GA	27	0,540	32	0,640	
	AA	11	0,220	8	0,160	
	<i>Усього</i>	50		50		
	Алель G	51	0,510	52	0,520	1,000
	Алель A	49	0,490	48	0,480	

Примітка. n – абсолютна кількість, f – частота, * - за результатами розрахунку двостороннього точного тесту Фішера

В даному дослідженні ми не виявили достовірних відмінностей у розподілі генотипів та алельних варіантів за мононуклеотидними замінами -174G/C гена *IL6* , -781C/T гена *IL8* , -592C/A та -1082G/A гена *IL10* у жінок та чоловіків з популяційної вибірки здорового населення України.

Основні результати пункту опубліковані в роботах:

- IL1B*, *IL6* and *IL8* gene polymorphisms involvement in recurrent corneal erosion in patients with hereditary stromal corneal dystrophies / Kucherenko A.M., Pampukha V.M., Drozhzhyna G.I., Livshits L.A. // Cytology and Genetics. – 2013. – Vol. 47, № 3. – P. 164 – 166.
- IL1B* and *IL8* polymorphisms involvement in recurrent corneal erosion in patients with hereditary stromal corneal dystrophies / Kucherenko A.M., Pampukha V.N., Drozhyna G.I., Gulkovskyi R. Livshits L.A // European human genetics conference 2012, June 23 - 26, 2012, NCC Ost, Nürnberg, Germany, European Journal of Human Genetics. – 2012. - Vol. 20 Suppl. 1. – P. 393-394
- IL6* -174G/C вариант – модификатор фенотипа при наследственной дистрофии роговицы / Кучеренко А.М., Пампуха В.Н., Дрожжина Г.И., Лившиц Л.А. // V Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Непостоянство генома» (3-7 декабря 2012 г., Звенигород, Россия). Тезисы докладов. – М.: Мегакаталог, 2012. – 80 с.

4. *IL1B, IL6 and IL8* gene polymorphisms involvement in recurrent erosion in patients with lattice corneal dystrophy / Drozhzhyna G., Kucherenko A., Pampukha V., Gaydamaka T., Livshits L. //Congress of the European Society of Ophthalmology (SOE) 2013 Abstract book. – P. 65

5. Ассоциация полиморфных вариантов генов интерлейкинов ИЛ1 β , ИЛ8, ИЛ10 с развитием воспалительной реакции при рецидивирующих эрозиях роговицы у пациентов с решетчатой дистрофией роговицы / Дрожжина Г.И., Кучеренко А.М., Пампуха В.Н., Лившиц Л.А. // Материалы IX Всероссийской конференции с международным участием «Федоровские чтения-2013», Москва 21-22 июня 2013г., С. 141-142.

6. Молекулярно-генетична природа клінічної гетерогенності спадкових дистрофій строми рогівки / А. М. Кучеренко, В. М. Пампуха, Г. І. Дрожжина, Л. А. Лівшиць // Клінічна генетика та перинатальна діагностика. Збірник наукових робіт I Національного конгресу «Рідкісні хвороби та вроджені вади розвитку як важлива медична та соціальна проблема XXI століття: діагностика, лікування, профілактика», 2013, № 1., С. 100-101.

3.3. 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, нами було проведено молекулярно-генетичне дослідження цих варіантів в групі пацієнтів з рецидивуючими ерозіями рогівки (56 осіб) та без ерозій в анамнезі (13 осіб). Отримані результати по розподілу генотипів в досліджуваних групах наведені в таблиці 3.5.

**Розподіл генотипів та алелів за мононуклеотидними замінами
-174G/C гена *IL6* , -781C/T гена *IL8* , -592C/A гена *IL10* у пацієнтів з
різним ступенем запалення, викликаним дистрофією рогівки**

Генотип / алель	Пацієнти з ерозіями	Пацієнти без ерозій	Популяційна група
Кількість (частота)			
-174G/C ген <i>IL6</i>			
Загалом	50	12	88
GG	11 (0,220)	6 (0,500)	30 (0,341)
GC	30 (0,600)	4 (0,333)	39 (0,443)
CC	9 (0,180)	2 (0,167)	19 (0,216)
Алель G	52 (0,520)	16 (0,667)	99 (0,562)
Алель C	48 (0,480)	8 (0,333)	77 (0,438)
-781C/T ген <i>IL8</i>			
Загалом	56	13	100
CC	17 (0,304)	3 (0,230)	30 (0,300)
CT	33 (0,589)	5 (0,385)	45 (0,450)
TT	6 (0,107)	5 (0,385)	25 (0,250)
Алель C	67 (0,598)	11 (0,423)	105 (0,525)
Алель T	45 (0,402)	15 (0,577)	95 (0,475)
-592C/A ген <i>IL10</i>			
Загалом	56	13	101
CC	29 (0,518)	5 (0,385)	68 (0,673)
CA	24 (0,429)	6 (0,462)	30 (0,297)
AA	3 (0,054)	2 (0,153)	3 (0,030)
Алель C	82 (0,732)	16 (0,615)	164 (0,820)
Алель A	30 (0,268)	10 (0,385)	36 (0,180)

В досліджуваній групі пацієнтів з ерозіями нами було виявлено 9 індивідів (0,18) – гомозигот за поліморфним алелем -174С, асоційованим зі зниженою продукцією інтрелейкіну-6. Мажорним в досліджуваній групі, як і у популяційній вибірці, виявився гетерозиготний генотип -174GC (0,600). Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом в групі індивідів з рецидивуючими ерозіями, обумовленими гратчастою дистрофією рогівки, свідчив про відхилення у розподілі генотипів від співвідношення Харді-Вайнберга ($\chi^2=4,08$; $p=0,04$). Виходячи з отриманого розподілу генотипів в досліджуваній, та двох контрольних групах, нами також був проведений розрахунок частот алелів за даним поліморфним варіантом. Ми встановили, що частота носіїв алеля -174С гена *IL6* в контрольній популяційній групі (0,659) була достовірно ($p<0,05$) нижчою порівняно з групою пацієнтів з ерозіями (0,780) (рис. 3.5).

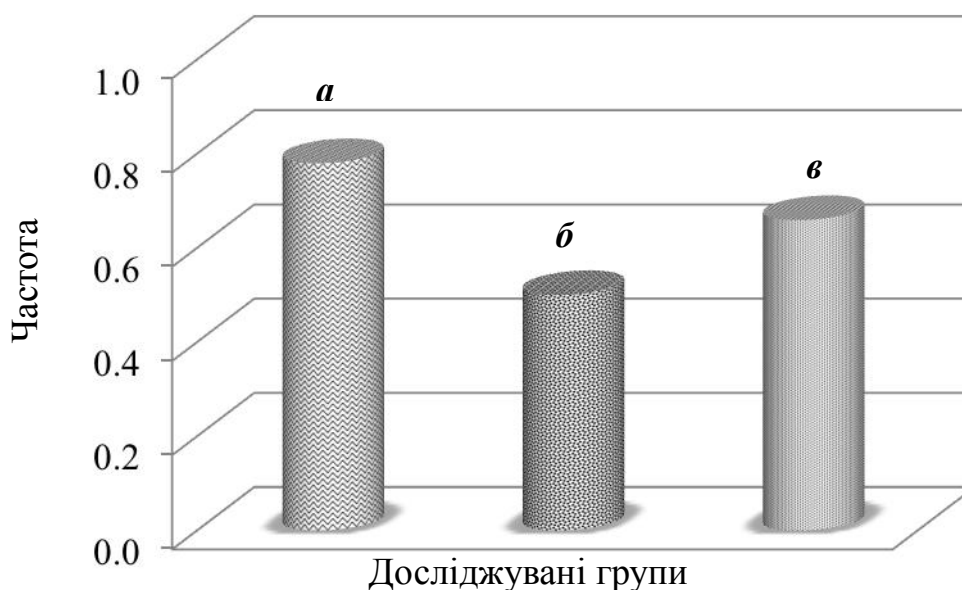


Рис. 3.5. Розподіл частоти носіїв поліморфного алеля -174С гена *IL6* серед: *а* – пацієнтів з ерозіями; *б* – контрольної групи пацієнтів без ерозій; *в* – популяційної групи

Достовірних відмінностей з контрольною групою пацієнтів без ерозій встановити не вдалося, проте спостерігалася тенденція до зниження частоти носіїв алеля -174С в цій групі (0,500) порівняно з пацієнтами з ерозіями. Те, що ці

відмінності не досягли достовірності, може бути частково обумовлено невеликим розміром групи пацієнтів без ерозії.

За результатами дослідження розподілу частот генотипів за алельним варіантом -781С/Т гена *IL8*, в групі індивідів з рецидивуючими ерозіями рогівки було встановлено, що мажорним генотипом в даній групі є гетерозиготний генотип -781СТ (0,589). Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом в групі індивідів з рецидивуючими ерозіями, свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга ($\chi^2=2,86$; $p=0,09$).

За результатами порівняння розподілу генотипів за алельним варіантом -781С/Т гена *IL8* в досліджуваній, контрольній та популяційній групах було встановлено, що частота генотипу -781ТТ гена *IL8*, асоційована з підвищеними рівнем продукції прозапального інтерлейкіну-8 була 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. 3.6).

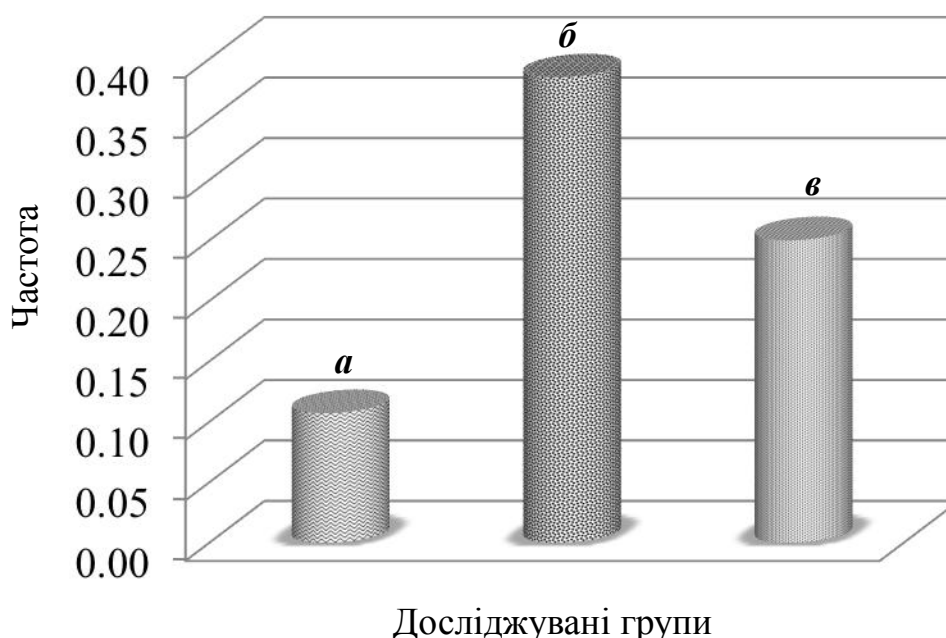


Рис. 3.6. Розподіл частоти індивідів з генотипом -781ТТ гена *IL8* серед: а – пацієнтів з ерозіями; б – контрольної групи пацієнтів без ерозій; в – популяційної групи

Більше того, за розрахунками показника відношення шансів, встановлено, що індивіди-носії алеля $-781C$ гена *IL8* мають вп'ятеро вищий відносний ризик розвитку рецидивуючих ерозій рогівки, обумовлених гратчастою дистрофією (OR = 5,21; ДІ 95%: 1,28 - 21,16).

За результатами молекулярно-генетичного дослідження встановлено розподіл генотипів за поліморфним алелем $-592 C/A$ гена *IL10* в досліджуваній та контрольній групах. В групі пацієнтів з рецидивуючими ерозіями рогівки, як і в популяційній групі переважав генотип, гомозиготний за алелем дикого типу $-592 CC$ (0,518), тоді як в групі пацієнтів без ерозій мажорним генотипом виявився гетерозиготний $-592CA$ (0,462). Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом в групі індивідів з рецидивуючими ерозіями, свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга ($\chi^2=0,49$; $p = 0,380$).

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) (рис.3.7).

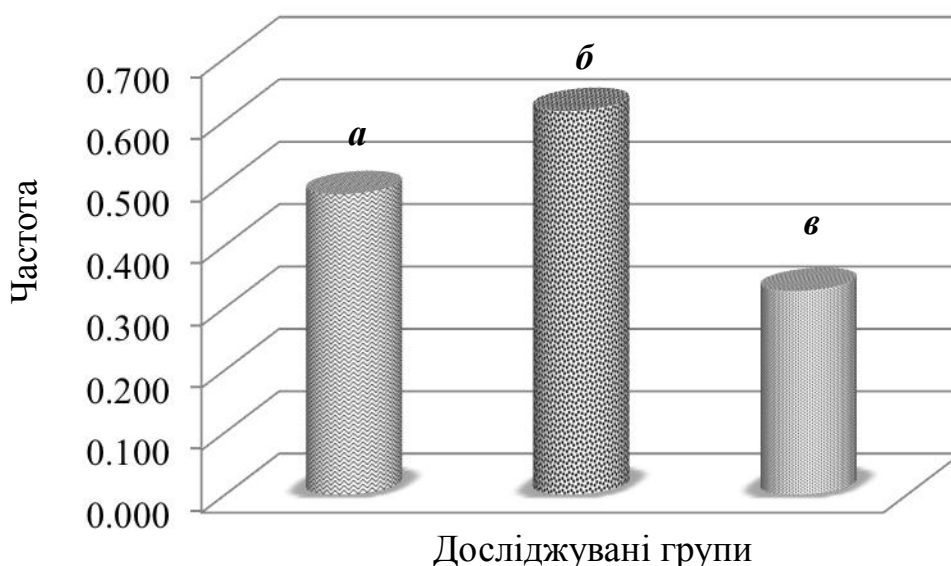


Рис. 3.7. Розподіл частоти носіїв поліморфного алеля $-592A$ гена *IL10* серед: *a* – пацієнтів з ерозіями; *б* – контрольної групи пацієнтів без ерозій; *в* – популяційної групи

Підсумовуючи дані, наведені в цьому підрозділі, зазначимо, що нами вперше було проаналізовано розподіл генотипів за алельними варіантами -174G/C гена *IL6*, -781C/T гена *IL8*, -592C/C гена *IL10* у пацієнтів з різним ступенем запалення, викликаним гратчастою дистрофією рогівки. Встановлено, що алельні варіанти -174C гена *IL6*, -781C гена *IL8* та -592A гена *IL10* є вірогідними модифікаторами ступеню запального процесу у пацієнтів з гратчастою дистрофією стромы рогівки та ймовірними генетичними маркерами ризику розвитку рецидивуючих ерозій рогівки у таких пацієнтів.

Основні результати пункту опубліковані в роботах:

1. *IL1B*, *IL6* and *IL8* gene polymorphisms involvement in recurrent corneal erosion in patients with hereditary stromal corneal dystrophies / Kucherenko A.M., Pampukha V.M., Drozhzhyna G.I., Livshits L.A. // Cytology and Genetics. – 2013. – Vol. 47, № 3. – P. 164 – 166.
2. *IL1B* and *IL8* polymorphisms involvement in recurrent corneal erosion in patients with hereditary stromal corneal dystrophies / Kucherenko A.M., Pampukha V.N., Drozhyna G.I., Gulkovskyi R. Livshits L.A // European human genetics conference 2012, June 23 - 26, 2012, NCC Ost, Nürnberg, Germany, European Journal of Human Genetics. – 2012. - Vol. 20, Suppl. 1. – P. 393-394
3. *IL6* -174G/C вариант – модификатор фенотипа при наследственной дистрофии роговицы / Кучеренко А.М., Пампуха В.Н., Дрожжина Г.И., Лившиц Л.А. // V Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Непостоянство генома» (3-7 декабря 2012 г., Звенигород, Россия). Тезисы докладов. – М.: Мегакаталог, 2012. – 80 с.
4. *IL1B*, *IL6* and *IL8* gene polymorphisms involvement in recurrent erosion in patients with lattice corneal dystrophy / Drozhzhyna G., Kucherenko A., Pampukha V., Gaydamaka T., Livshits L. // Congress of the European Society of Ophthalmology (SOE) 2013 Abstract book. – P. 65

5. Ассоциация полиморфных вариантов генов интерлейкинов ИЛ1 β , ИЛ8, ИЛ10 с развитием воспалительной реакции при рецидивирующих эрозиях роговицы у пациентов с решетчатой дистрофией роговицы / Дрожжина Г.И., Кучеренко А.М., Пампуха В.Н., Лившиц Л.А. // Материалы IX Всероссийской конференции с международным участием «Федоровские чтения-2013», Москва 21-22 июня 2013г., С. 141-142.

6. Молекулярно-генетична природа клінічної гетерогенності спадкових дистрофій строми рогівки / А. М. Кучеренко, В. М. Пампуха, Г. І. Дрожжина, Л. А. Лівшиць // Клінічна генетика та перинатальна діагностика. Збірник наукових робіт I Національного конгресу «Рідкісні хвороби та вроджені вади розвитку як важлива медична та соціальна проблема XXI століття: діагностика, лікування, профілактика», 2013. – № 1. – С. 100-101.

3.4. Дослідження ролі мононуклеотидних замінів -174G/C гена *IL6* , -781C/T гена *IL8* , -592C/A та -1082G/A гена *IL10* у пацієнтів з ішемічним інсультом

Оскільки обрані для дослідження поліморфні варіанти виявилися потенційно важливими генетичними факторами модифікації ступеню супутньої запальної реакції у пацієнтів з гратчастою дистрофією рогівки, логічно припустити, що вони також є перспективними кандидатами для дослідження на асоціацію з мультифакторними станами, які призводять до розвитку масової патології, зокрема ішемічного інсульту. Молекулярно-генетичний аналіз мононуклеотидних замінів -174G/C гена *IL6* , -781C/T гена *IL8* , -592C/A та -1082G/A гена *IL10* проводили в групі пацієнтів зі встановленим діагнозом ішемічний інсульт (n=183) та в контрольній групі осіб похилого віку, старших за 65 років, без випадків інсульту в анамнезі (n=88). Отримані за результатами аналізу розподіли генотипів та алельних варіантів наведені у таблиці 3.6.

Таблиця 3.6

**Розподіл генотипів та алелів за мононуклеотидними замінами
-174G/C гена *IL6* , -781C/T гена *IL8* , -592C/A та -1082G/A гена *IL10* у
пацієнтів з ішемічним інсультом та в контрольній групі**

Локус	Генотип	Пацієнти з ішемічним інсультом		Контрольна група		Відношення шансів		
		n	f	n	f	p	OR	ДІ 95%:
1	2	3	4	5	6	7	8	9
-174 G/C ген <i>IL6</i>	<i>GG</i>	53	0.306	24	0.289	0,55	1.09	0.61 – 1.93
	<i>GC</i>	93	0.538	43	0.518		1.08	0.64 – 1.83
	<i>CC</i>	27	0.156	16	0.193		0.77	0.39 – 1.53
	<i>Усього</i>	173		83		–		
	Алель G	199	0,575	91	0,548	–		
	Алель C	147	0,425	75	0,452	–		
-781 C/T ген <i>IL8</i>	<i>CC</i>	33	0,184	26	0,299	0,04	0,53	0,29 – 0,96
	<i>CT</i>	102	0,570	45	0,517		1,89	1,04 – 3,42
	<i>TT</i>	44	0,246	16	0,184		–	
	<i>Усього</i>	179		87		–		
	Алель C	168	0,469	97	0,557	–		
	Алель T	190	0,531	77	0,443	–		
-592 C/A ген <i>IL10</i>	<i>CC</i>	116	0,682	49	0,570	0,01	5,71	1,47 – 22,11
	<i>CA</i>	51	0,300	29	0,337		0,18	0,05 – 0,68
	<i>AA</i>	3	0,018	8	0,093		–	
	<i>Усього</i>	170		86		–		
	Алель C	283	0,832	127	0,738	–		
	Алель A	57	0,168	45	0,262	–		

Продовження табл. 3.6

1	2	3	4	5	6	7	8	9
-1082 G/A ген	GG	41	0,244	15	0,176	0,5	1,51	0,78 – 2,91
	GA	77	0,458	45	0,529		0,75	0,45 – 1,27
	AA	50	0,298	25	0,294		1,02	0,57 – 1,80
<i>IL10</i>	<i>Усього</i>	168		85		–		
	Алель G	159	0,473	75	0,441	–		
	Алель A	177	0,527	95	0,559	–		

Примітка. n – абсолютна кількість, f – частота, ДІ – довірчий інтервал

В досліджуваній групі пацієнтів з ішемічним інсультом нами було виявлено 53 індивіди (0,306), гомозиготних за алелем дикого типу -174G гена *IL6*, 93 пацієнти (0,538) з гетерозиготним генотипом 174GC, та 27 індивідів (0,156) – гомозигот за поліморфним алелем -174C, асоційованим зі зниженою продукцією інтрелейкіну-6. Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом, свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга ($\chi^2=1,01$; $p=0,31$).

Аналіз розподілу генотипів за поліморфним варіантом -1082 G/A гена *IL10* в досліджуваній групі пацієнтів з ішемічним інсультом показав наступне: 41 індивід (0,244) мав гомозиготний генотип -1082 GG, 77 індивідів (0,458) – гетерозиготний генотип 1082 GA, 50 індивідів (0,298) – гомозиготний генотип -1082 AA за алелем, пов'язаним зі зниженою продукцією інтерлейкіна-10. Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом свідчив про відхилення у розподілі генотипів від співвідношення Харді-Вайнберга ($\chi^2=1,09$; $p=0,3$).

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 результатами дослідження розподілу частот генотипів за алельним варіантом -781С/Т гена *IL8*, в групі індивідів з ішемічним інсультом було ідентифіковано, що в даній групі найчастіше зустрічався гетерозиготний генотип -781 СТ (0,570), подібно до розподілу генотипів в популяційній вибірці. Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом в групі індивідів з рецидивуючими ерозіями, свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга ($\chi^2=3,7$; $p=0,069$).

За результатом порівняльного аналізу розподілу генотипів за локусом -781С/Т гена *IL8* в досліджуваній та контрольній групі було виявлено статистично достовірно ($p<0,05$) вищу частоту носіїв алеля *IL8* -781Т у групі пацієнтів з інсультом (0,816) порівняно з контрольною групою (0,701) (рис 3.8). За розрахунками показника відношення шансів, встановлено, що носії алеля *IL8* -781Т мають майже вдвічі вищий ризик розвитку ішемічного інсульту (OR = 1,89; ДІ 95%: 1,041–3,417).

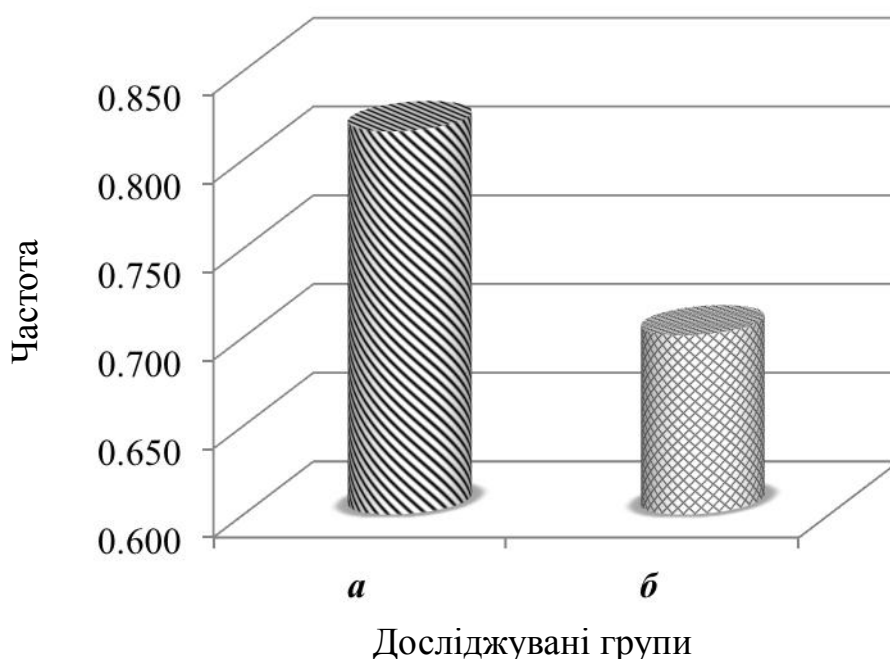


Рис. 3.8. Розподіл частоти індивідів носіїв алеля *IL8* -781Т серед: а – пацієнтів з ішемічним інсультом; б – контрольної групи

Аналіз розподілу генотипів за поліморфним локусом $-592C/A$ гена *IL10* в групі пацієнтів з ішемічним інсультом дозволив встановити, що кількість індивідів з генотипом, гомозиготним за алелем дикого типу $-592 CC$ складає 116 осіб (0,682), кількість осіб з гетерозиготним генотипом $-592 CA$ - 51 (0,300), а з гомозиготним за поліморфним алелем $-592 AA$ - 3 (0,018). Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом в групі індивідів з рецидивуючими ерозіями, свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга ($p = 0,4204$)

Наступним кроком був порівняльний аналіз розподілу генотипів за даним локусом в досліджуваній та контрольній групах. 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. 3.9). Носії цього алеля мають більше ніж в 5 разів вищий ризик розвитку ішемічного інсульту ($OR=5,71$; ДІ 95%: 1,48–22,11).

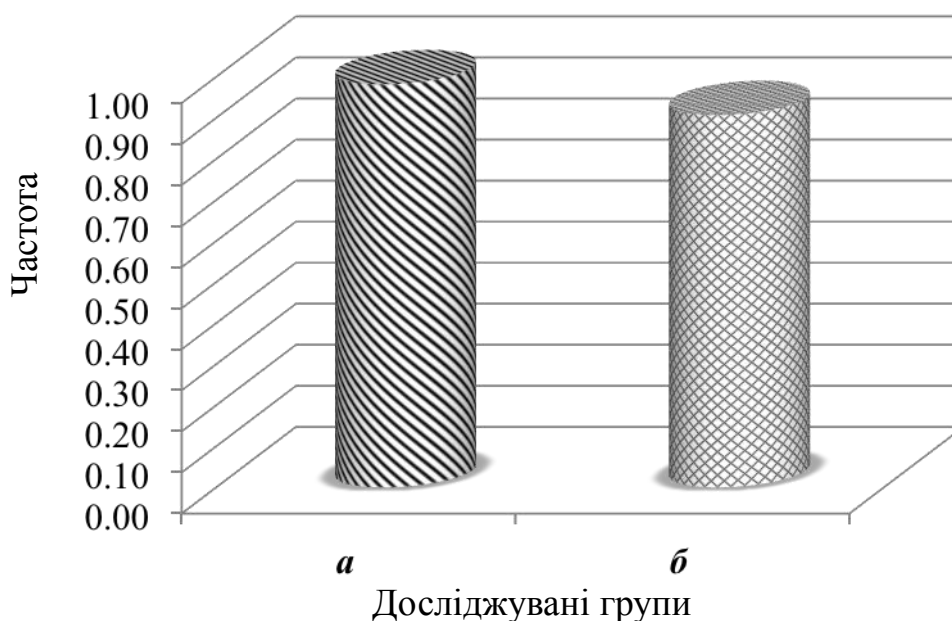


Рис. 3.9. Розподіл частоти індивідів носіїв алеля $-592C$ гена *IL10* серед:
 а – пацієнтів з ішемічним інсультом; б – контрольної групи

На наступному етапі дослідження ми вирішили перевірити гіпотезу про те, що генетичні особливості індивіда можуть впливати не лише на ризик розвитку ішемічного інсульту, але й на процес відновлення після нього. 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.

З метою оцінки ролі генотипу індивіда в процесі покращення стану пацієнта в пост-інсультний період ми проаналізували розподіл генотипів за поліморфними локусами -781C/T гена *IL8* та -592C/A гена *IL10* в групі хворих зі зменшенням ступеню тяжкості інсульту і без змін у стані. Отримані результати представлені в табл. 3.6.

За результатами аналізу не було встановлено асоціації між генотипами за поліморфним варіантом – 781 C/T гена *IL8* і динамікою стану пацієнта.

Таблиця 3.7

Розподіл генотипів за дослідженими поліморфізмами в групах пацієнтів з різною динамікою стану впродовж перших двох тижнів після інсульту

Локус	Генотип	Пацієнти з покращеним станом		Пацієнти без змін стану		Відношення шансів			
		n	f	n	f	p	OR	ДІ 95%	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	
-781 C/T <i>IL8</i>	CC	6	0,111	26	0,226	0,08	0,43	0,16 – 1,11	
	CT	34	0,630	60	0,522		2,34	0,90 – 6,07	
	TT	14	0,259	29	0,252				
	Усього	54		115		–	–	–	
	Алель								
	C	46	0,426	112	0,487	–	–	–	
	T	62	0,574	118	0,513	–	–	–	

1	2	3	4	5	6	7	8	9
-592C/A IL10	CC	43	0,811	65	0,607	0,01	2,78	1,26 – 6,12
	CA	10	0,189	39	0,364		0,36	0,16 – 0,79
	AA	0	0,0	3	0,029			
	Усього	53		107		–	–	–
	Алель							
	C	96	0,906	169	0,790	–	–	–
	A	10	0,094	45	0,210	–	–	–

Примітка. n – абсолютна кількість, f – частота

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. 3.10).

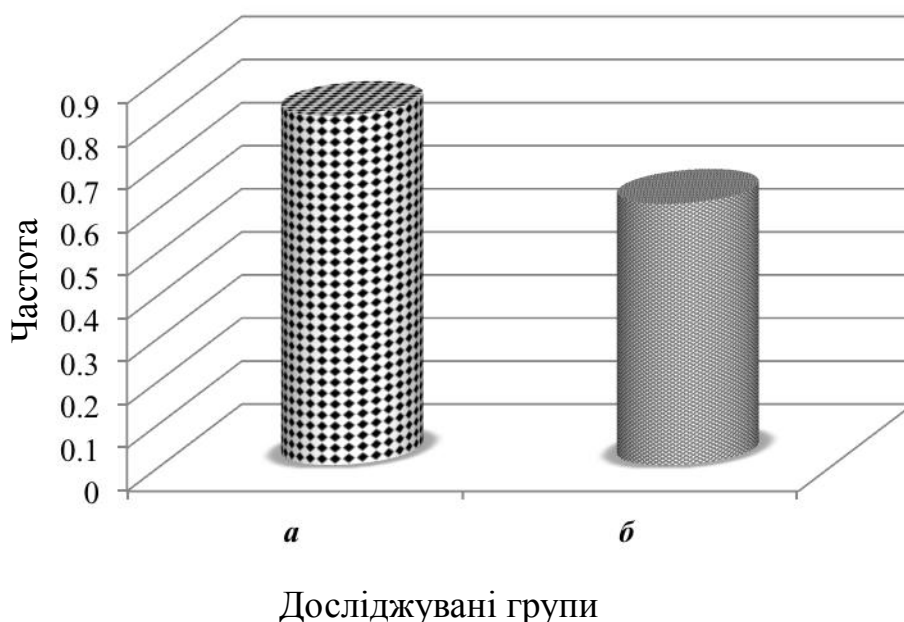


Рис. 3.10. Розподіл частоти індивідів з генотипом -592CC гена IL10 серед:
а – пацієнтів з позитивною динамікою стану; б – групи без змін у стані

Більше того, у осіб, гомозиготних за алелем -592С 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.

На підставі отриманих статистичних відмінностей встановлено, що алелі -781Т гена *IL8* та -592С гена *IL10* є факторами спадкової схильності до розвитку ішемічного інсульту. Крім того, алель -592С гена *IL10* є генетичним маркером позитивного прогнозу на відновлення пацієнта в перші два тижні лікування.

Основні результати пункту опубліковані в роботах:

1. Association of *IL8* and *IL10* gene allelic variants with ischemic stroke risk and prognosis / Kucherenko A. M., Shulzhenko D. V., Kuznetsova S. M., Demydov S. V., Livshits L. A. // *Biopolym. Cell.* – 2014. – Vol. 30, № 3. – P 234 – 238.
2. Allelic variants of *IL8* and *IL10* genes influence ischemic stroke risk and prognosis / A. Kucherenko, D. Shulzhenko, S. Kuznetsova, L. Livshits // *European Journal of Human Genetics*, Vol. 22 Suppl. 1, European human genetics conference 2014, May 31 - June 3, 2014, Milan, Italy, P. 411.
3. Алельні варіанти генів *IL8* та *IL10* є маркерами спадкової схильності до ішемічного інсульту / Кучеренко А. М., Шульженко Д. В., Кузнецова С. М., Лівшиць Л. А. // Материали XVI Международной конференции "Современные стратегия и тактика в неврологии", 23—25 апреля 2014 года, г. Трускавец, С. 38-41.

3.5. Дослідження ролі мононуклеотидних замін -174G/C гена *IL6* , -781C/T гена *IL8* , -592C/A та -1082G/A гена *IL10* у пацієнтів зі звичним невиношуванням вагітності

З метою встановлення внеску імуногенетичної компоненти в патогенез порушень гомеостазу в системі матір – плід, яка реалізується в звичному невиношуванні вагітності, нами був проаналізований розподіл частот генотипів і алельних варіантів за поліморфними локусами -174G/C гена *IL6* , -781C/T гена *IL8* , -592C/A та -1082G/A гена *IL10* 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).

Окрім цього, зважаючи на дані про важливість координованої дії комплексу естроген - естрогеновий рецептор для підтримання вагітності, а також те, що промоторна ділянка гена *IL6* є чутливою до його дії, нами було зроблено припущення, що комбінація алелів за поліморфними варіантами генів *IL6* та *ESR1* може мати функціональну роль і бути асоційована з ризиком невиношування вагітності, та включено в панель дослідження даних генотипування за поліморфним варіантом -397 C/T гена *ESR1* (естрогенового рецептора альфа).

Для аналізу послідовності ділянки ДНК 1-го інтрона гена *ESR1*, що містить мононуклеотидну заміну -397 C/T (*PvuII* поліморфізм), ми розробили метод ПЛР ампліфікації, з наступним гідролізом продукту ендонуклеазою рестрикції *PvuII* та з подальшою візуалізацією у 2%-ому агарозному гелі.

На рис. 3.11. зображена електрофореграма розділення фрагментів, що утворились після гідролізу ендонуклеазою рестрикції *PvuII* продукту ампліфікації гена *ESR1* в 2% агарозному гелі.

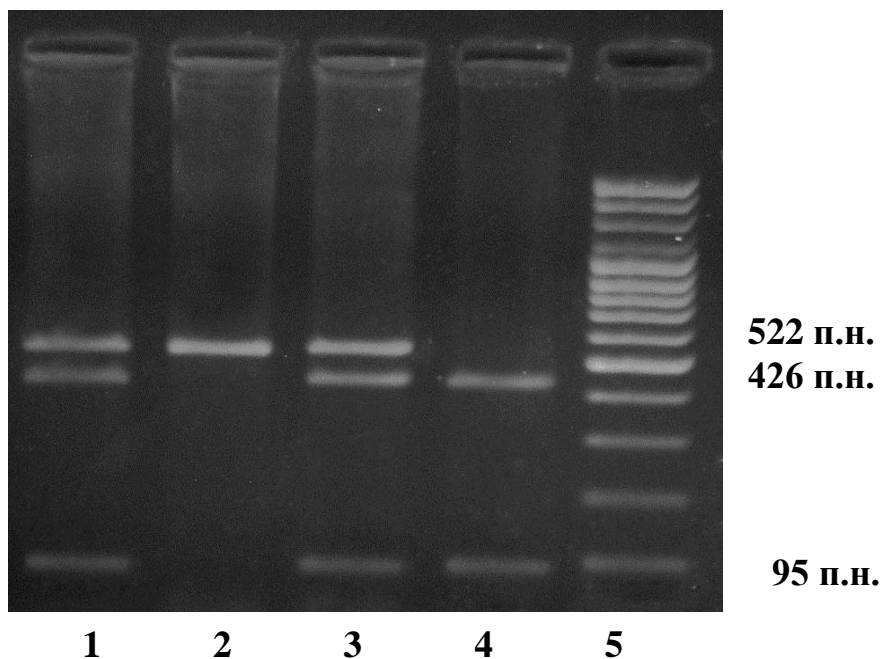


Рис. 3.11. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *ESR1*, що утворились після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *PvuII*, в 2% агарозному гелі: 1,3 - СТ (гетерозигота); 2 - СС (гомозигота); 4 - ТТ (гомозигота); 5 – маркер молекулярної маси (100 п.н.)

У випадку МНЗ з'являється один з сайтів впізнання для ендонуклеази *PvuII*. Тому у індивідів без мононуклеотидної заміни ми спостерігаємо фрагмент довжиною 522 п.н., у гетерозиготних носіїв мононуклеотидної заміни -397 С/Т спостерігаються рестрикційні фрагменти довжиною 522 п.н., 426 п.н. та 95 п.н., а у гомозиготних носіїв мононуклеотидної заміни -397 С/Т – рестрикційні фрагменти довжиною 426 п.н. та 95 п.н.

Отримані результати щодо розподілу частот генотипів і алельних варіантів за поліморфними локусами -174G/C гена *IL6* та -397 С/Т гена *ESR1*, -781С/Т гена *IL8*, -592С/А та -1082G/А гена *IL10* представлені в таблицях 3.8, 3.9.

Аналіз розподілу генотипів та алельних варіантів за поліморфним локусом -174G/C гена *IL6* в досліджуваній групі пацієнтів зі звичним невиношуванням вагітності дозволив нам виявити 34 індивіди (0,321), гомозиготних за алелем дикого типу -174G гена *IL6*, 56 пацієнти (0,528) з гетерозиготним генотипом

174GC, та 16 індивідів (0,151) – гомозигот за поліморфним алелем -174C, асоційованим зі зниженою продукцією інтрелейкіну-6.

Таблиця 3.8

**Розподіл генотипів та алелів за мононуклеотидними замінами
-174G/C гена *IL6* , -397 C/T гена *ESR1* у пацієнтів зі звичним
невиношуванням вагітності та у відповідній контрольній групі**

Локус		Група ЗНВ, n	Група ЗНВ, f	Контроль, n	Контроль, f
<i>IL6</i> -174 G/C	Генотип				
	GG	34	0,321	38	0,358
	GC	56	0,528	42	0,396
	CC	16	0,151	26	0,246
	Алель				
	G	124	0,585	118	0,557
	C	88	0,415	94	0,443
<i>ESR1</i> -397 C/T	Генотип				
	CC	25	0,227	21	0,198
	CT	58	0,527	53	0,500
	TT	27	0,245	32	0,302
	Алель				
	C	108	0,491	95	0,448
	T	112	0,509	117	0,552

Примітка. n – абсолютна кількість, f – частота

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за поліморфним варіантом -174G/C гена *IL6* свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга ($\chi^2=0,82$; $p=0,37$).

Розподіл генотипів за поліморфним локусом -397 C/T гена *ESR1* в досліджуваній групі був наступним: 25 осіб (0,227) з гомозиготним генотипом -397CC, 58 осіб (0,527) – гетерозиготи з генотипом -397CT та 27 осіб (0,245) –

гомозиготи з генотипом -397ТТ. Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом, свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга ($\chi^2=0,33$; $p=0,56$).

Порівняльний аналіз розподілу генотипів та алельних варіантів за окремими поліморфними локусами -174G/C гена *IL6* та -397 C/T гена *ESR1* в групі пацієнтів з невиношуванням вагітності та контрольній групі показав відсутність статистично достовірних відмінностей між цими двома групами. Однак, проведений аналіз комбінованих генотипів виявив статистично достовірно ($p < 0,05$) нижчу частоту осіб, гомозиготних за *IL6* -174G та *ESR1* -397C алелями в досліджуваній групі (0,027) порівняно з контрольною групою (0,094) (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

**Розподіл комбінованих генотипів за поліморфними варіантами
-174G/C гена *IL6* та -397 C/T гена *ESR1* у пацієнтів зі звичним
невиношуванням вагітності та у відповідній контрольній груп**

Генотип <i>IL6 / ESR1</i>	Група ЗНВ, n	Група ЗНВ, f	Контроль, n	Контроль, f
GG / CC	4	0,027	10	0,094
GG / CT	21	0,202	15	0,142
GG / TT	9	0,087	13	0,123
GC / CC	12	0,115	7	0,066
GC / CT	25	0,240	25	0,236
GC / TT	17	0,163	10	0,094
CC / CC	7	0,067	4	0,038
CC / CT	8	0,087	13	0,123
CC / TT	1	0,010	9	0,085

Примітка. n – абсолютна кількість, f – частота

Отримані результати щодо розподілу частот генотипів і алельних варіантів за поліморфними локусами -781С/Т гена *IL8*, -592С/А та -1082G/А гена *IL10* представлені в таблиці 3.10.

За результатами дослідження розподілу частот генотипів за алельним варіантом -781С/Т гена *IL8*, в групі індивідів з невиношуванням вагітності було ідентифіковано 38 індивідів з гомозиготним генотипом -781СС (0,346), 58 індивідів – з гетерозиготним -781 СТ (0,527), та 14 гомозигот за поліморфним алелем -781ТТ (0,127). Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга ($\chi^2=1,27$; $p=0,26$).

Порівняльний аналіз розподілу генотипів та алельних варіантів за поліморфним локусом -781С/Т гена *IL8* в групі пацієнтів з невиношуванням вагітності та в контрольній групі показав відсутність статистично достовірних відмінностей між цими двома групами.

Таблиця 3.10

**Розподіл генотипів та алелів за мононуклеотидними замінами
-781С/Т гена *IL8*, -592С/А та -1082G/А гена *IL10* у пацієнтів зі звичним
невиношуванням вагітності та у відповідній контрольній групі**

Локус		Група ЗНВ, n	Група ЗНВ, f	Контроль , n	Контроль , f	OR	ДІ 95%:
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>IL8</i> -781 С/Т	Генотип						
	СС	38	0,345	45	0,425	0,72	0,41 – 1,24
	СТ	58	0,527	43	0,406	1,63	0,95 – 2,80
	ТТ	14	0,127	18	0,169	0,71	0,33 – 1,52
	Алель						
	С	134	0,609	133	0,627	-	-
Т	86	0,391	79	0,373	-	-	

1	2	3	4	5	6	7	8
<i>IL10</i> -592 C/A	Генотип						
	CC	63	0,573	70	0,661	0,69	0,40 – 1,20
	CA	40	0,364	35	0,330	1,16	0,66 – 2,03
	AA	7	0,064	1	0,009	7,14	0,86 - 59,03
	Алель						
	C	166	0,755	175	0,825	-	-
	A	54	0,245	37	0,175	-	-
<i>IL10</i> -1082 A/G	Генотип						
	AA	35	0,318	23	0,217	2,12	1,03 – 4,34
	AG	61	0,555	58	0,547		
	GG	14	0,127	25	0,236	0,47	0,23 – 0,97
	Алель						
	A	131	0,595	104	0,509	-	-
	G	89	0,405	108	0,491	-	-

Примітка. n – абсолютна кількість, f – частота

Аналіз розподілу генотипів за поліморфним локусом -592C/A гена *IL10* в групі пацієнтів зі звичним невиношуванням вагітності дозволив встановити, що кількість індивідів з генотипом, гомозиготним за алелем дикого типу -592 CC складає 63 осіб (0,573), кількість осіб з гетерозиготним генотипом -592 CA - 40 (0,364), а гомозигот за поліморфним алелем -592 AA - 7 (0,064). Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом в групі індивідів зі звичним невиношуванням вагітності, свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга ($\chi^2=0,04$; $p = 0,85$).

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) (рис.3.12).

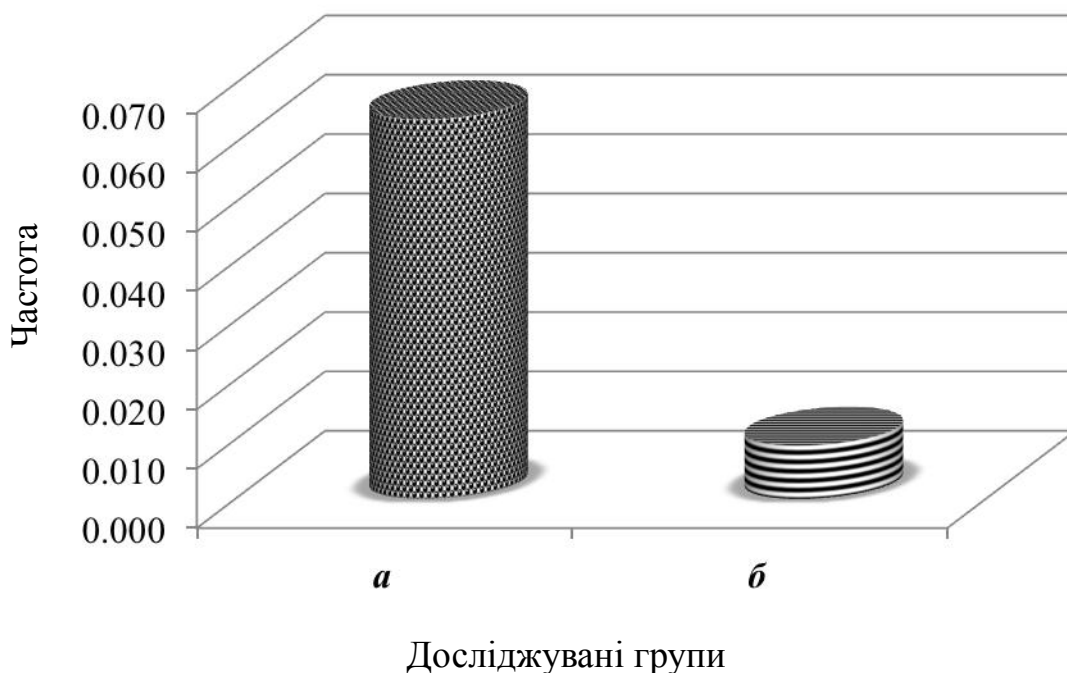


Рис. 3.12. Розподіл частоти індивідів з генотипом $-592AA$ гена *IL10* серед: *а* – пацієнтів зі звичним невиношуванням вагітності; *б* – контрольної групи

Аналіз розподілу генотипів за поліморфним варіантом $-1082 G/A$ гена *IL10* в досліджуваній групі пацієнтів з невиношуванням вагітності показав наступне: 35 індивідів (0,318) мав гомозиготний генотип $-1082 GG$, 61 індивідів (0,555) – гетерозиготний генотип $1082 GA$, 14 індивідів (0,127) – гомозиготний генотип $-1082 AA$ за алелем, пов'язаним зі зниженою продукцією інтерлейкіна-10. Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом, свідчив про відхилення у розподілі генотипів від співвідношення Харді-Вайнберга ($\chi^2=1,09$; $p=0,3$).

За результатами порівняльного аналізу 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. 3.13.). За результатами розрахунку показника відношення шансів, ризик невиношування у носіїв алеля $-1082A$ вдвічі вищий ($OR = 2,12$; ДІ 95%: 1,03-4,34).

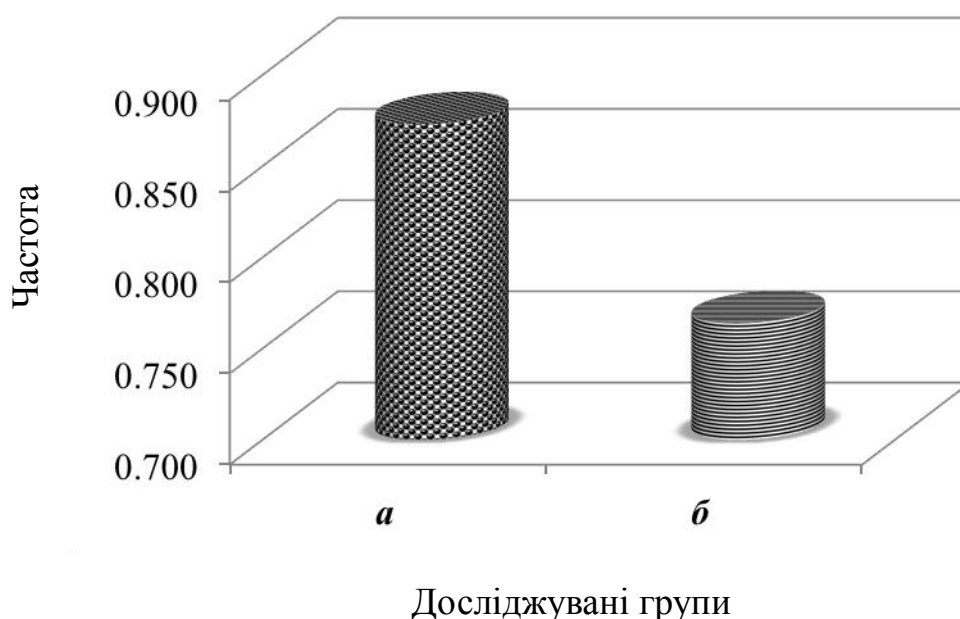


Рис. 3.13. Розподіл частоти індивідів-носіїв алеля $-1082A$ гена *IL10* серед: *а* – пацієнтів зі звичним невиношуванням вагітності; *б* – контрольної групи

Підсумовуючи вище наведені результати, за результатами порівняльного аналізу розподілу частот генотипів та алельних варіантів в групі жінок зі звичним невиношуванням вагітності та контрольній групі, можна зробити висновок, що генотип $-592AA$ та алель $-1082A$ за геном *IL10* є факторами спадкової схильності до невиношування вагітності. Водночас, генотип, гомозиготний за алелями $-397C$ гена *ESR1* та $-174G$ гена *IL6* може розглядатися в якості генетичного маркера успішного підтримання вагітності на ранніх строках гестації.

Основні результати пункту опубліковані в роботах:

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 // Cytol Genet. – 2012. – Vol. 46, № 4. – P. 220-226
2. The role of IL6 and ESR1 gene polymorphisms as immunological factors of pregnancy maintenance / Kucherenko A. M., Vorobiova I. I., Rudakova N. V., Livshits L. A. // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29, № 5. – P. 402-405

3. Recurrent pregnancy loss association with allelic variants of *IL8* and *IL10* genes / A. M. Kucherenko, R. V. Gulkovskiy, K. G. Khazhilenko, I. I. Vorobiova, T.S. Nakvasiuk, L. A. Livshits // ScienceRise. – 2014. – Vol. 2, № 2. – P 7-10.
4. The role of IL-6 and ESR1 gene polymorphisms in pregnancy maintenance / A.M. Kucherenko, N.V. Rudakova, I.I. Vorobiova, L.A. Livshits // V з'їзд Медичних генетиків України, 11-13 жовтня 2012, Донецьк, С. 237.
5. The role of IL-6, IL-8, and IL-10 gene polymorphisms in the pathogenesis of recurrent pregnancy loss / A.M. Kucherenko, R. Gulkovskiy, I. Vorobiova, N. Rudakova, K. Khazhilenko, L.Livshits // European Journal of Human Genetics, Vol. 20 Suppl. 1, European human genetics conference 2013, June 8 - 11, 2013, Paris, France, P. 592

3.6. 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. Для проведення сайт-специфічної ПЛР використовували 3 специфічних олігонуклеотидних праймер, один спільний та два специфічних для кожного з алельних варіантів - ss469415590ΔG та ss469415590TT. З метою підвищення специфічності роботи праймерів та уникнення формування димерів в олігонуклеотидні послідовності були внесені некомплементарні основи. Послідовності праймерів та температурно-часові умови проведення ПЛР наведені у пункті 2.2.8.

Для кожного індивіда проводили дві ПЛР реакції, використовуючи дві ПЛР суміші з спільним праймером та з одним із специфічних праймерів для кожного з алельних варіантів. ПЛР продукти аналізували в 2%-му агарозному гелі. Розмір ампліфікованих фрагментів становить 299 п.н. (рис. 3.14).

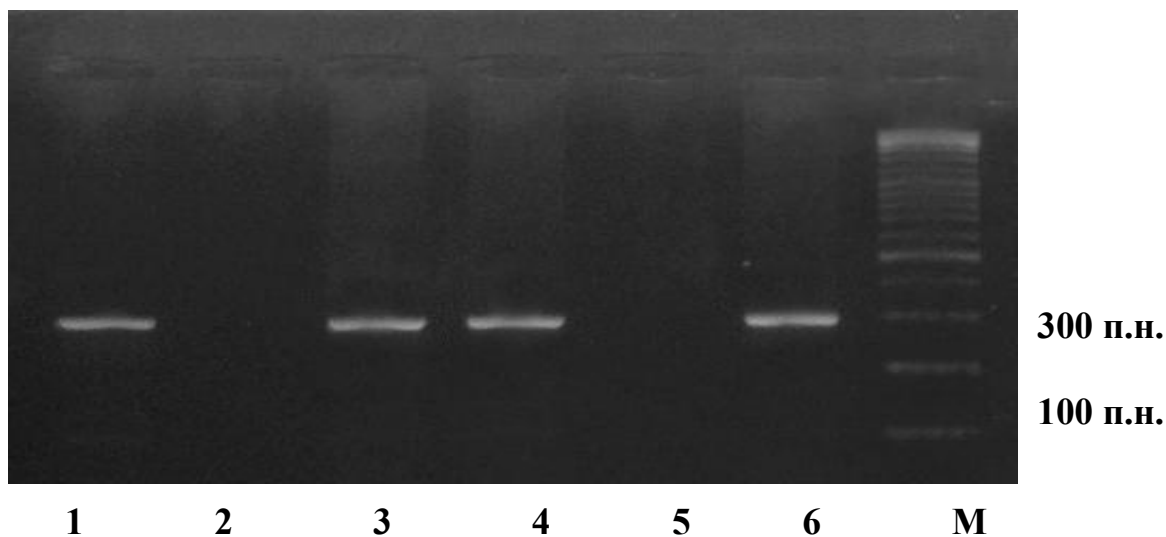


Рис. 3.14. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *IFNL4*, в 2%-ому агарозному гелі: 1, 2 – ТТ/ТТ (гомозигота); 3, 4 – ТТ/ΔG (гетерозигота); 5, 6 – ΔG/ΔG (гомозигота); М – маркер молекулярної маси (100 п.н.)

Контрольний зразок, гетерозиготний за поліморфним варіантом ss469415590 був верифікований за допомогою повного секвенування нуклеотидної послідовності продуктів ампліфікації 1-го екзона гена *IFNL4* (рис. 3.15.).

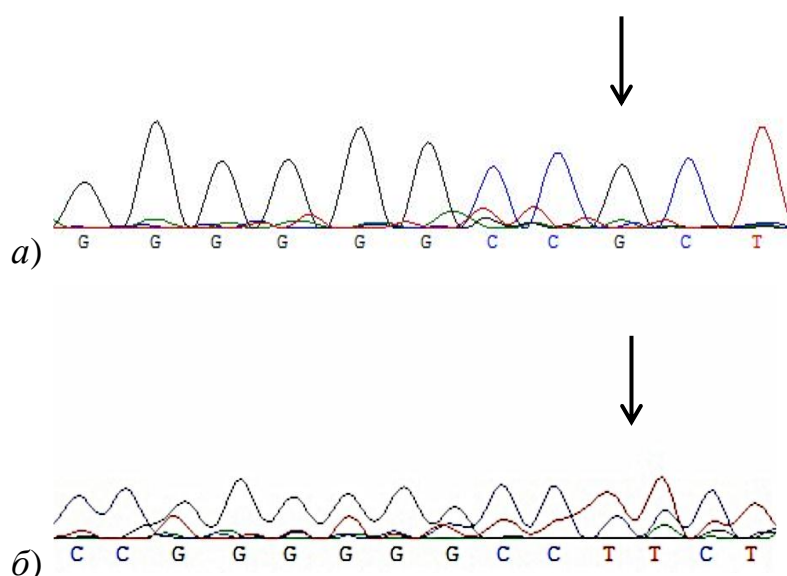


Рис. 3.15. Хроматограма секвенування продукту ПЛР гена *IFNL4* зразка ДНК індивіда, гетерозиготного за поліморфним варіантом ss469415590: а) – алель ss469415590 ΔG; б) – алель ss469415590 ТТ

З метою встановлення розподілу генотипів та алелів за варіантом ss469415590 гена *IFNLA*, а також з метою дослідження його зчеплення з rs12979860 в гені *IL28B* в популяції України було проведено генотипування за цим варіантом 100 неспоріднених донорів з різних регіонів України з попередньо встановленим генотипом за варіантом rs12979860 в гені *IL28B*. Отримані дані по розподілу частот генотипів представлені в таблиці 3.11.

Таблиця 3.11.

Розподіл генотипів та алелів за варіантами ss469415590 гена *IFNLA* та rs12979860 гена *IL28B* у здорових індивідів з популяції України

		ss469415590			D'	r ²
		<i>TT/TT</i>	<i>TT/ΔG</i>	<i>ΔG/ΔG</i>		
rs12979860	<i>CC</i>	40	0	0	1	0,956
	<i>CT</i>	2	49	0		
	<i>TT</i>	0	0	9		

Примітка. D' – нормалізований коефіцієнт нерівноваги; r² – коефіцієнт кореляції

Частоти генотипів за обома досліджуваними варіантами відповідали очікуваними за рівновагою Харді-Вайнберга. Значення розрахунку показника χ^2 для поліморфних локусів ss469415590 та rs12979860 дорівнювали 0,91 та 0,42 відповідно (df=2). Розподіл частот алелів для ss469415590 становив: TT – 0,665, ΔG – 0,335. Частоти алелів за rs12979860 склали: C – 0,655, T – 0,345. 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.

Основні результати пункту опубліковані в роботах:

- 1) Study of *IFNLA* gene ss469415590 variant in Ukrainian population / Kucherenko A.M., Pampukha V.M., Livshits L.A. // Biopolym. Cell. - 2014. - Vol. 30, № 5. – P. 400-402.

3.7. Дослідження ролі поліморфного варіанта ss469415590 гена *IFNL4* у пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С з різною ефективністю терапії пег-інтерфероном

З метою встановлення 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. Пацієнти були розділені на дві категорії – 63 індивіда зі стійкою вірусологічною відповіддю та 29 індивідів зі слабкою, або відсутньою відповіддю на терапію. Отримані дані про розподіл генотипів та алельних варіантів за локусом ss469415590 гена *IFNL4* наведені в таблиці 3.12.

Таблиця 3.12.

Розподіл генотипів за поліморфним варіантом ss469415590 гена *IFNL4* у пацієнтів з хронічним вірусним гепатитом С з різною ефективністю терапії пег-інтерфероном

ss469415590 генотип	Пацієнти зі стійкою відповіддю		Пацієнти з поганою відповіддю		Відношення шансів		
	n	f	n	f	p	OR	ДІ 95%
<i>TT TT</i>	31	0,492	4	0,138	0,0006	0,17	0,05 – 0,53
<i>TT ΔG</i>	26	0,413	17	0,586		2,02	0,83 – 4,92
<i>ΔG ΔG</i>	6	0,095	8	0,276		3,62	1,12 -11,67
Усього	63		29		–		
Алель							
<i>TT</i>		0,698		0,431	0,0005	0,33	0,17 – 0,62
<i>ΔG</i>		0,302		0,569		3,06	1,61 – 5,82

Примітка. n – абсолютна кількість, f – частота, ДІ – довірчий інтервал.

За результатами порівняльного аналізу встановлено достовірну вищу частоту ($p < 0,05$) носіїв алельного варіанту *ss469415590 ΔG* в групі пацієнтів з поганою відповіддю на противірусну терапію пег-інтерфероном (0,862) порівняно з групою пацієнтів зі стійкою вірусологічною відповіддю (0,518) (рис. 3.16).

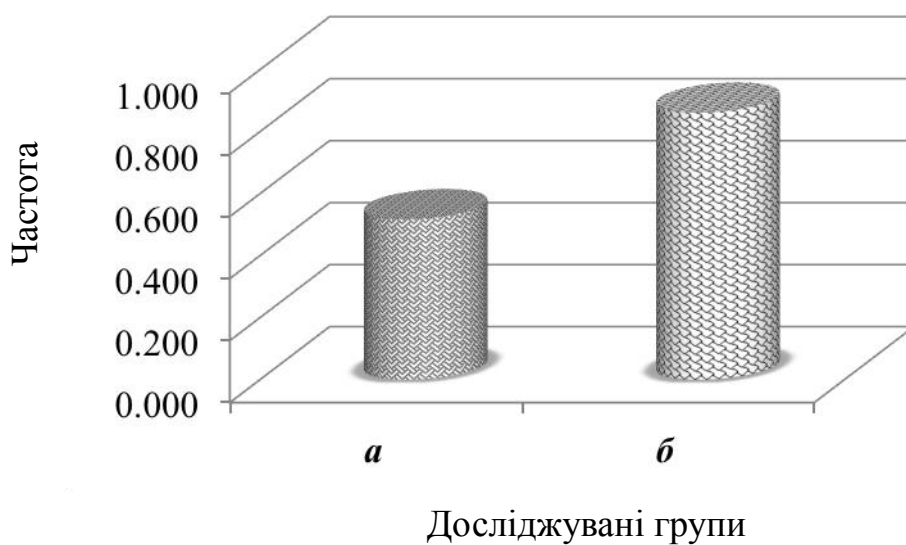


Рис. 3.16. Розподіл частоти індивідів-носіїв алеля *ss469415590 ΔG* гена *IFNL4* серед: а – пацієнтів зі стійкою відповіддю на терапію пег-інтерфероном; б – пацієнтів з поганою відповіддю на терапію пег-інтерфероном

Отримані дані про асоціацію алеля *ss469415590 ΔG* з поганою відповіддю на терапію вкладаються 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 *ss469415590ΔG* 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).

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

Основні результати пункту опубліковані в роботах:

1) 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.

РОЗДІЛ 4.

ОБГОВОРЕННЯ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

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). Відповідно, мажорними алельними варіантами є: -174G гена *IL6*, -781C гена *IL8*, -592C та -1082G гена *IL10* - з відповідними частотами 0,563, 0,525, 0,820 та 0,520. Результати досліджень розподілу частот алелів за досліджуваними поліморфними локусами генів *IL6*, *IL8* та *IL10* в популяції України, даних, отриманих в рамках проекту “1000 геномів” [176], а також окремих досліджень в різних популяціях світу наведені в табл. 4.1, 4.2.

Таблиця 4.1

Розподіл алельних варіантів гена *IL6*

Популяція	Частоти алеля -174G
Північна Індія	0,676
Китай	0,219
Америка	0,538
Європейська суперпопуляція	0,620
Іспанія	0,680
Польща	0,600
Україна	0,563

Частота поліморфного варіанту -174G гена *IL6* варіює від 0,219 в Китаї до 0,865 у населення Північної Індії (Табл. 4.1). В популяціях з населенням європейського походження коливання цього показника відбуваються в межах від 0,538 до 0,680. Таким чином, частота цього алеля в популяції України вкладається в межі коливання даного показника в популяціях європейського походження.

Частота алеля -781C гена *IL8* коливається в межах від 0,602 в популяції Фінляндії до 0,926 в Нігерії та становить 0,620 для усередненої надпопуляції Європи, що є найнижчим показником серед усіх надпопуляцій світу (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Розподіл алельних варіантів генів *IL8* та *IL10* в світових популяціях

Популяція	Частоти алельних варіантів		
	<i>IL8</i> -781C	<i>IL10</i> -592 C	<i>IL10</i> -1082G
Азійська суперпопуляція	0,670	0,323	0,056
Американська суперпопуляція	0,680	0,666	0,318
Африканська суперпопуляція	0,900	0,579	0,337
Європейська суперпопуляція	0,620	0,765	0,459
Велика Британія	0,635	0,781	0,506
Іспанія	0,607	0,786	0,464
Італія	0,617	0,709	0,408
Китай	0,639	0,268	0,036
Нігерія	0,926	0,517	0,290
Фінляндія	0,602	0,769	0,392
Юта (європейського походження)	0,611	0,806	0,541
Україна	0,525	0,820	0,520

Частота даного алеля в популяції України є нижчою ніж в інших популяціях з населенням європейського походження, однак ці відмінності не досягали статистичної достовірності при порівнянні з окремими популяціями Європи. Частота алельного варіанту -592C гена *IL10* в популяціях світу знаходиться в

межах від 0,268 в Китаї до 0,806 у населення європейського походження штата Юти, США (Табл. 4.2). Частота цього алельного варіанту в популяції України дещо перевищує верхній показник для європейських популяцій, однак ці відмінності не є достовірними. Стосовно ж іншого поліморфного варіанту гена *IL10*, -1082G, його частота складає від 0,036 в Китаї до 0,541 у європейського населення Юти, США європейського походження (Табл. 4.2). Частота цього алеля в популяції України вкладається в межі коливання даного показника в популяціях європейського походження (0,392 – 0,541), проте значно перевищує його в азійських та африканських популяціях.

За результатами дослідження розподілу частот генотипів та алелів за поліморфним варіантом ss469415590 гена *IFNL4* у вибірці, яка репрезентує населення з різних регіонів України, було встановлено, що найбільш розповсюдженим виявився гетерозиготний генотип TT/ΔG (частота – 0,500), а мажорним був алель TT (частота – 0,665). Порівняльний аналіз розподілу частот алелів за варіантом ss469415590, отриманих в рамках проекту “1000 геномів”, в різних популяціях світу з даними для української популяції дозволив зробити висновок про відсутність суттєвих відмінностей у розповсюдженні даного поліморфного варіанту в популяціях з населенням європейського походження та популяції України (табл. 4.3). Варто зазначити, що відповідні розподіли за варіантом ss469415590 в популяціях Азії, Африки та Америки достовірно відрізнялись від популяції України.

Таблиця 4.3

Розподіл частот алельного варіанта ss469415590 в світових популяціях

Популяція	Частота алеля ss469415590 ΔG
Європейська суперпопуляція	0,309
Азійська суперпопуляція	0,066
Африканська суперпопуляція	0,624
Американська суперпопуляція	0,436
Україна	0,335

Можна припустити, що встановлені відмінності щодо розподілу частот алелів досліджуваних поліморфних варіантів в популяціях з населенням європейського походження у порівнянні з надпопуляціями Азії, Африки та Америки можуть бути обумовлені тим, що дані поліморфні варіанти, або певні варіанти зчеплені з досліджуваними нами, можуть надавати індивідам селективну перевагу в певних умовах оточуючого середовища, в яких ці популяції знаходились в різні періоди їхнього існування. Проте, особливості формування генофонду різних популяції світу, зокрема ефект засновника, дрейф генів, ізоляційні та міграційні процеси, також могли додати свій внесок в формування виявлених відмінностей.

Порівняльний аналіз даних про розподіл частот алелів за досліджуваними поліморфними локусами генів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4* в популяції України з даними, отриманих в рамках проекту “1000 геномів”, а також за результатами окремих досліджень в різних популяціях світу вказує на подібність популяції України до інших популяцій з населенням європейського походження (табл. 4.1, 4.2).

Наступний етап наших досліджень був присвячений пошуку асоціації між поліморфними варіантами генів *IL6* (-174 G/C), *IL8* (-781 C/T), *IL10* (-592 C/A, -1082 G/A), *IFNL4* (ss469415590) і відповідними генетично обумовленими змінами рівня експресії та продукції цитокінів, та патогенезом ішемічного інсульту, звичного невиношування вагітності, рецидивуючих ерозій рогівки у пацієнтів з гратчастою дистрофією, а також ефективність терапії хронічного вірусного гепатиту С пегільованим інтерфероном.

Спадкові дистрофії строми рогівки (зокрема, гратчаста дистрофія) є групою захворювань з аутосомно-домінантним типом успадкування, обумовлених мутаціями в гені *TGFBI* [177,178]. Клінічні та морфологічні дослідження показали, що наявність запального компонента при дистрофіях строми рогівки прискорює розвиток дегенеративних змін в рогівці. Найпоширенішим ускладненням

стромальних дистрофій є рецидивуючі ерозії (РЕ), які відрізняються за ступенем супутнього запалення [10]. Морфологічної основою для виникнення рецидивуючих ерозій рогівки при гратчастій дистрофії є порушення адгезії базальних клітин епітелію до боуменової мембрани внаслідок накопичення між цими структурами патологічних депозитів амілоїду, а також вторинних дегенеративних змін в передніх шарах рогівки [179]. Пошкодження епітелію є пусковим моментом запальної реакції при гратчастій дистрофії рогівки. Враховуючи, що при дистрофіях рогівки ступінь дегенеративних змін збільшується з віком пацієнта, можна очікувати, що у пацієнтів середнього та похилого віку РЕ виникають частіше, ніж у більш молодих пацієнтів і супутня запальна реакція у пацієнтів старших вікових груп буде більш вираженою. Однак, як у пацієнтів молодого віку (23-40 років), так і у пацієнтів старшого віку частота розвитку РЕ і ступінь прояву супутньої запальної реакції істотно розрізняються. Відомо, що регенерація рогівки - це комплексна відповідь організму, успіх і синхронізація якої залежать від правильної комбінації цитокінів і факторів росту, які експресуються в певні проміжки часу [10,11,39]. Прозапальні цитокіни беруть участь в регуляції проліферації клітин рогівки і деградації як некротизованих клітин, так і денатурованого колагену [40,180]. Протизапальні цитокіни забезпечують видалення клітин запалення, запобігаючи, таким чином, подальшому виразковому процесу, плавленню та неоваскуляризації рогівки [10,11].

В ураженому епітелії рогівки спостерігається експресія генів двох основних цитокінів гострої фази запалення *IL1B* і *IL6*, а також хемокіну *IL8* і гена протизапального цитокіну *IL10* [40,140]. Білки, які кодуються цими генами, виявляються в слізній рідині при пошкодженні тканин рогівки. Показано, що вони відіграють ключову роль в регенерації рогівки [28]. Можемо припустити, що у пацієнтів з гратчастою дистрофією рогівки ступінь запальної реакції, що виникає при рецидивуючій ерозії, знаходиться під контролем генів-модифікаторів.

Враховуючи ключову роль, яку відіграють про- і протизапальні цитокини в регенерації травматичних ушкоджень рогівки, ми вибрали кодуючі їх гени в якості можливих кандидатів, які впливають на запальну реакцію, яка супроводжує ерозію, індуковану дистрофією рогівки.

Нами було встановлено, що частота носіїв алеля -174С гена *IL6* в контрольній популяційній групі (0,670) була достовірно ($p < 0,05$) нижче порівняно з групою пацієнтів з ерозіями (0,805). Частота генотипу – 781ТТ гена *IL8* була достовірно ($P < 0,05$) нижчою в групі пацієнтів з ерозіями (0,107) порівняно з групою пацієнтів без ерозій (0,308) та популяційним контролем (0,250). Отримані нами результати збігаються з сучасними уявленнями як про регенерацію рогівки взагалі, так і при рецидивуючих ерозіях зокрема. Відповідь епітелію рогівки на пошкодження обумовлена каскадом взаємодій між епітеліальними клітинами, кератоцитами строми рогівки, клітинами імунної системи і т.д., регульованих цитокинами [10,11,140]. Регенерація епітелію рогівки відбувається в кілька стадій: міграція, проліферація і диференціація, які знаходяться під контролем прозапальних цитокінів (зокрема, *IL-6* та *IL-8*) [40,140]. 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 [45]. 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 [40]. 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.

Наші результати стосовно розподілу поліморфного алеля -592А гена *IL10* і значного перевищення частки його носіїв в групі пацієнтів з рецидивуючими

ерозіями (0,483) порівняно з контрольною групою (0,327) повністю збігаються з існуючими на сьогоднішній день уявленнями про процеси, що відбуваються під час регенерації РЕ. Попри позитивний ефект від молекул «небезпеки», що запускають запальну відповідь, їх надлишок може призвести до поширення ерозії, виразки рогівки, її плавлення та неоваскуляризації [40]. Відомо, що в процесах загоєння механічних пошкоджень рогівки інтерлейкін 10 відіграє роль ІЛ-10 агента, який урівноважує дію прозапальних цитокінів, забезпечує перехід від гострої фази запалення до процесів відновлення тканини та запобігає розвитку "вторинних" запальних ушкоджень [11]. Наявність алеля *IL10* -592А 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 та зсувається в бік пролонгації запалення, 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.

За результатами порівняння частот виявлених генотипів та алельних варіантів за поліморфізмами генів *IL6* (-174 G/C), *IL8* (-781 C/T), та *IL10* (-592 C/A, -1082 G/A) 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) було встановлено, що частота носіїв алеля -781Т у групі пацієнтів з інсультом становила 0,816 порівняно з частотою 0,701 в контрольній групі. Такі відмінності виявилися

статистично достовірними ($p < 0,05$). Важливо зауважити, що отримана закономірність зберігається при розподілі індивідів на групи за гендерною ознакою. Окрім того, за результатами розрахунку співвідношення шансів (OR) виявилось, що носії алеля *IL8* -781T мають майже вдвічі вищий ризик розвитку ішемічного інсульту (OR = 1,886; ДІ 95%: 1,041 – 3,417).

Запальний процес спостерігається в тканинах мозку після інсульту, а наявність та співвідношення таких клітин імунної системи, як нейтрофіли та макрофаги, традиційно використовувались лікарями для визначення приблизної тривалості цереброваскулярних пошкоджень [181]. Проте, протягом тривалого часу вважалося, що запалення є лише реакцією організму на ішемічне пошкодження, та розвивається в уражених тканинах мозку з часом [182]. Накопичення даних стосовно процесів, які відбуваються в уражених церебральних тканинах на ранніх стадіях ішемії, дозволило дійти висновку, що елементи імунної системи залучені в усіх стадіях ішемічного каскаду, від швидкої інтраваскулярної відповіді на порушення кровопостачання до відтермінованих процесів в паренхімі, які призводять як до пошкодження клітин мозку, так і до відновлення церебральних тканин [183,184].

Отже, пост-ішемічне запалення є результатом каскаду клітинних і молекулярних подій, викликаних раптовою відсутністю припливу крові і подальшої реперфузії зони ішемії [2,9]. Воно починається в інтраваскулярному просторі одразу ж після артеріальної оклюзії за рахунок активації каскаду згортання крові, системи комплементу та ендотеліальних клітин у відповідь на гіпоксію та вивільнення активних форм кисню. Протягом перших хвилин після розвитку ішемії відбувається транслокація молекули адгезії P-селектину на поверхню мембрани тромбоцитів й ендотеліоцитів та генерація прозапальних сигнальних молекул [185]. Окрім того, ішемія та наступна реперфузія призводять до активації макрофагів в периваскулярному просторі, а активовані макрофаги в свою чергу продукують прозапальні цитокіни [44,186]. 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 [44].

На наступному етапі розвитку запальної відповіді починається процес загибелі клітин. Уражені і відмираючі клітини відіграють ключову роль в пост-ішемічному запаленні, тому що вони продукують «молекули небезпеки», які активують імунну систему шляхом взаємодії з толл-подібними та фагоцитарними рецепторами [45]. 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 [8,182]. 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 [187]. 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. Наступним етапом розвитку ішемічного пошкодження мозку є презентація тканинних антигенів внаслідок порушення цілісності клітинних мембран, яка призводить до розвитку клітинної та гуморальної відповіді за принципом аутоімунної реакції проти уражених тканин [188].

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. Це пов'язано з утворенням в послідовності промотору сайту упізнавання для транскрипційного фактора C/EBP β , який здійснює позитивну регуляцію транскрипції гена *IL8*. Можемо припустити, що у індивідів

носіїв алеля -781T підвищений рівень експресії інтерлейкіну 8 за умов пост-ішемичної 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.

З іншого боку, нами було показано, що частота носіїв алеля - 592C гена *IL10* є статистично достовірно ($p < 0,05$) вищою у пацієнтів з ішемічним інсультом (0,982) порівняно з контрольною групою (0,907). А за результатами розрахунку показника відношення шансів, було встановлено, що носії цього алеля мають майже в 6 разів вищий ризик розвитку ішемічного інсульту (OR = 5,71; ДІ 95%: 1,48 – 22,11). 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 [8,182].

Нами було показано, що у осіб гомозиготних за алелем -592C гена *IL10*, в яких розвинувся ішемічний інсульт шанси на покращення стану (за шкалою Ренкін) протягом перших двох тижнів були майже втричі вищі (OR=2,76; ДІ 95%: 1,26 – 6,07). Таку закономірність можна пояснити з урахуванням існуючих даних про функцію інтерлейкіну 10 на більш пізніх етапах ішемічного пошкодження тканин мозку. Постішемічне запалення є авторегульованим процесом, який з часом вщухає, створюючи підґрунтя для структурної та функціональної реорганізації пошкоджених церебральних тканин. Фактори, які визначають затухання запалення і відновлення тканинного гомеостазу досі недостатньо вивчені, особливо в мозку. Все більше даних свідчить про те, що це не пасивний процес. Навпаки, це є результатом організованої взаємодії великої кількості

медіаторів, які активно пригнічують запальну відповідь [141]. Основні етапи процесу включають в себе видалення омертвілих клітин, розвиток протизапального середовища і генерацію факторів, які сприяють виживанню клітин, реконструкції і відновлення тканин [47,48]. Інтерлейкін 10 є імунорегуляторним цитокіном, для якого показана як протизапальна дія, так і нейропротекторна активність [189,190]. Його продукція пригнічує процес презентації антигенів, послаблюючи аутоімунну реакцію на пошкоджені ішемією тканини та розвиток толерантності до цих тканин.

За різними підрахунками, від 1 до 3 відсотків жінок репродуктивного віку страждають на порушення гомеостазу в системі матір – плід, яке проявляється у звичній втраті вагітності (ЗНВ) – трьох і більше послідовних викиднів до 20-ти тижнів гестації [191]. Серед факторів патогенезу звичного невиношування вагітності виділяють хромосомні аномалії зародка, гормональні порушення, анатомічні особливості будови матки, інфекційні та аутоімунні захворювання, порушення коагуляції [9]. Однак цими чинниками можна пояснити лише близько половини усіх випадків ЗНВ, інші ж відносять до ідіопатичних випадків. Серед причин ідіопатичного ЗНВ все частіше розглядають надмірну імунну відповідь організму матері на тканини плоду і, зокрема, імуногенетичні механізми [61].

Фетоплацентарні взаємодії формуються в процесі дроблення яйцеклітини в матковій трубці, а антигени плода виявляються імунною системою матері на ранніх етапах – на 2–3-й день після запліднення. Саме в цей період і відбуваються основні первинні імунологічні реакції між тканинами матері і плоду, які можуть закінчитися його відторгненням або збереженням вагітності. [53,54]. В 50-их роках минулого століття вперше було висунуто гіпотезу, згідно з якою плід розглядається як напівалогенний трансплантат [55]. Незважаючи на те, що з цього часу було проведено багато досліджень в галузі імунології репродукції, з'ясовані лише деякі механізми імунологічної толерантності материнського організму до плоду [70]. Взаємодія між матір'ю та зародком розвивається в двох основних

напрямок. З одного боку, фетоплацентарні тканини, крім живлення, потребують надійного захисту проти інфекційних агентів, а з іншого — толерантності до плацентарних алоантигенів [57]. Толерантність до генетично несумісного зародку материнською імунною системою залежить від взаємодій комплексу цитокінів, які секретуються материнськими та зародковими клітинами в зоні імплантації. Ендометрій адаптується до процесу імплантації шляхом перетворення на децидуальну оболонку під впливом гестаційних гормонів та стимуляції клітинами трофобласту [192,193]. Комунікація між трофобластичними та децидуальними клітинами регулюється цитокінами та поверхневими клітинними рецепторами. Продукують цитокіни трофобластичні та лімфомієлоїдні клітини децидуальної оболонки, які представлені переважно Т-лімфоцитами, макрофагами та натуральними кіллерами. Зміни паттерну продукції цитокінів Т-клітинами може відігравати суттєву роль в формуванні імунологічної толерантності або стимуляції імунної відповіді [62]. При цьому, особливий інтерес в останні роки приділяється ролі балансу Th1/Th2/ Th17 – як потенційного чинника ЗНВ [60].

Відомо, що активація Т-хелперів проявляється в диференціації «наївних» Th0-клітин в Th1-, Th2- та Th17-клітини з унікальним цитокіновим профілем та ефекторною функцією. Th1- клітини задіяні у процесі клітинно-обумовленої імунної відповіді і секретують переважно прозапальні цитокіни, у той час, як Th2-клітини продукують протизапальні цитокіни і відповідають за гуморальний імунітет, а Th17-клітини відіграють важливу роль в індукції запалення і патогенезі аутоімунних захворювань і процесів відторгнення[61]. Існують експериментальні докази того, що значне переважання Th1- чи Th2-імунітету асоційовані з ЗНВ [194,195]. Оптимальними для збереження вагітності є співвідношення Th1/Th2 клітин з незначним переважанням Th2, а також переважання Т-регуляторних клітин у порівнянні з Th17-клітинами [60].

Численні роботи останніх років засвідчують, що рівень продукції цитокінів знаходиться під генетичним контролем і, очевидно, що жінки з частими

викиднями мають генетичну схильність до формування типу імунної відповіді, який безпосередньо впливає на перебіг вагітності [60]. Оскільки за даними багаточисленних публікацій серед Th2-цитокінів значну роль в процесі підтримання вагітності, відіграє ІЛ-10 [66,196,197], його функціональні поліморфні варіанти є потенційними маркерами схильності до порушень гомеостазу в системі матір – плід і , зокрема, ЗНВ.

Нами було показано, що частота носіїв генотипу -592AA і алеля -1082A гена *IL10* була вище в групі пацієнтів з ЗНВ (0,066, 0,873) порівняно з контрольною групою жінок без ускладнень вагітності в анамнезі (0,009, 0,764). Більше того, було виявлено, що ризик невиношування у носіїв алеля -1082A вдвічі вище (OR = 2,12; ДІ 95%: 1,03-4,34). Обидва алелі, -592A та - 1082A є асоційованими зі зниженим рівнем продукції інтерлейкіну 10 [30]. Дані попередніх досліджень цих поліморфних варіантів в групах жінок з різними порушеннями вагітності, в тому числі й ЗНВ, є суперечливими [70]. Попри те, що деякими дослідницькими групами було встановлено 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 процесу формування групи та створення чітких критеріїв з метою уніфікації пацієнтів за клінічним діагнозом та виключенням інших факторів ризику розвитку ЗНВ, окрім імуногенетичних. Наші результати свідчать на користь гіпотези про важливість нормального вмісту інтерлейкіну 10 в гестаційних тканинах для збереження вагітності.

Іншим важливим цитокіном для підтримання вагітності є інтерлейкін 6. Експерименти на модельних лініях мишей, а також дослідження цитокінового профілю абортівних тканин вказують на асоціацію низького рівня продукції цього цитокіну з невиношуванням вагітності [198]. Даний цитокін продукується зокрема Th17-клітинами та є необхідним для підтримання балансу між Т-

регуляторними та Th17-клітинами [199,200]. 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. 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. Аналіз 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 мимовільних абортів було показано необхідність високого вмісту інтерлейкіну 6 для підтримання вагітності. 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 [110]. Враховуючи, що алель -397C гена *ESR1* асоційований з нормальною продукцією рецептора ER α , 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.

Хронічний вірусний гепатит С (ХВГС) є всесвітньою медичною проблемою. За останніми даними, число уражених даною інфекцією осіб в світі сягає 150 млн. [12]. Відкриття впливу індивідуальних особливостей вірусного генотипу в поєднанні з генотипом організму-господаря на результат лікування стало важливою віхою в галузі розробки стратегій протівірусної терапії [201–203]. Однією з найбільш ефективних в лікуванні ХВГС виявилась схема з

використанням комбінації інтерферону- α та рибавіріну [204,205]. Додаткова модифікація інтерферону- α поліетиленгліколем з утворенням пег-інтерферону подовжує час існування активної форми молекули та значно спрощує лікувальний процес для пацієнта. Однак, через деякий час після впровадження в широку медичну практику комбінації пег-інтерферону та рибавіріну були помічені значні відмінності в ефективності терапії у пацієнтів з генотипом вірусу І. За результатами повногеномного дослідження асоціації (GWAS) було доведено асоціацію поліморфних варіантів rs12979860 та rs8099917 гена *IL28B* з ефективністю противірусної терапії у пацієнтів з хронічним гепатитом С (вірус генотипу 1), а також спонтанним очищенням від вірусу [13,206]. Цікаво, що ця асоціація показала суттєві етнічні розбіжності [207]. Однак істотним недоліком для подальших досліджень була відсутність очевидного молекулярного механізму, який лежить в основі таких закономірностей. Відкриття раніше невідомих транскриптів експресія яких в гепатоцитах була індукована в результаті впливу вірусу гепатиту С призвело до значного прогресу в цій сфері [17]. Було показано, що динуклеотидний поліморфний варіант ss469415590 створює відкриту рамку зчитування - *IFNL4* ген (інтерферон лямбда 4) [17,164]. Цей поліморфізм, як повідомлялося, в деяких популяціях знаходився в нерівноважному зчепленні з rs12979860 [162].

За результатами популяційних досліджень нами було встановлено нерівновагу за зчепленням між поліморфізмами ss469415590 та rs12979860 ($p > 0.0001$), мажорні алелі ss469415590 TT та rs12979860 C знаходяться в фазі зчеплення. Більше того, за результатами дослідження розподілу генотипів та алельних варіантів було виявлено асоціацію між алелем ss469415590 ΔG та поганою відповіддю на противірусну терапію пег-інтерфероном. Дана асоціація вкладалася 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 ss469415590ΔG 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).

Наші дані узгоджуються з деякими попередніми дослідженнями, які показали, що продукція IFN-λ4 пов'язана з нездатністю елімінувати вірус гепатиту С у відповідь на лікування [163,164]. IFN-λ4 продукується лише тими індивідами, які мають ss469415590 ΔG алель. За своєю структурою IFN-λ4 найближче нагадує IFN-λ3, але ці білки мають тільки 29% амінокислотної ідентичності, і, в порівнянні з IFN-λ3, секреція IFN-λ4 є значно слабшою [17,208,209].

Існують суттєві особливостей противірусної активності, викликані інтерферонами III типу (λ). По-перше, на відміну від інтерферонів I типу, рецептори яких широко представлені практично у всіх соматичних клітинах, рецептори до інтерферонів III типу переважно знаходяться в негематологічних клітинах, особливо клітинах епітеліального походження, таких як бронхіальний епітелій, епітелій шлунково-кишкового тракту та кератиноцити [162]. По-друге, дослідження перебігу вірусних інфекцій на декількох мишачих моделях показали, що інтерферони III типу відіграють більш значну роль, ніж інтерферон I типу, як медіатори противірусного захисту від деяких типів вірусів, які переважно інфікують шлунково-кишковий тракт і/або епітелій дихальних шляхів [210]. Перші клінічні випробування рекомбінантного IFN-λ1 для лікування хронічного гепатиту С показують, що його противірусні ефекти схожі на дію рекомбінантного інтерферону-α, але він викликає менше побічних ефектів. Це може бути пояснено завдяки більш вузькому діапазону клітин, які експресують IFN-λR1 рецептор, необхідний для функціонування IFN-λ1 [160,161].

На відміну від інших інтерферонів III типу, IFN-λ4 має, очевидно, негативний вплив на механізми противірусного захисту. Точні шляхи впливу рівня IFN-λ4 на ефективність противірусної терапії гепатиту С не відомі. На даний момент сформовано декілька гіпотез. Перша з них сфокусована на впливі

IFN- λ 4 на експресію інтерферон-стимульованих генів (ISG). Доведено, що IFN- λ 4 долучається до сигнального каскаду за рахунок утворення комплексу з IFN- λ рецептором та може індукувати експресію IFN-стимульованих генів через Янус-кіназний шлях передачі і активації транскрипційного сигнального шляху [209]. Особи, які мають ss469415590 Δ G алель, який створює відкриту рамку зчитування для транскрипції *IFNL4*, можуть продукувати низькі рівні IFN- λ 4 білка, який в свою чергу індукує слабку, але стійку експресію інтерферон-стимульованих генів в печінці, що робить ці клітини несприйнятливими до стимуляції за допомогою інтерферону- α [209]. 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 [163,164].

З іншого боку, друга гіпотеза бере до уваги вплив продукції і секреції IFN- λ 4 на стан гепатоцитів. Існують експериментальні свідчення про порушення процесу секреції IFN- λ 4 клітинами печінки, ймовірно, за рахунок неефективного пост-транскрипційного глікозилювання [209]. Це призводить до інтрацелюлярного накопичення неглікозильованого IFN- λ 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 [162,209].

Таким чином, поліморфний варіант ss469415590 гена *IFNL4*, алель Δ G якого в нашому дослідженні був асоційований з поганою відповіддю на терапію пег-інтерфероном, є не лише інформативним, але й функціонально обґрунтованим з точки зору молекулярних особливостей перебігу вірусної інфекції, фармакогенетичним маркером ефективності протівірусної терапії пег-інтерфероном та рибавірином у пацієнтів з ХВГС (генотип вірусу I). Більше того, знижена частота алеля дикого типу Δ G (0,335) порівняно з новоутвореним алелем TT може свідчити про наявність позитивного відбору в популяції України щодо цього алельного варіанту. Дані про наявність селективної переваги у індивідів-

носіїв алеля TT були показані також для популяцій Азії та Європи, тоді як в популяціях Африки мажорним є анцестральний алель. Такі відмінності можуть бути обумовлені, з одного боку, переважанням в європейських та азійських популяціях вірусу гепатиту С генотипу I, або ж впливом інших вірусних інфекцій як фактору добору.

Підсумовуючи вищенаведене можемо стверджувати, що за результатами проведеного наукового дослідження вдалося отримати панель діагностичних генетичних маркерів спадкової схильності до розвитку рецидивуючих ерозій у пацієнтів зі спадковими дистрофіями строми рогівки, ішемічного інсульту, звичної втрати вагітності та поганої відповіді на лікування хронічного вірусного гепатиту С пег-інтерфероном, а також запропонувати пояснення потенційної функціональної ролі досліджених поліморфних варіантів генів *IL6*, *IL8*, *IL10* та *IFNL4* в патогенезі вищезазначених мультифакторних станів.

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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Clan genomics and the complex architecture of human disease / J.R. Lupski, J.W. Belmont, E. Boerwinkle [et al.] // *Cell*. – 2011. – Vol. 147, № 1. – P. 32–43.
2. Schork N. Genetics of complex disease: approaches, problems, and solutions / N. Schork // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1997. – Vol. 156, № 4. – P. S103–109.
3. Cardon L. Association study designs for complex diseases / Lon R. Cardon, John I. Bell // *Nat. Rev. Genet.* – 2001. – Vol. 2, № 2. – P. 91–99.
4. Stranger B.E. Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics / B.E. Stranger, E.A. Stahl, T. Raj [et al.] // *Genetics*. – 2011. – Vol. 187, № 2. – P. 367–383.
5. Daly A. Polymorphisms in Immunoregulatory Genes / A. Daly, C. Day, P. Donaldson // *Am. J. Pharmacogenomics*. – 2002. – Vol. 2, № 1. – P. 13–23.
6. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease / M.D. Turner, B. Nedjai, T. Hurst [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* – 2014. – Vol. 1843, № 11. – P. 2563–2582.
7. Immune mechanisms in cerebral ischemic tolerance / L. Garcia-Bonilla, C. Benakis, J. Moore [et al.] // *Front. Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – P. 44.
8. Iadecola C. The immunology of stroke: from mechanisms to translation / Costantino Iadecola, Josef Anrather // *Nat. Med.* – 2011. – Vol. 17, № 7. – P. 796–808
9. Cytokines and immuno-endocrine factors in recurrent miscarriage / K. Lim, O. Odukoya, T. Li [et al.] // *Hum. Reprod. Update*. – 1996. – Vol. 2, № 6. – P. 469–481.
10. Agrawal V.B. Corneal epithelial wound healing / Vinay B. Agrawal, Ray J. Tsai // *Indian J. Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 51, № 1. – P. 5–15.
11. Reinach P. The corneal epithelium: clinical relevance of cytokine-mediated responses to maintenance of corneal health / Peter Reinach, Kathryn S. Pokorny // *Arq. Bras. Oftalmol.* – 2008. – Vol. 71, № 6 Suppl. – P. 80–86.

12. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence / K. Mohd Hanafiah, J. Groeger, A.D. Flaxman [et al.] // *Hepatology*. – 2013. – Vol. 57, № 4. – P. 1333–1342.
13. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C / Y. Tanaka, N. Nishida, M. Sugiyama [et al.] // *Nat. Genet.* – 2009. – Vol. 41, № 10. – P. 1105–1109.
14. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis / D. Fishman, G. Faulds, R. Jeffery [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1998. – Vol. 102, № 7. – P. 1369–1376.
15. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis / A. Heinzmann, I. Ahlert, T. Kurz [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 114, № 3. – P. 671–676.
16. Comprehensive analysis of genetic polymorphisms in the interleukin-10 promoter: implications for immune regulation in specific ethnic populations / P.L. Rady, R. Matalon, J. Grady [et al.] // *Genet. Test.* – 2004. – Vol. 8, № 2. – P. 194–203.
17. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus / L. Prokunina-Olsson, B. Muchmore, W. Tang [et al.] // *Nat. Genet.* – 2013. – Vol. 45, № 2. – P. 164–171.
18. Haldar T. Effect of population stratification on false positive rates of population-based association analyses of quantitative traits / Tanushree Haldar, Saurabh Ghosh // *Ann. Hum. Genet.* – 2012. – Vol. 76, № 3. – P. 237–245.
19. Polymorphisms in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: a case control study / M. Emonts, M.J.M.W. Hazes, J.J. Houwing-Duistermaat [et al.] // *BMC Med. Genet.* – 2011. – Vol. 12, № 1. – P. 36.
20. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: Atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis / B. Nedoszytko, M. Sokołowska-Wojdyło, K. Ruckemann-Dziurdzińska [et al.] // *Postep. Dermatologii i Alergol.* – 2014. – Vol. 31, № 2. – P. 84–91.

21. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review / D. Laveti, M. Kumar, R. Hemalatha [et al.] // *Inflamm. Allergy Drug Targets*. – 2013. – Vol. 12, № 5. – P. 349–361.
22. Borish L. C. Cytokines and chemokines / Larry C. Borish, John W. Steinke // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2003. – Vol. 111, № 2. – P. S460–475.
23. Szabady R. L. Control of neutrophil inflammation at mucosal surfaces by secreted epithelial products / Rose L. Szabady, Beth A. McCormick // *Front. Immunol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 220.
24. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy / I. Striz, E. Brabcova, L. Kolesar [et al.] // *Clin. Sci. (Lond)*. – 2014. – Vol. 126. – P. 593–612.
25. Lambrecht B.N. The airway epithelium in asthma / Bart N. Lambrecht, Hamida Hammad // *Nat. Med.* – 2012. – Vol. 18, № 5. – P. 684–692.
26. McColl B. W. Systemic infection, inflammation and acute ischemic stroke / B. McColl, S. Allan, N. Rothwell [et al.] // *Neuroscience*. – 2009. – Vol. 158, № 3. – P. 1049–1061.
27. Goldbach-Mansky R. Blocking interleukin-1 in rheumatic diseases / R. Goldbach-Mansky // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 1182. – P. 111–123.
28. Cytokine expression in the alkali-burned cornea / C. Sotozono, J. He, Y. Matsumoto [et al.] // *Curr. Eye Res.* – 1997. – Vol. 16, № 7. – P. 670–676.
29. Stanimirovic D. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation / Danica Stanimirovic, Kei Satoh // *Brain Pathol.* – 2000. – Vol. 10, № 1. – P. 113–126.
30. Alleles carried at positions –819 and –592 of the IL10 promoter affect transcription following stimulation of peripheral blood cells with *Streptococcus pneumoniae* / S. Temple, E. Lim, K. Cheong [et al.] // *Immunogenetics*. – 2003. – Vol. 55, № 9. – P. 629–632.
31. Functional IL-10 Gene Polymorphism Is Associated with Chagas Disease Cardiomyopathy / G.C. Costa, M.O. da Costa Rocha, P.R. Moreira [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 199, № 3. – P. 451–454.

32. The tumor necrosis factor- α -238G/A and IL-6 -572G/C gene polymorphisms and the risk of idiopathic dilated cardiomyopathy: a meta-analysis of 25 studies including 9493 cases and 13,971 controls / A. Liaquat, U. Shauket, W. Ahmad [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2015. – Vol. 53, № 2. – P. 307–318.
33. Brown M. Functions of IL-4 and control of its expression / Melissa A. Brown, John Hural // *Crit. Rev. Immunol.* – 1997. – Vol. 17, № 1. – P. 1–32.
34. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes / P. Brandtzaeg, L. Osnes, R. Ovstebø [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 184, № 1. – P. 51–60.
35. IL-10-mediated suppression of TNF- α production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity / C.J. Clarke, A. Hales, A. Hunt [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 1998. – Vol. 28, № 5. – P. 1719–1726.
36. Opal S. Anti-inflammatory cytokines / Steven Opal, Vera A. DePalo // *Chest.* – 2000. – Vol. 117, № 4. – P. 1162–1172.
37. Dinarello C. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist / C. Dinarello // *Int. Rev. Immunol.* – 1998. – Vol. 16, № 5-6. – P. 457–499
38. Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke / X. Urra, A. Cervera, N. Villamor [et al.] // *Neuroscience.* – 2009. – Vol. 158, № 3. – P. 1174–1183.
39. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells / S.E. Wilson, R.R. Mohan, R. Ambrósio [et al.] // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2001. – Vol. 20, № 5. – P. 625–637.
40. Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing / N. Ebihara, A. Matsuda, S. Nakamura [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2011. – Vol. 52, № 12. – P. 8549–8557.
41. Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NFkappaB site / S. Bonello, C. Zähringer, R.S. BelAiba [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27, № 4. – P. 755–761.

42. Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia / P. Rosenberger, J.M. Schwab, V. Mirakaj [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2009. – Vol. 10, № 2. – P. 195–202.
43. Taylor C. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation / C. Taylor // *J. Physiol.* – 2008. – Vol. 586, № 17. – P. 4055–4059.
44. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology / J.P. Konsman, B. Drukarch, A.-M. Van Dam [et al.] // *Clin. Sci. (Lond).* – 2007. – Vol. 112, № 1. – P. 1–25.
45. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self / P. Matzinger // *Science.* – 2002. – Vol. 296, № 5566. – P. 301–305.
46. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation / M.J.L. Bours, E.L.R. Swennen, F. Di Virgilio [et al.] // *Pharmacol. Ther.* – 2006. – Vol. 112, № 2. – P. 358–404.
47. Spite M. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins / Matthew Spite, Charles N. Serhan // *Circ. Res.* – 2010. – Vol. 107, № 10. – P. 1170–1184.
48. Nathan C. Nonresolving inflammation / Carl Nathan, Aihao Ding // *Cell.* – 2010. – Vol. 140, № 6. – P. 871–882.
49. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of pro-inflammatory/anti-inflammatory and thrombotic/fibrinolytic genes in patients with acute ischemic stroke in relation to TOAST subtype / A. Tuttolomondo, D. Di Raimondo, G.I. Forte [et al.] // *Cytokine.* – 2012. – Vol. 58, № 3. – P. 398–405.
50. Polymorphisms of the inflammatory system and risk of ischemic cerebrovascular events / W. Lalouschek, M. Schillinger, K. Hsieh [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2006. – Vol. 44, № 8. – P. 918–923.
51. A -174G/C polymorphism of the interleukin-6 gene in patients with lacunar infarction / M. Revilla, V. Obach, A. Cervera [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2002. – Vol. 324, № 1. – P. 29–32.

52. The IL-6 G-174C polymorphism may be associated with ischaemic stroke in patients without a history of hypertension / J. Balding, W.J. Livingstone, S.J. Pittock [et al.] // *Ir. J. Med. Sci.* – 2004. – Vol. 173, № 4. – P. 200–203.
53. Hill J. Maternal immunological aspects of pregnancy success and failure / Joseph Hill, Bernard Choi // *J. Reprod. Fertil. Suppl.* – 2000. – Vol. 55. – P. 91–97.
54. Materno-fetal immunogenetic disparity: the biological basis for in vitro fertilization treatment in patients with unexplained recurrent abortion? / M. Creus, J.M. Calafell, S. Cívico [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2003. – Vol. 50, № 5. – P. 420–426.
55. Billington W. The immunological problem of pregnancy: 50 years with the hope of progress A tribute to Peter Medawar / W. Billington // *J. Reprod. Immunol.* – 2003. – Vol. 60, № 1. – P. 1–11.
56. Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss / B.C. Choi, K. Polgar, L. Xiao [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15. – P. 46–59.
57. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines of human placental trophoblasts in response to pathogenic bacteria / G. Griesinger, L. Saleh, S. Bauer [et al.] // *J. Soc. Gynecol. Investig.* – 2001. – Vol. 8, № 6. – P. 334–340.
58. Ford H. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy / Holly Ford, Danny Schust // *Rev. Obstet. Gynecol.* – 2009. – Vol. 2, № 2. – P. 76–83.
59. Veenstra van Nieuwenhoven A. L. The immunology of successful pregnancy / A.L. Veenstra van Nieuwenhoven, M.J. Heineman, M.M. Faas [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2003. – Vol. 9, № 4. – P. 347–357.
60. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy / S. Saito, A. Nakashima, T. Shima [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2010. – Vol. 63, № 6. – P. 601–610.
61. Cytokines in recurrent pregnancy loss / V. Saini, S. Arora, A. Yadav [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2011. – Vol. 412, № 9-10. – P. 702–708.
62. TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm / G. Chaouat, N. Ledée-Bataille, S.

- Dubanchet [et al.] // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2004. – Vol. 134, № 2. – P. 93–119.
63. Immuno-molecular etiology of recurrent pregnancy loss and the anthropological perspective / G.K. Walia, R. Mukhopadhyay, K. Saraswathy [et al.] // *Int. J. Hum. Genet.* – 2008. – Vol. 8, № 1/2. – P. 227.
64. Peck A. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example / Ariana Peck, Elizabeth Mellins // *Immunology.* – 2010. – Vol. 129, № 2. – P. 147–153.
65. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self / S. Sakaguchi // *Nat. Immunol.* – 2005. – Vol. 6, № 4. – P. 345–352.
66. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions / M.-P. Piccinni, L. Beloni, C. Livi [et al.] // *Nat Med.* – 1998. – Vol. 4, № 9. – P. 1020–1024.
67. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau / G. Chaouat, A. Assal Meliani, J. Martal [et al.] // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 154, № 9. – P. 4261–4268.
68. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients / W.-J. Wang, C.-F. Hao, Yi-Lin [et al.] // *J. Reprod. Immunol.* – 2010. – Vol. 84, № 2. – P. 164–170.
69. Detection of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-11 in plasma from women with spontaneous abortion / Y. Koumantaki, I. Matalliotakis, S. Sifakis [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2001. – Vol. 98, № 1. – P. 66–71.
70. Choi Y.K. Cytokine gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions: a comprehensive review / Yoon Kyong Choi, Joanne Kwak-Kim // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2008. – Vol. 60, № 2. – P. 91–110.
71. Wolf J. Interleukin-6 and its receptors: A highly regulated and dynamic system / J. Wolf, S. Rose-John, C. Garbers // *Cytokine.* – 2014. – Vol. 70, № 1. – P. 11–20.

72. Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease / M. Jücker, H. Abts, W. Li [et al.] // *Blood*. – 1991. – Vol. 77, № 11. – P. 2413–2418.
73. IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle / A. Steensberg, C. Keller, R.L. Starkie [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2002. – Vol. 283, № 6. – P. E1272–1278.
74. Normal and abnormal regulation of human B cell differentiation by a new cytokine, BSF2/IL-6 / T. Kishimoto, T. Taga, K. Yamasaki [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1989. – Vol. 254. – P. 135–143.
75. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications / T. Kishimoto // *Int. Immunol.* – 2010. – Vol. 22, № 5. – P. 347–352.
76. Smith K. IL-6 controls susceptibility to helminth infection by impeding Th2 responsiveness and altering the Treg phenotype in vivo / Katherine Smith, Rick Maizels // *Eur. J. Immunol.* – 2014. – Vol. 44, № 1. – P. 150–161.
77. STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line / M. Minami, M. Inoue, S. Wei [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1996. – Vol. 93, № 9. – P. 3963–3966.
78. IFN beta 2/BSF2/IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor-specific acute phase gene regulation in hepatocytes / J. Gauldie, C. Richards, W. Northemann [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1989. – Vol. 557. – P. 46–58.
79. Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor / M.M. McFarland-Mancini, H.M. Funk, A.M. Paluch [et al.] // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184, № 12. – P. 7219–7228.
80. Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies / J. Weissenbach, Y. Chernajovsky, M. Zeevi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1980. – Vol. 77, № 12. – P. 7152–7156.
81. Sehgal P. Heterogeneity of poly(I).poly(C)-induced human fibroblast interferon mRNA species / Pravinkumar Sehgal, Anurag Sagar // *Nature*. – 1980. – Vol. 288, № 5786. – P. 95–97.

82. Secretory proteins induced in human fibroblasts under conditions used for the production of interferon beta / J. Content, L. De Wit, D. Pierard [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1982. – Vol. 79, № 9. – P. 2768–2772.
83. Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts / G. Haegeman, J. Content, G. Volckaert [et al.] // Eur. J. Biochem. – 1986. – Vol. 159, № 3. – P. 625–632.
84. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2) / T. Hirano, T. Taga, N. Nakano [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1985. – Vol. 82, № 16. – P. 5490–5494.
85. Van Damme J. Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor / J. Van Damme // J. Exp. Med. – 1987. – Vol. 165, № 3. – P. 914–919.
86. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene / K. Yasukawa, T. Hirano, Y. Watanabe [et al.] // EMBO J. – 1987. – Vol. 6, № 10. – P. 2939–2945.
87. Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21 / A.C. Ferguson-Smith, Y.F. Chen, M.S. Newman [et al.] // Genomics. – 1988. – Vol. 2, № 3. – P. 203–208.
88. Gene [Электронный ресурс] // National Human Genome Research Institute, The National Center for Biotechnology Information. – Режим доступа до ресурсу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
89. Glycosylation of interleukin-6 purified from normal human blood mononuclear cells / R.B. Parekh, R.A. Dwek, T.W. Rademacher [et al.] // Eur. J. Biochem. – 1992. – Vol. 203, № 1-2. – P. 135–141.
90. In-silico human genomics with GeneCards / G. Stelzer, I. Dalah, T. Stein [et al.] // Hum. Genomics. – 2011. – Vol. 5, № 6. – P. 709–717.

91. Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor / G. Skiniotis, M.J. Boulanger, K.C. Garcia [et al.] // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 12, № 6. – P. 545–551.
92. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation / P.C. Heinrich, I. Behrmann, S. Haan [et al.] // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 374, №1. – P. 1–20.
93. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages / H. Yasukawa, M. Ohishi, H. Mori [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2003. – Vol. 4, № 6. – P. 551–556.
94. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo / B.A. Croker, D.L. Krebs, J. Zhang [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2003. – Vol. 4, № 6. – P. 540–545.
95. Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo / B. Schöbitz, G. Pezeshki, T. Pohl [et al.] // *FASEB J.* – 1995. – Vol. 9, № 8. – P. 659–664.
96. Jones S. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6 / S. Jones // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175, № 6. – P. 3463–3468.
97. Jones S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling / S. Jones, J. Scheller, S. Rose-John // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121, № 9. – P. 3375–3383.
98. Trans-signaling is a dominant mechanism for the pathogenic actions of interleukin-6 in the brain / I.L. Campbell, M. Erta, S.L. Lim [et al.] // *J. Neurosci.* – 2014. – Vol. 34, № 7. – P. 2503–2513.
99. Astrocyte-targeted expression of interleukin-6 protects the central nervous system during neuroglial degeneration induced by 6-aminonicotinamide / M. Penkowa, J. Camats, H. Hadberg [et al.] // *J. Neurosci. Res.* – 2003. – Vol. 73, № 4. – P. 481–496.
100. Hunter C. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease / Christopher Hunter, Simon Jones [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2015. – Vol. 16, № 5. – P. 448–457.

101. Davies R. Clinical experience of IL-6 blockade in rheumatic diseases - implications on IL-6 biology and disease pathogenesis / Ruth Davies, Ernest Choy // *Semin. Immunol.* – 2014. – Vol. 26, № 1. – P. 97–104.
102. Waldner M. Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development / Maximilian Waldner, Markus Neurath // *Semin. Immunol.* – 2014. – Vol. 26, № 1. – P. 75–79.
103. Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses / M. Fujimoto, S. Serada, M. Mihara [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2008. – Vol. 58, № 12. – P. 3710–3719.
104. Anti-interleukin-6 monoclonal antibody inhibits autoimmune responses in a murine model of systemic lupus erythematosus / B. Liang, D.B. Gardner, D.E. Griswold [et al.] // *Immunology.* – 2006. – Vol. 119, № 3. – P. 296–305.
105. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma / S. Kitaba, H. Murota, M. Terao [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2012. – Vol. 180, № 1. – P. 165–176.
106. Tanaka T. Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases / Toshio Tanaka, Tadimitsu Kishimoto // *Int. J. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 8, № 9. – P. 1227–1236.
107. Linkage of interleukin 6 locus to human osteopenia by sibling pair analysis / N. Ota, S.C. Hunt, T. Nakajima [et al.] // *Hum. Genet.* – 1999. – Vol. 105, № 3. – P. 253–257.
108. Allelic variants in the interleukin-6 gene and essential hypertension in Japanese women / T. Nakajima, N. Ota, H. Yoshida [et al.] // *Genes Immun.* – 1999. – Vol. 1, № 2. – P. 115–119.
109. An IL6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus / C.B. Foster, T. Lehrnbecher, S. Samuels [et al.] // *Blood.* – 2000. – Vol. 96, № 7. – P. 2562–2567.

110. Kristiansen O. Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females / O. Kristiansen // *Hum. Mol. Genet.* – 2003. – Vol. 12, № 10. – P. 1101–1110.
111. Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity / J.M. Fernández-Real, M. Broch, J. Vendrell [et al.] // *Diabetes.* – 2000. – Vol. 49, № 3. – P. 517–520.
112. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects / J.M. Fernández-Real, M. Broch, J. Vendrell [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 85, № 3. – P. 1334–1339.
113. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women / S.L. Ferrari, L. Ahn-Luong, P. Garnero [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – Vol. 88, № 1. – P. 255–259.
114. Polymorphisms in genes involved in inflammatory and angiogenic pathways and the risk of hemorrhagic presentation of brain arteriovenous malformations / L. Pawlikowska, M.N. Tran, A.S. Achrol [et al.] // *Stroke.* – 2004. – Vol. 35, № 10. – P. 2294–2300.
115. Interleukin-6 genetic variability and adiposity: associations in two prospective cohorts and systematic review in 26,944 individuals / L. Qi, C. Zhang, R.M. van Dam [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – Vol. 92, № 9. – P. 3618–3625.
116. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes / T. Illig, F. Bongardt, A. Schöpfer [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2004. – Vol. 89, № 10. – P. 5053–5058.
117. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus / J. Hull, H. Ackerman, K. Isles [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2001. – Vol. 69, № 2. – P. 413–419.
118. Neutrophilic airways inflammation in lung cancer: the role of exhaled LTB-4 and IL-8 / G.E. Carpagnano, G.P. Palladino, D. Lacedonia [et al.] // *BMC Cancer.* – 2011. – Vol. 11. – P. 226.
119. Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality

- / E.J. Miller, A.B. Cohen, S. Nagao [et al.] // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 1992. – Vol. 146, № 2. – P. 427–432.
120. Roles of IL-8 in ocular inflammations: a review / H. Ghasemi, T. Ghazanfari, R. Yaraee [et al.] // *Ocul. Immunol. Inflamm.* – 2011. – Vol. 19, № 6. – P. 401–412.
121. Semple B. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks / B.Semple, T. Kossmann, M. Morganti-Kossmann // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2010. – Vol. 30, № 3. – P. 459–473.
122. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1 / M. Jovanović, I. Stefanoska, L. Radojčić [et al.] // *Reproduction.* – 2010. – Vol. 139, № 4. – P. 789–798.
123. Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily / W.S. Modi, M. Dean, H.N. Seunanez [et al.] // *Hum. Genet.* – 1990. – Vol. 84, № 2. – P. 185–187.
124. Purification of granulocyte chemotactic peptide/interleukin-8 reveals N-terminal sequence heterogeneity similar to that of beta-thromboglobulin / J. Van Damme, J. Van Beeumen, R. Conings [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1989. – Vol. 181, № 2. – P. 337–344.
125. Increased in vivo transcription of an IL-8 haplotype associated with respiratory syncytial virus disease-susceptibility / D. Hacking, J.C. Knight, K. Rockett [et al.] // *Genes Immun.* – 2004. – Vol. 5, № 4. – P. 274–282.
126. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2 / J. Heidemann, H. Ogawa, M.B. Dwinell [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 10. – P. 8508–8515.
127. Faurschou M. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation / Mikkel Faurschou, Niels Borregaard // *Microbes Infect.* – 2003. – Vol. 5, № 14. – P. 1317–1327.

128. Association of diffuse panbronchiolitis with microsatellite polymorphism of the human interleukin 8 (IL-8) gene / M. Emi, N. Keicho, K. Tokunaga [et al.] // *J. Hum. Genet.* – 1999. – Vol. 44, № 3. – P. 169–172.
129. Digitoxin mimics gene therapy with CFTR and suppresses hypersecretion of IL-8 from cystic fibrosis lung epithelial cells / M. Srivastava, O. Eidelman, J. Zhang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2004. – Vol. 101, № 20. – P. 7693–7698.
130. Non-infected preterm parturition is related to increased concentrations of IL-6, IL-8 and MCP-1 in human cervix / S.A. Törnblom, A. Klimaviciute, B. Byström [et al.] // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2005. – Vol. 3. – P. 39.
131. The role of chemokines in hypertension / H. Martynowicz, A. Janus, D. Nowacki [et al.] // *Adv. Clin. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 23, № 3. – P. 319–325.
132. Identification of a novel thymocyte growth-promoting factor derived from B cell lymphomas / T. Suda, A. O'Garra, I. MacNeil [et al.] // *Cell. Immunol.* – 1990. – Vol. 129, № 1. – P. 228–240.
133. Two types of mouse T helper cell IV Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones / D.F. Fiorentino, M.W. Bond, T.R. Mosmann [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1989. – Vol. 170, № 6. – P. 2081–2095.
134. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRFI / K.W. Moore, P. Vieira, D.F. Fiorentino [et al.] // *Science.* – 1990. – Vol. 248, № 4960. – P. 1230–1234.
135. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence / J. Eskdale, D. Kube, H. Tesch [et al.] // *Immunogenetics.* – 1997. – Vol. 46, № 2. – P. 120–128.
136. Association of -592C/A, -819C/T and -1082A/G interleukin-10 promoter polymorphisms with idiopathic recurrent spontaneous abortion / W. Zammiti, N. Mtiraoui, E. Cochery-Nouvellon [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2006. – Vol. 12, № 12. – P. 771–776.
137. Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites / Z. Zhang, W.J. Henzel [et al.] // *Protein Sci.* – 2004. – Vol. 13, № 10. – P. 2819–2824.

138. Opal S. Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases / S. Opal, J. Wherry, P. Grint // *Clin. Infect. Dis.* – 1998. – Vol. 27, № 6. – P. 1497–1507.
139. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts / N. Hanna, I. Hanna, M. Hleb [et al.] // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164, № 11. – P. 5721–5728.
140. Torres P. The role of cytokines in corneal immunopathology / Paulo Torres, Aize Kijlstra // *Ocul. Immunol. Inflamm.* – 2001. – Vol. 9, № 1. – P. 9–24.
141. Kleinig T. Suppression of inflammation in ischemic and hemorrhagic stroke: therapeutic options / Timothy Kleinig, Robert Vink // *Curr. Opin. Neurol.* – 2009. – Vol. 22, № 3. – P. 294–301.
142. Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis / L.R. Lard, F.A. van Gaalen, J.J.M. Schonkeren [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2003. – Vol. 48, № 7. – P. 1841–1848.
143. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation / M.-T. Lin, B. Storer, P.J. Martin [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 349, № 23. – P. 2201–2210.
144. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors / S. Pestka, C.D. Krause, M.R. Walter [et al.] // *Immunol. Rev.* – 2004. – Vol. 349, P. 8–32.
145. Mutual inhibition by TGF-beta and IL-4 in cultured human bronchial epithelial cells / Y. Adachi, T. Mio, K. Takigawa [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 273, № 3 – P. 701–708.
146. Immunomodulatory functions of type I interferons / J.M. González-Navajas, J. Lee, M. David [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 12, № 2. – P. 125–135.
147. Benveniste E. Type I interferons as anti-inflammatory mediators / Etty Benveniste, Hongwei Qin // *Sci. STKE.* – 2007. – № 416. – P. 70.
148. Effects of interferons alpha and gamma on cytokine production and phenotypic pattern of human bronchial epithelial cells / I. Stríz, T. Mio, Y. Adachi [et al.] // *Int. J. Immunopharmacol.* – 2000. – Vol. 22, № 8. – P. 573–585.

149. Long-term efficacy of interferon alpha therapy on hepatitis B viral replication in patients with chronic hepatitis B: a meta-analysis / Y.-F. Yang, W. Zhao, H.-M. Xia [et al.] // *Antiviral Res.* – 2010. – Vol. 85, № 2. – P. 361–365.
150. IFN- α subtypes: distinct biological activities in anti-viral therapy / K. Gibbert, J.F. Schlaak, D. Yang [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 168, № 5. – P. 1048–1058.
151. Changes in depressive symptoms and impact on treatment course among hepatitis C patients undergoing interferon- α and ribavirin therapy: a prospective evaluation / J. Chapman, M. Oser, J. Hockemeyer [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 106, № 12. – P. 2123–2132.
152. Foster N. Induction of antimicrobial pathways during early-phase immune response to *Salmonella* spp in murine macrophages: gamma interferon (IFN-gamma) and upregulation of IFN-gamma receptor alpha expression are required for NADPH phagocytic oxidase gp91-stimulated / N. Foster, S. Hulme, P. Barrow // *Infect. Immun.* – 2003. – Vol. 71, № 8. – P. 4733–4741.
153. IFN-gamma arms human dendritic cells to perform multiple effector functions / L. Frasca, M. Nasso, F. Spensieri [et al.] // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180, № 3. – P. 1471–1481.
154. Interferon-gamma therapy in two patients with progressive chronic pulmonary aspergillosis / P. Kelleher, A. Goodsall, A. Mulgirigama [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2006. – Vol. 27, № 6. – P. 1307–1310.
155. Efficacy and safety of interferon-gamma-targeted therapy in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / D. Cui, G. Huang, D. Yang [et al.] // *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 37, № 5. – P. 507–513.
156. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo / N. Ank, H. West, C. Bartholdy [et al.] // *J. Virol.* – 2006 – Vol. 80, № 9. – P. 4501–4509.

157. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication / M.D. Robek, B.S. Boyd, F. V Chisari [et al.] // *J. Virol.* – 2005 – Vol. 79, № 6. – P. 3851–3854.
158. Toll-like receptor expression and induction of type I and type III interferons in primary airway epithelial cells / I. Ioannidis, F. Ye, B. McNally [et al.] // *J. Virol.* – 2013. – Vol. 87, № 6. – P. 3261–3270.
159. Kelly C. Interferon lambdas: the next cytokine storm / C. Kelly, P. Klenerman, E. Barnes // *Gut.* – 2011. – Vol. 60. – P. 1284–1293.
160. Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection / A.J. Muir, M.L. Shiffman, A. Zaman [et al.] // *Hepatology.* – 2010. – Vol. 52, № 3. – P. 822–832.
161. A randomized phase 2b study of peginterferon lambda-1a for the treatment of chronic HCV infection / A.J. Muir, S. Arora, G. Everson [et al.] // *J. Hepatol.* – 2014. – Vol. 61, № 6. – P. 1238–1246.
162. IFN- λ 4: The Paradoxical New Member of the Interferon Lambda Family / T.R. O'Brien, L. Prokunina-Olsson, R.P. Donnelly [et al.] // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2014. – Vol. 30, № 8. – P. 555–564.
163. Association of the IFNL4- Δ G allele with impaired spontaneous clearance of hepatitis C virus / P. V Aka, M.H. Kuniholm, R.M. Pfeiffer [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 209, № 3. – P. 350–354.
164. IFNL4- Δ G genotype is associated with slower viral clearance in Hepatitis C, genotype-1 patients treated with sofosbuvir and ribavirin / E.G. Meissner, D. Bon, L. Prokunina-Olsson [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 209, № 11. – P. 1700–1704.
165. Sham P.C. Statistical power and significance testing in large-scale genetic studies / Pak Sham, Shaun Purcell // *Nat. Rev. Genet.* – 2014. – Vol. 15, № 5. – P. 335–346.
166. Ioannidis J. Genetic associations: false or true? / J. Ioannidis // *Trends Mol. Med.* – 2003. – Vol. 9, № 4. – P. 135–138.
167. Balding D. A tutorial on statistical methods for population association studies / D.J. Balding // *Nat. Rev. Genet.* – 2006. – Vol. 7, № 10. – P. 781–791.

168. Cardon L. Population stratification and spurious allelic association / Lon Cardon, Lyle Palmer // *Lancet*. – 2003. – Vol. 361, № 9357. – P. 598–604.
169. Hidden population substructures in an apparently homogeneous population bias association studies / M. Berger, H.H. Stassen, K. Köhler [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2006. – Vol. 14, № 2. – P. 236–244.
170. Маниатис Т. Методы генетической инженерии Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук 1984. – 479 с.
171. Rousset F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux / F. Rousset // *Mol. Ecol. Resour.* – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 103–106.
172. Basic statistical analysis in genetic case-control studies / G.M. Clarke, C.A. Anderson, F.H. Pettersson [et al.] // *Nat. Protoc.* – 2011. – Vol. 6, № 2. – P. 121–133.
173. Szumilas M. Explaining odds ratios / M. Szumilas // *J. Can. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* – 2010. – Vol. 19, № 3. – P. 227–229.
174. Sullivan K. OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health / K. Sullivan, A. Dean, M. Soe // *Public Heal. Rep.* – 2009. – Vol. 124, № 3. – P. 471–474.
175. Прогностичне значення поліморфізму гена IL-28b щодо успішності противірусної терапії у хворих на хронічний гепатит С / Л.В. Мороз, В.М. Дудник, Л.А. Лівшиц [та ін.] // *Сучасна гастроентерологія*. – 2011. – № 2 (58). – С. 24–26.
176. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes / G.R. Abecasis, A. Auton, L.D. Brooks [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol. 491, № 7422. – P. 56–65.
177. Aldave A. The genetics of the corneal dystrophies / A. Aldave // *Dev. Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 48. – P. 51–66.
178. Kannabiran C. TGFBI gene mutations in corneal dystrophies / Chitra Kannabiran, Gordon Klintworth [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2006. – Vol. 27, № 7. – P. 615–625.

179. Weidle E. Epithelial and stroma corneal dystrophies / E. Weidle // *Ophthalmologie*. – 1996. – Vol. 93, № 6. – P. 754–767.
180. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea / J.W. Hong, J.J. Liu, J.S. Lee [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2001. – Vol. 42, № 12. – P. 2795–2803.
181. Mena H. Human cerebral infarct: a proposed histopathologic classification based on 137 cases / H. Mena, D. Cadavid, E.J. Rushing // *Acta Neuropathol.* – 2004. – Vol. 108, № 6. – P. 524–530.
182. Moskowitz M. The science of stroke: mechanisms in search of treatments / M. Moskowitz, E. Lo, C. Iadecola // *Neuron*. – 2010. – Vol. 67, № 2. – P. 181–198.
183. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons / P. Lipton // *Physiol. Rev.* – 1999. – Vol. 79, № 4. – P. 1431–1568.
184. Bacigaluppi M. Animal models of ischemic stroke Part one: modeling risk factors / M. Bacigaluppi, G. Comi, D.M. Hermann // *Open Neurol. J.* – 2010. – Vol. 4. – P. 26–33.
185. Yilmaz G. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury / Gokhan Yilmaz, Neil Granger // *Neuromolecular Med.* – 2010. – Vol. 12, № 2. – P. 193–204.
186. Lindsberg P. Mast cells as early responders in the regulation of acute blood-brain barrier changes after cerebral ischemia and hemorrhage / P. Lindsberg, D. Strbian, M. Karjalainen-Lindsberg // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2010. – Vol. 30, № 4. – P. 689–702.
187. The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia / C. Benakis, L. Garcia-Bonilla, C. Iadecola [et al.] // *Front. Cell. Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – P. 461.
188. Kono H. How dying cells alert the immune system to danger / Hajime Kono, Kenneth Rock // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 8, № 4. – P. 279–289.
189. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells / A. Taylor, J. Verhagen, K. Blaser [et al.] // *Immunology*. – 2006. – Vol. 117, № 4. – P. 433–442.

190. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage / M. Grilli, I. Barbieri, H. Basudev [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 2000. – Vol. 12, № 7. – P. 2265–2272.
191. Branch D. Clinical practice Recurrent miscarriage / D. Branch, M. Gibson, R. Silver // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – Vol. 363, № 18. – P. 1740–1747.
192. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice / V. Plaks, T. Birnberg, T. Berkutzki [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118, № 12. – P. 3954–3965.
193. Guerin L. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? / L. Guerin, J. Prins, S. Robertson // *Hum. Reprod. Update.* – 2009. – Vol. 15, № 5. – P. 517–535.
194. Serial estimation of Th1:Th2 cytokines profile in women undergoing in-vitro fertilization-embryo transfer / E. Kalu, S. Bhaskaran, M.Y. Thum [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2008. – Vol. 59, № 3. – P. 206–211.
195. Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple implantation failures after IVF / J.Y.H. Kwak-Kim, H.S. Chung-Bang, S.C. Ng [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2003. – Vol. 18, № 4. – P. 767–773.
196. Global alteration in gene expression profiles of deciduas from women with idiopathic recurrent pregnancy loss / S.A. Krieg, X. Fan, Y. Hong [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2012. – Vol. 18, № 9. – P. 442–450.
197. Robertson S. Interleukin 10 Regulates Inflammatory Cytokine Synthesis to Protect Against Lipopolysaccharide-Induced Abortion and Fetal Growth Restriction in Mice / S. Robertson, A. Care, R. Skinner // *Biol. Reprod.* – 2007. – Vol. 76, № 5. – P. 738–748.
198. Prins J. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders / J. Prins, N. Gomez-Lopez, S. Robertson // *J. Reprod. Immunol.* – 2012. – Vol. 95, № 1-2. – P. 1–14.
199. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta / L. Xu, A. Kitani, I. Fuss [et al.] // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178, № 11. – P. 6725–6729.

200. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs / X.O. Yang, R. Nurieva, G.J. Martinez [et al.] // *Immunity*. – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 44–56.
201. Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection / R. Mukherjee, A. Burns, D. Rodden [et al.] // *J. Lab. Autom.* – 2015 – Vol. 20, № 5. – P. 519–538.
202. Rau M. Host Genetic Variants in the Pathogenesis of Hepatitis C / M. Rau, K. Baur, A. Geier // *Viruses*. – 2012. – Vol. 4, № 12. – P. 3281–3302.
203. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on / P. Simmonds // *J. Gen. Virol.* – 2004. – Vol. 85, № 11. – P. 3173–3188.
204. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection / M. Fried, M. Shiffman, K. Reddy [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 347, № 13. – P. 975–982.
205. Kanda T. Pegylated interferon-alfa plus ribavirin therapies for chronic hepatitis C / Tatsuo Kanda, Osamu Yokosuka // *J. Nepal Med. Assoc.* – 2011. – Vol. 51, № 1. – P. 41–48.
206. Matsuura K. Role of IL28B for chronic hepatitis C treatment toward personalized medicine / K. Matsuura, T. Watanabe, Y. Tanaka // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2014. – Vol. 29. – P. 241–249.
207. Hajarizadeh B. Epidemiology and natural history of HCV infection / B. Hajarizadeh, J. Grebely, G.J. Dore // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2013. – Vol. 10, № 9. – P. 553–562.
208. Interferon- λ 4 (IFNL4) transcript expression in human liver tissue samples / A. Amanzada, W. Kopp, U. Spengler [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 12. – P. e84026.
209. Interferon lambda 4 signals via the IFN λ receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses / O.J. Hamming, E. Terczyńska-Dyła, G. Vieyres [et al.] // *EMBO J.* – 2013. – Vol. 32, № 23. – P. 3055–3065.
210. IFN-lambda determines the intestinal epithelial antiviral host defense / J. Pott, T. Mahlaköiv, M. Mordstein [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2011. – Vol. 108, № 19. – P. 7944–7949.

Додаток А

Копія акту впровадження “ДНК-діагностика генетично обумовлених форм ішемічного інсульту та генетичне тестування поліморфних варіантів в генах, відповідальних за розвиток патології, для поліпшення прогнозування перебігу захворювання та розробки індивідуалізованого плану терапії”

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 головний лікар клініки
 ДУ «Інститут геронтології
 ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»
 Козлов С.В.



« 19 » 05 2015

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** ДНК-діагностика генетично обумовлених форм ішемічного інсульту та генетичне тестування поліморфних варіантів генів, відповідальних за розвиток патології, для поліпшення прогнозування перебігу захворювання та розробки індивідуалізованого плану терапії.
2. **Установа розробник:** Інститут молекулярної біології і генетики НАН, 03680, м. Київ, вул. акад. Заболотного, 150, тел. (044) 526 07 69.
 ДУ „Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України”, 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67, тел. (044) 430 40 68
Укладачі: відділ геноміки людини, відділ судинної патології головного мозку
Автори: Кучеренко А.М., Кузнецова С.М., Шульженко Д.В., Демидов С.В., Кравченко С.А., Лівшиць Л.А.
3. **Джерело інформації:** Kucherenko A. M., Shulzhenko D. V. Kuznetsova S. M. Demydov S. V. Livshits L. A. Association of *IL8* and *IL10* gene allelic variants with ischemic stroke risk and prognosis // Biopolymers and Cell. – 2014. – Vol. 30, № 3. – P. 234–238.
 Клинические аспекты фармакогенетики антигипертензивных препаратов / С. М. Кузнецова, Л. А. Лившиц, Н. В. Ларина // Журнал неврології ім. Б. М. Маньковського. - 2014. - № 3. - С. 70-75.
 Особенности биоэлектрической активности головного мозга у больных инсультом с различными полиморфными вариантами гена ACE / С. М. Кузнецова, Л. А. Лившиц, Н. В. Ларина, С. А. Кравченко // Журнал неврології ім. Б. М. Маньковського. - 2013. - № 1. - С. 49-54.
4. **Де впроваджено:** клініка ДУ „Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України”, відділення реабілітації хворих з порушенням мозкового кровообігу, тел. (044) 431 05 47
5. **Термін впровадження:** 01.01.2015-31.12.2015
6. **Область застосування:** лікувально-профілактична робота закладів практичної охорони здоров'я
7. **Ефективність впровадження:** підвищує ефективність прогнозування перебігу захворювання та дозволяє індивідуалізувати план терапії реабілітації
8. **Зауваження, пропозиції:** рекомендовано для застосування в лікувальній, науковій діяльності, педагогічному процесі, навчально-методичній роботі

« 19 » 05 2015 р.

Зав. відділом судинної патології головного мозку
 ДУ „Інститут геронтології
 ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України”
 чл.-кор. НАМН України Кузнецова С.М.

Додаток Б

Копія акту впровадження “Спосіб прогнозування ефективності комбінованої терапії пегільованим інтерфероном та рибавірином у хворих на хронічний гепатит С на основі визначення генотипу гену інтерферону λ -4 (*IFNL4*)”

*

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар Хмельницької міської
інфекційної лікарні

Піддубна О.В.

Керівник установи, де проведено впровадження

«17» 05 2015 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Спосіб прогнозування ефективності комбінованої терапії пегільованим інтерфероном та рибавірином у хворих на хронічний гепатит С на основі визначення генотипу гену інтерферону $\lambda - 4$ (*IFNL4*).
найменування пропозиції для впровадження¹
2. Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, 03680, м. Київ, вул. Заболотного 150, А.М. Кучеренко, В.М. Пампуха, Л.А.Лівшиць.
Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м.Вінниця, вул. Пирогова, 56, К.Ю. Романчук, Л.В. Мороз
установа, що розробила, її поштова адреса, прізвище, ім'я по батькові авторів²
3. Джерело інформації: Поліморфізм гену *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.- № 1 (27). – С. 21-26.
назва, рік видання методичних рекомендацій, інформаційного листа, вихідні дані статті, № а.с. і т.п.²
4. Впроваджено: Хмельницька міська інфекційна лікарня
найменування лікувально-профілактичного закладу⁴
5. Термін впровадження⁴: 7 років
6. Загальна кількість спостережень⁴ 67 (шістдесят сім)
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації (п. 3)

Показники ⁵	За даними	
	авторів, які пропонують впровадження	організації, що впровадила ⁴
Генотип за поліморфним варіантом ss469415590 гену <i>IFNL4</i>	Перевага запропонованого способу полягає у тому, що визначення генотипу гену <i>IFNL4</i> допоможе лікарю прогнозувати ефективність комбінованої терапії пегільованим інтерфероном та рибавірином та ввести корективи в індивідуальний план ведення хворого на хронічний гепатит С.	

8. Зауваження, пропозиції⁴ Визначення генотипу гену *IFNL4* доцільно проводити при плануванні стратегії протівірусної терапії у хворих на хронічний гепатит С. Запропонований спосіб слід широко впроваджувати в інфекційних стаціонарах.
9. Відповідальний за впровадження: завідувача гепатологічним відділенням Хмельницької міської інфекційної лікарні Дворнік Ж.Л.

«24» 05 2015 р.

1 Узагальнені акти впровадження затверджує заст. завідуючого відділом охорони здоров'я.

2 Заповнюється розробником.

4 Заповнюється організацією, яка впровадила розробку.

5 В акт вдруковується тільки ті показники, яким відповідає дана розробка.