

**КОЗАК Н. А.<sup>1</sup>, ПОЧЕРНЯЕВ А. К.<sup>2</sup>, ЛЫТКИН Д. В.<sup>1</sup>, ГОРШУНСКАЯ М. Ю.<sup>3</sup>,  
ПОЧЕРНЯЕВА С. С.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Харьковський національний університет імені В.Н. Каразіна,  
Україна, 61022, г. Харків, пл. Свободи, 4, e-mail: kozaknatasha@mail.ru

<sup>2</sup> ГУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України»,  
Україна, 61002, г. Харків, ул. Артема, 10, e-mail: pochernyaev.ak84@mail.ru

<sup>3</sup> Харківська медична академія післядипломного освіти,  
Україна, 61176, г. Харків, ул. Корчагинцев, 58

## ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 (*IL-6*) У ЖИТЕЛЕЙ ХАРЬКОВА, БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

В настоящее время для многих мультифакториальных заболеваний, таких как сахарный диабет, ведётся поиск генов-кандидатов. Уже надёжно идентифицированы несколько локусов, которые отвечают за развитие сахарного диабета 1 и 2 типов. Но имеются гены, ассоциация которых с сахарным диабетом остаётся под вопросом. Одним из них является ген интерлейкина-6 (*IL-6*) [1].

Повышенный уровень интерлейкина-6 связан не только с сахарным диабетом, но и с нарушенной толерантностью к глюкозе, что указывает на потенциальную роль этого цитокина в этиологии сахарного диабета. Интерлейкин-6 представляет собой макромолекулы, которые продуцируют лимфоциты [4], а также моноциты, макрофаги, CD4<sup>+</sup>Th2-лимфоциты, клетки стромы костного мозга, фибробласты, гепатоциты и ряд других клеток. Эти про- и противовоспалительные цитокины влияют на индукцию В-лимфоцитов, стимулируя их превращение в плазматические клетки, способные вырабатывать антитела [5]. Интерлейкин-6 влияет на клетки-мишени посредством их взаимодействия со специфическими рецепторами на поверхности, чем способен воздействовать на рост костной ткани, ангиогенез, развитие опухолей, расщепление жиров и резистентность миоцитов к инсулину [6].

Предполагается, что концентрация интерлейкина-6 регулируется в основном на уровне транскрипции и трансляции. Таким образом, обнаружение единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) в промоторной области гена *IL-6* дают возможность рассматривать некоторые его аллели в качестве факторов риска сахарного диабета. Недавнее исследование доказало ассоциацию полиморфизма *rs2069840 C-174G* с диабетом у жителей Аугсбурга (Германия) [2], у коренных американцев и у белых испанцев [3].

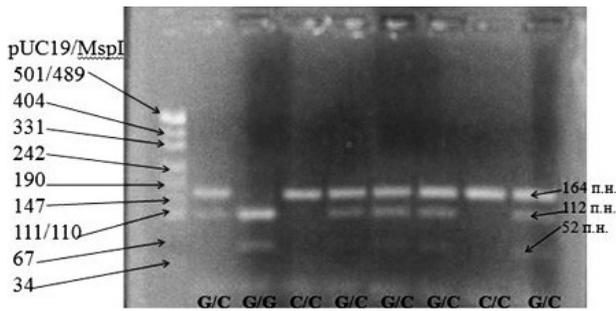
Ген *IL-6* находится в локусе 7p21, включает пять экзонов [7]. Продукт гена активирует эндотелиальные клетки и обеспечивает сбор лейкоцитов около стенок сосудов. Предполагается, что активность интерлейкина-6 может приводить к постепенному разрушению β-клеток поджелудочной железы [1]. Генетическим маркером гена *IL-6* является полиморфизм, в результате которого происходит замена гуанина (G) на цитозин (C) в позиции 174 (174G/C). Данный полиморфизм влияет на уровень экспрессии гена, изменяя скорость его транскрипции [8].

Целью данного исследования было провести пилотное исследование по изучению связи однонуклеотидного полиморфизма *rs2069840* (174G/C) гена интерлейкина-6 у населения Харькова.

### Материалы и методы

Исследованы образцы крови 60 больных сахарным диабетом 2 типа (33 мужчины и 27 женщин). Контрольную группу составили 49 человек (26 мужчин и 23 женщины) без диагноза сахарный диабет 2 типа, ишемической болезни и артериальной гипертензии. Все обследованные были жителями Харькова, украинцами и русскими. Образцы крови здоровых людей собраны на Харьковской областной станции переливания крови при условии добровольного информированного согласия.

ДНК выделялось из лейкоцитов с помощью ионообменной смолы Chelex-100 [9]. Определение аллельного состояния гена *IL-6* по однонуклеотидной замене 174G/C (*rs2069840*) проводили с помощью полимеразной цепной реакции. Для амплификации фрагмента гена *IL-6*, в котором находится полиморфный сайт 174G/C, использовали олигонуклеотидные праймеры — прямой IL6174F: TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT и об-



**Рис. 1.** Электрофореграмма продуктов рестрикции амплифицированных в ПЦР фрагментов SNP *rs2069840* гена *IL-6*

ратный IL6174R: AATAGGTTTTGAGGGCCATG. Рестрикцию продуктов амплификации осуществляли с помощью эндонуклеазы *Hin1II* (*NlaIII*) (МБИ Fermentas, Литва). Генотипы исследуемых определяли по виду электрофореграммы (рис. 1). Продукты рестрикции анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в 1xTBE. В качестве маркера молекулярной массы была использована ДНК pUC19, которая была гидролизирована нуклеазой *MspI* (МБИ Fermentas, Литва). Визуализацию продуктов амплификации и рестрикции проводили путем подкрашивания геля бромистым этидием и фотографированием на транслюминаторе в ультрафиолетовом свете. Рестриктный фрагмент размером 164 п.н. соответствовал аллелю (C), два рестриктных фрагмента размером 112 и 52 п.н. — аллелю (G) [10].

Рассчитаны частоты аллелей  $p_C$  и  $q_G$ . Ассоциацию сахарного диабета 2 типа с изученным локусом оценивали с помощью критерия  $\chi^2$ . Сравнение долей проведено с помощью  $\phi$ -трансформации и критерия  $F$  [11]. Силу и направление ассоциации аллеля с сахарным диабетом оценивали с помощью тетрагорического показателя связи  $r$  [12]. Рассчитаны показатели отношения шансов (OR), чувствительность и специфичность теста, индекс точности теста. Прогностическую ценность положительного и отрицательного результатов вычисляли из расчёта распространённости сахарного диабета среди населения Харьковской области. Проверку статистических гипотез проводили на уровне значимости 0,05.

### Результаты и обсуждение

Частоты аллелей и распределение генотипов у мужчин и женщин статистически значимо не различались, поэтому дальнейшие расчёты проводились на общей группе. Проверка рас-

пределения генотипов по SNP 174 G/C гена *IL-6* у здоровых людей на соответствие равновесию Харди-Вайнберга, показала, что распределение генотипов значимо не отличалось от теоретически ожидаемого (табл. 1).

Частоты аллелей  $p_C$  и  $q_G$  в контрольной группе равняются 0,5, у больных сахарным диабетом 2 типа  $p_C = 0,6$  и  $q_G = 0,4$  ( $p > 0,05$ , табл. 2).

Хотя в распределении генотипов у больных и здоровых людей не выявлено статистически значимой разницы (табл. 3), тем не менее, следует отметить, что частота генотипа GG у больных на 20% выше, чем в контрольной группе (30,0 и 24,5%, соответственно). Немного повышена также и частота генотипа CG (55 и 51%). Частота генотипа CC у больных сахарным диабетом понижена по сравнению с контролем (15,0 и 24,5% соответственно).

На силу и направление ассоциации генотипа CC с сахарным диабетом 2 типа указывает тетрагорический показатель связи:  $r = 0,06$  ( $p > 0,05$ ).

Отношение шансов для сахарного диабета 2 типа при каждом из трёх генотипов составляет:  $OR_{CC} = 1,32$ ;  $OR_{CG} = 1,17$ ;  $OR_{GG} = 0,54$ . Полученные результаты, которые следует рассматривать как предварительные, свидетельствуют, что носительство аллеля C в изученном населении является фактором повышенного риска по сахарному диабету 2 типа. В терминах классической генетики аллель C в отношении сахарного диабета проявляет эффект полудоминирования. Генотип GG можно рассматривать как потенциально протективный в отношении сахарного диабета 2 типа.

Чувствительность данного диагностического метода составила 15%, а его специфичность — 76%. При этом прогностическая ценность положительного результата, которая отражает вероятность быть больным при положительном показателе, не превышает двух процентов. Прогностическая ценность отрицательного результата составляет 97%. Индекс точности равняется 74%. Отношение правдоподобия положительного результата составляет 0,63; отношение правдоподобия отрицательного результата — 1,6. Для статистического доказательства обнаруженных эффектов необходимо повысить мощность критерия до принятого уровня  $P = 80\%$ , доведя объём каждой из сравниваемых групп до  $n = 270$  [13].

В отличие от полученных нами данных, в работах [2, 3, 8] протективные свойства в от-

Таблица 1

**Проверка популяционной выборки на соответствие равновесию Харди-Вайнберга по rs2069840 гена IL-6**

Распределение	Количество людей (n) с генотипами		
	CC	CG	GG
Фактическое	12,0	25,0	12,0
Теоретически ожидаемое	12,3	24,5	12,3
Статистики	$\chi^2 = 0,024; \chi^2_{0,05(1)} = 3,84; p > 0,05$		

Примечания:  $\chi^2$  — рассчитанный критерий Пирсона;  $\chi^2_{0,05(1)}$  — пороговое значение критерия;  $p$  — уровень значимости разницы между фактическими данными и теоретически ожидаемыми.

Таблица 2

**Частота аллеля G rs2069840 гена IL-6 у больных сахарным диабетом 2 типа и здоровых людей**

Группа	Частота аллеля G	
	контроль	сахарный диабет 2 типа
Мужчины	0,48	0,47
Женщины	0,52	0,37
<b>Все</b>	<b>0,50</b>	<b>0,43</b>

Таблица 3

**Соотношение генотипов rs2069840 гена IL-6 у больных и здоровых**

Группа	Генотипы, %		
	GG	CG	CC
Контроль	24,5	51,0	24,5
Сахарный диабет 2 типа	15,0	55,0	30,0
Статистики	$F_{GG} = 0,24; F_{CG} = 0,09; F_{CC} = 0,11; F_{0,05(1)} = 4,40; p > 0,05$		

Примечания:  $F$  — критерий Фишера,  $p$  — уровень значимости разницы между долями.

ношении сахарного диабета 2 типа были отмечены у генотипа CC. Неоднозначность результатов, полученных в разных исследованиях, статистическая незначимость ряда из них указывают на целесообразность включить данные разных авторов в метаанализ.

Целесообразность дальнейшего набора данных определяется ценностью этого теста, что можно оценить по результатам данного исследования.

**Выводы**

1. Распределение генотипов SNP rs2069840 гена интерлейкина-6 в харьковской популяции не отклоняется от равновесия Харди-Вайнберга.

2. По результатам пилотного исследования обнаружено, что генотип CC повышает риск развития сахарного диабета 2 типа у жителей Харькова в 1,2 раза.

Авторы выражают благодарность профессору Л. А. Атраментовой за помощь в статистическом анализе и профессору В. В. Полтораку за помощь в обсуждении результатов.

**ЛИТЕРАТУРА**

- Носиков В. В., Серегин Ю. А. Молекулярная генетика сахарного диабета типа 1: достижения и перспективы // Молекулярная биология. — 2008. — 42, № 5. — С. 867–879.
- Illig T., Bongardt F., Schöpfer A., Müller-Scholze S., Rathmann W., Koenig W., Thorand B., Vollmert C., Holle R., Kolb H., Herder C. Kooperative Gesundheitsforschung im Raum Augsburg. Cooperative Research in the Region of Augsburg. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2004. — 89. — P. 5053–5058.
- Vozarova B., Fernández-Real J.M., Knowler W.C., Gallart L., Hanson R.L., Gruber J.D., Ricart W., Vendrell J., Richart C., Tataranni P.A., Wolford J.K. The interleukin-6. (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians // Hum Genet 112. — 2003. — P. 409–413.
- Черешнев В. А., Гусев В. Ю. Иммунология воспаления: роль цитокинов // Медицинская иммунология. — 2001. — 3, № 3. — С. 361–368.
- Попов Н. Н., Лавров В. Ф., Солошенко Э. Н. Клиническая иммунология и аллергология: Учеб. пособие. — М.: ООО Фирма «Релнфор», 2004. — 524 с.

6. Pedersen B., Steensberg A., Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects // *J. Physiol.*— 2001. — 536. — P. 329–337.
7. Yasukawa K., Hirano T., Watanabe Y., Muratani K., Matsuda T., Nakai S., Kishimoto T. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene // *EMBO J.*— 1987. — 7, N 10. — P. 2939–2945.
8. Коненков В. И., Шевченко А. В., Прокофьев В. Ф., Климонтов В. В., Королев М. А., Фазулина О. Н., Лапсина С. А., Королева Е. А. Ассоциации вариантов гена фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и генов цитокинов (IL-1B, IL-4, IL-6, IL-10, TNFA) с сахарным диабетом 2 типа у женщин // *Сахарный диабет.*— 2012, № 3. — С. 4–10.
9. Walsh P. S., Metzger D. A., Higuchi R. Chelex 100 as a medium for extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material // *BioTechniques.*— 1991. — 10. — P. 506–513.
10. Fernandez-Real J.M., Broch M., Vendrell J., Richart C., Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects // *Clin. Endocrinol. Metab.*— 2000. — 85, N 3. — P. 1334–1339.
11. Атраментова Л. А., Утевская О. М. Статистические методы в биологии. — Горловка: ЧП «Видавництво Ліхтар», 2008. — 248 с.
12. Плохинский Н. А. Биометрия. — М.: МГУ, 1970. — С. 367–368.
13. Атраментова Л. А. Дизайн и статистика биологического исследования. — Харьков: Издательство «НТМТ», 2014. — 255 с.

**KOZAK N.A.<sup>1</sup>, POCHERNYAYEV A.K.<sup>2</sup>, LYTkin D.V.<sup>1</sup>, GORSHUNSKA M. Yu.<sup>3</sup>, POCHERNYAYEVA S.S.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> V.N. Karazin Kharkiv National University,

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svobody sq., 8, e-mail: kozaknatasha@mail.ru

<sup>2</sup> State Institution «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of National Academy of Medical Science of Ukraine»,

Ukraine, 61002, Kharkiv, Artema str., 10, e-mail: pochernyaev.ak84@mail.ru

<sup>3</sup> Kharkiv Medical Postgraduate Academy,

Ukraine, 61000, Kharkiv, Korchagintcev str., 58

#### **SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF INTERLEUKIN-6 (*IL-6*) IN RESIDENTS OF KHARKIV PATIENTS WITH TUPE 2 DIABETES MELLITUS**

**Aims.** To examine the association between SNP rs2069840 (174G / C) of interleukin-6 gene and type 2 diabetes in the population of Kharkov. Objects were venous blood samples of 60 patients with type 2 diabetes and 49 healthy persons (all residents of Kharkiv, Ukrainian and Russian). **Methods.** Genotyping by PCR-RFLP. **Results.** The distribution of genotypes for SNP *rs2069840* corresponds to the Hardy-Weinberg equilibrium. Allele frequencies in the control group is 0.5; in the group of patients  $p_c = 0.4$ ,  $q_c = 0.6$ . The weak non-significant association between *CC* genotype and type 2 diabetes was marked. The odds ratio for genotype *GG* is 0.54. The sensitivity of the test is 15%, specificity — 76%. The positive predictive value is equal to 2%, negative — 97%, the accuracy of the test is 74%, positive likelihood ratio result is 0.63, a negative — 1.6. **Conclusions.** The distribution of genotypes for SNP *rs2069840* of interleukin-6 in the Kharkov population does not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium. According to the results of a pilot study was founded that the *CC* genotype increases the risk of type 2 diabetes in 1.2 times.

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus, interleukin-6 gene, Kharkov population, allele frequencies.