

УДК 616.28-008.14-053.2:612.017.1

**Abstract****O. M. Iftoda,****L. P. Sydorчук,***Bukovinian State Medical  
University, 2 Theatralna Ploshcha,  
58000 Chernivtsi, Ukraine,***CYTOKINE MECHANISMS OF IMMUNOLOGICAL DISORDERS  
IN CHILDREN OF BUKOVINA WITH DEAFNESS DEPENDING  
ON POLYMORPHISMS OF CONNEXIN-26 CJB2 (RS80338939)  
AND INTERLEUKIN-4 (RS2243250) GENES**

**Introduction.** 360 million people worldwide have disabling hearing loss. Hearing loss may result from genetic causes, complications at birth, certain infectious diseases, chronic ear infections, the use of particular drugs, exposure to excessive noise and ageing. About 100 genes in the human body responsible for the hearing organ formation and function. Over 50 % of autosomal recessive forms of hearing loss associated with mutations in the gene connexin-26 CJB2 (gap junction protein, beta 2), localized in 13q11-q12. However, at present there are no recommendations on the use of molecular genetic tests in the early diagnosis of deafness. Debatable issues nowadays are the genetic factors impact on the type and degree of hearing loss, immune response changes, etc.

**Purpose.** To evaluate some immunological mechanisms of sensorineural (SNHL) and conductive hearing loss (CHL) development in children after pro- and antiinflammatory cytokine levels depending on genes polymorphism of connexin-26 (CJB2, c.35delG) (rs80338939) and interleukin-4 (IL-4, C-590T) (rs 2243250).

**Materials and Methods.** 102 screened children (8-18 years): 68 (66.7 %) children with SNHL, 34 (33.3 %) with CHL. The control group consisted of 30 healthy individuals. Levels of cytokines: tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 and IL-13 in plasma were determined by ELISA. Study of gene polymorphisms of IL-4 (C-590T) and CJB2 (c.35delG) performed by polymerase chain reaction. Statistical processing was performed with Statistica® 7.0 software. The differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

**Results.** SNHL and CHL course in children is associated with a decreased concentration of IL-1 $\beta$  in the peripheral venous blood plasma by 36.06 % and 29.53 %, increased of IL-4 1.69 ( $p < 0.05$ ) and 2.68 times ( $p = 0.013$ ) and different changes of TNF $\alpha$  content (increases in CHL children, reduces in SNHL cases), IL-10 and IL-13 (contrary, it increases in SNHL children and decreases in CHL subjects).

The imbalance of the immune response in children with SNHL characterized by inhibition of cellular immunity and activation of humoral answer caused by low TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  content in CT-, TT-genotype carriers of IL-4 gene – 2.42 ( $p = 0.032$ ) and 2.02 times ( $p = 0.042$ ) with the antiinflammatory IL-4 and IL-10 cytokines hyperproduction 4.4-16.45 times ( $p \leq 0.005$ ). CHL TT genotype carriers of IL-4 gene followed by increased TNF- $\alpha$  1.69 times ( $p = 0.033$ ) and IL-4 35.71 times ( $p < 0.001$ ), low levels of IL-10 3.11-4.44 times ( $p \leq 0.01$ ) and IL-13 – 1.66-2.72 times ( $p \leq 0.026$ ) respectively. But,

in the mutational 35delG-carriers of the CJB2 gene the CHL course is associated with reduced TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 production with preserved IL-13 synthesis. It proved the cellular and humoral immune response reduced activity and an increased risk of allergic reactions.

**Conclusion:** SNHL in the T-allele carriers' children characterized by decreased activity of antiinfectious nonspecific immune defense factors. CHL course associated with cell immune response activation (mainly) and humoral part (less) as well.

**Keywords:** sensorineural, conductive deafness, children, cytokines, genes CJB2, IL-4.

**Corresponding author:** [lsydorchuk@ukr.net](mailto:lsydorchuk@ukr.net)

#### Резюме

О. М. Іфтода,  
Л. П. Сидорчук,  
Буковинський державний  
медичний університет,  
Театральна площа, 2,  
м. Чернівці, Україна, 58000

#### ЦИТОКІНОВІ МЕХАНІЗМИ ІМУНОЛОГІЧНИХ ПОРУШЕНЬ У ДІТЕЙ БУКОВИНИ ІЗ ГЛУХОТОЮ ЗАЛЕЖНО ВІД ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ КОНЕКСИНУ-26 CJB2 (RS80338939) ТА ІНТЕРЛЕЙКІНУ-4 (RS2243250)

**Мета** – дослідити окремі ланки імунологічних механізмів нейросенсорної (НСГ) та кондуктивної (КГ) глухоти у дітей за рівнями про- та протизапальних цитокінів залежно від поліморфізму генів конексину-26 (CJB2, с.35delG) (rs80338939) та інтерлейкіну-4 (IL-4, С-590Т) (rs 2243250).

**Методи дослідження.** Етап скринінгу пройшли 102 дитини (8–18 років): 68 (66,7 %) дітей із НСГ, 34 (33,3 %) – із КГ. Групу контролю становили 30 практично здорових осіб. Рівні цитокінів: фактора некрозу пухлин альфа (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 та IL-13, визначали у плазмі крові імуноферментним методом. Дослідження поліморфізму генів IL-4 (С-590Т) та CJB2 (с.35delG) виконували методом ПЛР.

**Результати.** Розвиток НСГ і КГ у дітей асоціює зі зниженням концентрації IL-1 $\beta$ , збільшенням IL-4 у 1,69 ( $p < 0,05$ ) і 2,68 рази ( $p = 0,013$ ) та різноспрямованими змінами за вмістом TNF $\alpha$  (зростає у дітей із КГ, зменшується – при НСГ), IL-10 і IL-13 (навпаки зростає у дітей із НСГ та зменшується – при КГ). Дисбаланс імунної відповіді у дітей із НСГ характеризується пригніченням клітинної ланки імунітету із активацією гуморальної, зумовленою низьким умістом TNF- $\alpha$  та IL-1 $\beta$ , у носіїв СТ-, ТТ-генотипів гена IL-4 у 2,42 ( $p = 0,032$ ) і 2,02 рази ( $p = 0,042$ ), із гіперпродукцією протизапальних IL-4 і IL-10 – у 4,4–16,45 рази ( $p \leq 0,005$ ). КГ у носіїв ТТ-генотипу гена IL-4 проходить зі збільшенням TNF- $\alpha$  в 1,69 рази ( $p = 0,033$ ) і IL-4 (35,71) ( $p < 0,001$ ), низькими рівнями IL-10 та IL-13. Натомість у носіїв мутаційного 35delG-генотипу гена CJB2 КГ асоціює зі зниженням продукції TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 на тлі збереженого рівня синтезу IL-13.

**Висновки.** НСГ у дітей-носіїв Т-алеля характеризується зниженням активності факторів неспецифічного протиінфекційного імунного захисту. КГ проходить з активацією як клітинної (переважно), так і гуморальної (менше) ланки імунної відповіді.

**Ключові слова:** нейросенсорна, кондуктивна глухота, діти, цитокіни, гени CJB2, IL-4.



**Резюме**

**О. Н. Ифтода,**  
**Л. П. Сидорчук,**  
 Буковинский государственный  
 медицинский университет,  
 Театральная площадь, 2,  
 г. Черновцы, Украина, 58000

**ЦИТОКИНОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У ДЕТЕЙ БУКОВИНЫ С ГЛУХОТОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ КОННЕКСИНА-26 CJB2 (RS80338939) И ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 (RS2243250)**

**Цель** – исследовать отдельные звенья иммунологических механизмов нейросенсорной (НСГ) и кондуктивной (КГ) глухоты у детей по уровням про- и противовоспалительных цитокинов в зависимости от полиморфизма генов коннексина-26 (CJB2, с.35delG)(rs80338939) и интерлейкина-4 (IL-4, С-590Т) (rs2243250).

**Методы исследования.** Этап скрининга прошли 102 ребенка (8–18 лет): 68 (66,7 %) детей с НСГ, 34 (33,3 %) – с КГ. Группу контроля составили 30 практически здоровых лиц. Уровни цитокинов: фактора некроза опухолей альфа (TNF-α), IL-1β, IL-4, IL-10 и IL-13, определяли в плазме крови иммуноферментным методом. Исследование полиморфизма генов IL-4 (С-590Т) и CJB2 (с.35delG) выполняли методом ПЦР.

**Результаты.** Развитие НСГ и КГ у детей ассоциирует со снижением концентрации IL-1β, увеличением IL-4 в 1,69 ( $p < 0,05$ ) и 2,68 раза ( $p = 0,013$ ) и разнонаправленными изменениями содержания TNFα (возрастает у детей с КГ, уменьшается – при НСГ), IL-10 и IL-13 (наоборот возрастает у детей с НСГ и уменьшается – при КГ). Дисбаланс иммунного ответа у детей с НСГ характеризуется угнетением клеточного иммунитета с активацией гуморального, обусловленной низким содержанием TNF-α и IL-1β у носителей СТ-, ТТ-генотипов гена IL-4 в 2,42 ( $p = 0,032$ ) и 2,02 раза ( $p = 0,042$ ) с гиперпродукцией противовоспалительных IL-4 и IL-10 в 4,4–16,45 раза ( $p \leq 0,005$ ). КГ у носителей ТТ-генотипа гена IL-4 протекает с увеличением TNF-α в 1,69 раза ( $p = 0,033$ ) и IL-4 (35,71) ( $p < 0,001$ ), низкими уровнями IL-10 и IL-13. У носителей мутационного 35delG-генотипа гена CJB2 КГ ассоциирует со снижением продукции TNFα, IL-1β, IL-4, IL-10 на фоне сохраненного уровня синтеза IL-13.

**Выводы.** НСГ у детей-носителей Т-аллели характеризуется снижением активности факторов неспецифической противомикробной иммунной защиты. КГ протекает с активацией как клеточного (преимущественно), так и гуморального (меньше) звена иммунитета.

**Ключевые слова:** нейросенсорная, кондуктивная глухота, дети, цитокины, гены CJB2, IL-4.

**Автор, відповідальний за листування:** *lsydorchuk@ukr.net*

**Вступ**

360 мільйонів осіб у світі страждають від тяжкої втрати слуху. Більшість таких осіб живе в країнах із низьким та середнім рівнями доходу. Експерти ВООЗ трактують втрату слуху як інвалідизуючу, коли вона перевищує у вусі, що чує краще 40 дБ у дорослих людей і 30 дБ – у дітей [1; 2]. Втрата слуху може розвиватися з генетичних причин (природжена глухота) чи

набувається як ускладнення під час пологів, деяких інфекційних хвороб, хронічних вухних інфекцій, вживання окремих лікарських засобів (аміноглікозиди, протималарійні засоби тощо), впливу надмірного шуму та старіння. Приблизно кожна третя людина у віці старше 65 років страждає від тяжкої втрати слуху. Найвища поширеність глухоти в цій віковій групі спостерігається на сьогодні в Південній Азії, Тихо-

океанському регіоні Азії та в Африці на південь від Сахари [1; 2]. Половину всіх випадків втрати слуху можна попередити в рамках первинної профілактики. Однак за допомогою слухових апаратів можна задовольнити менше 10 % глобальних потреб. Це свідчить, що зусилля науковців повинні бути спрямовані на пошук можливих спільних закономірностей та механізмів втрати слуху з метою виділення груп високого ризику, що дасть можливість, на нашу думку, покращити ефективність первинної профілактики.

Щодо генетичних чинників, то близько 100 генів в організмі людини відповідають за формування та функцію органа слуху. Відомо 30 генів, які асоціюють більше чи менше з порушеннями слуху у прелінгвальному періоді та у зрілому віці [2; 3]. Понад 70 % усіх спадкових форм порушення слуху – це несиндромальна глухота, яка може успадковуватися за аутосомно-домінантним, аутосомно-рецесивним, Х-зчепленим, мітохондріальним та змішаним типами. Найбільш тяжкими є аутосомно-рецесивні форми нейросенсорної глухоти (НСГ), що майже виключно пов'язані з кохлеарними дефектами. Більше 50 % аутосомно-рецесивних форм приглухуватості пов'язано з мутаціями в гені коннексину-26 – *CJB2* (gap junction protein, beta 2), локалізованому в ділянці 13q11-q12 [4]. Сімейство коннексинів складає основу щільних контактів між клітинами завитка, відіграючи ключову роль в обміні низькомолекулярними сполуками. Ідентифіковано близько 20 коннексинів. Коннексин-26 – трансмембранний білок, що бере участь в утворенні коннексону, останній забезпечує повноцінний іонний обмін (особливо  $K^+$ ) між сусідніми клітинами завитка, що у свою чергу, сприяє підтриманню локального аудіоomeостазу. Мутації в генах *GJB2* і *GJB6* (13q11-q12), *GJB3* (1p35.1), кодуючи продукцію коннексинів 26, 30, 31, відповідно асоціюють із НСГ. Однак на сьогодні відсутні рекомендації з використання генетично-молекулярних тестів у ранній діагностиці глухоти як у пренатальний, так і післянатальний період. Дискутабельним також є питання впливу спадкових чинників на види та ступені порушення слуху, фенотипічні прояви приглухуватості (глухоти), зміни імунологічної реактивності, психоневрологічний розвиток дитини тощо.

З огляду на вищезазначене метою дослідження стало: дослідити окремі ланки імунологічних механізмів НСГ та кондуктивної глухоти (КГ) у дітей за рівнями про- та протизапальних цитоки-

нів залежно від поліморфізму генів *CJB2* (c.35delG) (rs80338939) та інтерлейкіну-4 (IL-4, C-590T) (rs 2243250).

#### Матеріали і методи дослідження

Дослідження відповідали положенням Конвенції ради Європи про права людини та біомедицину, основним положенням GCP (1996 р.) та Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участі людини. У проспективному дослідженні взяло участь 110 дітей із різними видами глухоти та ступенями приглухуватості. Етап скринінгу пройшли 102 дитини віком від 8 до 18 років, батьки яких підписали інформовану згоду на участь у дослідженні, із подальшим проведенням комплексу анамнестично-клінічних та лабораторно-інструментальних обстежень. Клінічний діагноз НСГ чи КГ встановлювали на підставі даних отоскопії, мовної аудіометрії (розмовної і шепітної мови), тонової аудіометрії (повітряна, кісткова провідність), камертонального дослідження, тимпанометрії, відповідно до діючих вітчизняних протоколів надання медичної допомоги дітям за спеціальністю «Дитяча отоларингологія» [5; 6] та міжнародних рекомендацій [7; 8]. За потреби додатково проводили рентгенографію соскоподібних відростків, навколоносових пазух у двох проекціях та грудної клітки.

Серед обстежених 68 (66,7 %) дітей мали нейросенсорну глухоту, 34 (33,3 %) – кондуктивну. Дівчаток – 31 (30,4 %), хлопчиків – 71 (69,6 %), середній вік – (13,90 ± 3,11) року. Контрольну групу становили 30 практично здорових осіб із відповідним статевим розподілом ( $\chi^2 = 1,38$ ,  $p > 0,05$ ), у яких не було патології слуху та запальних захворювань будь-якої локалізації за останні 6 місяців. За віковим критерієм групи порівняння не відрізнялися ( $p > 0,05$ ).

Для дослідження поліморфізму генів *CJB2* (c.35delG) та інтерлейкіну-4 (IL-4, C-590T) ДНК виділяли із лімфоцитів периферичної венозної крові пацієнтів за допомогою набору реагентів «ДНК-сорб-В» (Росія). ПЛР-реакцію проводили з використанням Таq-ДНК-полімерази та специфічних праймерів для гена *CJB2* (прямого 5'-CTTTTCCAGAGCAAACCGCCC-3' і зворотного 5'-TGCTGGTGGAGTGTGTTGTTAC-3') та IL-4 (прямого 5'-TAAACTTGGGAGAACATGGT-3' і зворотного 5'-TGGGAAAGATAGAGTAATA-3') [9]. Проби для ПЛР-аналізу готували для кожного хворого за допомогою набору «АмпліСенс-200-1» (ФГУН ЦІНІЕ, Росія). «Нижня» суміш



містила 10 мкл праймерів та 2,5 мкл суміші олігонуклеотидів (dNTP-mix). «Верхня» суміш складалась із 10 мкл 5-х ПРЛ-буфера, 2 мкл 50мМ сульфату магнію, 7 мкл деіонізованої води (MiliQ) і 1 мкл Taq-полімерази («Applied Biosystems», США). До складу ПРЛ-буфера входив маркерний барвник ксиленціанол. Ампліфікатор програмували відповідно до температурних режимів приєднання праймерів (відпалювання) до одностричкових ланцюгів ДНК індивідуально для кожного гена. Для дискримінації алелей гена CJB2 використали ендонуклеазу рестрикції MvaI (BstNI) гена IL-4 – AvaII («Thermo Scientific», США). Продукти рестрикції розділяли в горизонтальному електрофорезі у 3 % агарозному гелі, концентрованому 4 мкл броміду етидію 45–60 хв. Отримані фрагменти рестрикції с.35delG-поліморфізму гена CJB2 (для non-35delG алеля: 60-та, 29-та пари нуклеотидів (пн); для 35delG: 89 пн) та С-590Т поліморфізму гена IL-4 (для СС-генотипу: 177, 18 пн; СТ-генотипу: 195, 177, 18 пн; ТТ-генотипу: 195 пн) візуалізували за допомогою транслюмінатора за наявності маркера молекулярних мас 50–1000 пн («СибЕнзим», Росія).

Рівні цитокінів: фактора некрозу пухлин альфа (TNF- $\alpha$ ), інтерлейкіну 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-4, IL-10 та IL-13 визначали у плазмі крові, пг/мл, імуноферментним методом (ELISA) із використанням набору реактивів «Вектор Бест» (RU, ISO-сертифікати № 9001, № 13485). Інформативність змін показників цитокінів визначали за ступенем імунологічних порушень (СІП): СІП = (показник хворого/показник здорової особи – 1) x 100 %. За наявності імунодефіциту показник був негативним («-»), знак «+» свідчив про гіперфункцію імунної системи. Значення результату в межах 1–33 % трактували як I ступінь СІП, 34–66,7 % – II ступінь, більше 66,7 % – III ступінь.

Статистичну обробку проводили за допомогою прикладних програм Statistica® 7.0 (StatSoft Inc., США). Достовірність даних для незалежних вибірок вираховували із застосуванням двовибіркового t-критерію *Student* (при розподілі, близькому до нормального) чи U-критерію *Wilcoxon-Mann-Whitney* (при нерівномірному розподілі). Дані наведені у вигляді  $M \pm m$ . Аналіз якісних ознак проводили за критерієм  $\chi^2$  (при частотах менше 5 – точний тест Фішера). Різницю вважали вірогідною при  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження**

Розвиток НСГ і КГ у дітей асоціює зі зниженням концентрації IL-1 $\beta$  у плазмі периферичної венозної крові, збільшенням IL-4 у 1,69 ( $p < 0,05$ ) і 2,68 рази ( $p = 0,013$ ) та різноспрямованими змінами за вмістом TNF $\alpha$  (зростає у дітей із КГ, зменшується – при НСГ), IL-10 і IL-13 (навпаки зростає у дітей із НСГ та зменшується – при КГ) (таблиця 1). Вміст цитокінів вважали низьким (нижній кuartиль контрольної групи): IL-1 $\beta$  менше 23 пг/мл, TNF $\alpha$  –  $\leq 15$  пг/мл, IL-4 –  $\leq 4,95$  пг/мл, IL-10 і IL-13 –  $\leq 15$  пг/мл і  $\leq 28$  пг/мл відповідно; висока концентрація цитокінів (верхній кuartиль контрольної групи): TNF $\alpha$  вище 32 пг/мл, IL-1 $\beta$  –  $\geq 60$  пг/мл, IL-4 –  $\geq 45$  пг/мл, IL-10 і IL-13 –  $\geq 25,96$  пг/мл і  $\geq 38$  пг/мл відповідно. У дітей із НСГ зниження продукції IL-1 $\beta$  і TNF $\alpha$  виявили у 45 (66,18 %) та 36 дітей (52,94 %) на тлі підвищення синтезу протизапальних IL-4 у 32 дітей (47,06 %) та IL-10 – у 36 осіб (52,94 %) і незначного зростання IL-13 – у 28 дітей (41,18 %). У дітей із КГ встановили підвищення прозапального TNF $\alpha$  у 16 осіб (47,06) та протизапального IL-4 – у 12 (35,29 %), при цьому захворювання проходить зі зниженням продукції IL-10 та IL-13 – у 18 (52,94 %) і 34 (34 %) дітей відповідно (таблиця 2).

**Таблиця 1 – Концентрація цитокінів у плазмі крові дітей із втратою слуху,  $M \pm S. D.$**

Показник	Контроль	Нейросенсорна глухота, приглухуватість	СІП	Кондуктивна глухота, приглухуватість	СІП
IL-1 $\beta$ , пг/мл	33,22 $\pm$ 7,91	21,24 $\pm$ 4,23	–II	23,41 $\pm$ 5,31	–I
TNF $\alpha$ , пг/мл	29,01 $\pm$ 6,38	22,85 $\pm$ 6,56	–I	38,38 $\pm$ 5,98; $p_1 = 0,048$	+I
IL-4, пг/мл	24,61 $\pm$ 7,25	41,56 $\pm$ 7,95; $p < 0,05$	+III	65,88 $\pm$ 14,28; $p = 0,013$ ; $p_1 = 0,037$	+III
IL-10, пг/мл	22,57 $\pm$ 7,36	40,21 $\pm$ 9,33	+III	14,37 $\pm$ 3,49; $p_1 = 0,031$	–II
IL-13, пг/мл	30,45 $\pm$ 4,82	32,52 $\pm$ 6,06	+I	14,37 $\pm$ 2,11; $p < 0,001$ ; $p_1 = 0,018$	–II

Примітка: СІП – ступінь імунних порушень;  $p$  – вірогідність різниць із практично здоровими;  $p_1$  – вірогідність різниць із дітьми, хворими на нейросенсорну глухоту



**Таблиця 2 – Рівні продукції цитокінів у дітей із порушенням слуху**

Показник		Практично здорові діти	Низька продукція, n (%)	Висока продукція, n (%)	Нормальна продукція, n (%)
IL-1β, пг/мл	НСГ, n	33,22 ± 7,91	45 (66,18)	4 (5,88)	19 (27,94)
	КГ, n		20 (58,82)	4 (11,76)	10 (29,41)
TNFα, пг/мл	НСГ, n	29,01 ± 6,38	36 (52,94)	16 (23,53)	16 (23,53)
	КГ, n		12 (35,29)	16 (47,06)	6 (17,65)
IL-4, пг/мл	НСГ, n	24,61 ± 7,25	8 (11,76)	32 (47,06)	28 (41,18)
	КГ, n		8 (23,53)	12 (35,29)	14 (41,18)
IL-10, пг/мл	НСГ, n	22,57 ± 7,36	11 (16,18)	36 (52,94)	21 (30,88)
	КГ, n		18 (52,94)	0	16 (47,06)
IL-13, пг/мл	НСГ, n	30,45 ± 4,82	16 (23,53)	28 (41,18)	24 (35,29)
	КГ, n		34 (100,0)	0	0

Примітка: НСГ – нейросенсорна глухота; КГ – кондуктивна глухота

Для визначення ролі генетичної складової у зміні продукції цитокінів провели аналіз їх вмісту з урахуванням генотипів простого SNPs гена IL-4 (C-590T) та гена конексину-26 CJB2 (c.35delG) у дітей із НСГ (таблиця 3) та КГ (таблиця 4). Серед дітей із НСГ вірогідною нижчу продукцію прозапальних IL-1β та TNFα встановили у носіїв СТ- та ТТ-генотипів гена IL-4, ніж у гомозиготних носіїв С-алеля, у 2,42

( $p = 0,032$ ) і 2,02 рази ( $p = 0,042$ ) на тлі зростання синтезу протизапальних IL-4 та IL-10 цитокінів: для СТ-генотипу – у 6,82 ( $p < 0,001$ ) і 4,4 ( $p = 0,005$ ) рази, для ТТ-генотипу – у 16,45 ( $p < 0,001$ ) і 6,43 ( $p = 0,001$ ) рази відповідно. Вірогідних відмінностей у продукції цитокінів залежно від алельного стану гена CJB2 у дітей із НСГ не встановили.

**Таблиця 3 – Цитокиновий каскад у дітей із нейросенсорною втратою слуху залежно від поліморфізму генів GJB2 (c.36delG) та IL-4 (C-590T), M ± S. D.**

Показник	Контроль	Ген GJB2		Ген IL-4		
		Non-del	35delG	CC	СТ	ТТ
IL-1β, пг/мл	33,22 ± 7,91	18,62 ± 5,22; $p = 0,056$	23,68 ± 5,11	28,04 ± 6,52	13,75 ± 4,74; $p = 0,032$ , $p_1 = 0,045$	24,0 ± 2,12; $p_2 = 0,043$
TNFα, пг/мл	29,01 ± 6,38	23,50 ± 5,70	22,25 ± 6,94	23,29 ± 6,29	24,54 ± 7,24	14,33 ± 3,56; $p = 0,042$
IL-4, пг/мл	24,61 ± 7,25	33,49 ± 8,06	33,82 ± 8,76	6,28 ± 2,35; $p = 0,02$	42,85 ± 6,86; $p = 0,047$ , $p_1 < 0,001$	103,33 ± 7,72; $p - p_2 < 0,001$
IL-10, пг/мл	22,57 ± 7,36	36,85 ± 5,80	31,46 ± 9,38	11,04 ± 4,38	48,58 ± 9,58; $p = 0,036$ , $p_1 = 0,005$	71,0 ± 13,93; $p = 0,004$ , $p_1 = 0,001$
IL-13, пг/мл	30,45 ± 4,82	37,15 ± 4,76	28,21 ± 4,11	26,83 ± 5,60	39,75 ± 7,24	26,33 ± 4,55

Примітка:  $p$  – вірогідність різниць із практично здоровими;  $p_1$  – вірогідність різниць із носіями Non-del-алеля гена GJB2 та CC-генотипу гена IL-4;  $p_2$  – вірогідність різниць із носіями СТ-генотипу гена IL-4

Однак у хворих на КГ виявили навпаки вагоме збільшення TNFα за ТТ-генотипом, ніж у групі контролю та таких із НСГ у 1,69 ( $p = 0,033$ ) і 3,42 рази ( $p_{НСГ} = 0,014$ ). На цьому фоні IL-4 теж зріс, особливо у носіїв ТТ-генотипу, ніж у носіїв С-алеля у 35,71 і 3,84

рази ( $p < 0,001$ ), але його вміст був вагомо нижчим саме у дітей із С-алелем і КГ, ніж у таких із НСГ – у 2,24 ( $p_{НСГ} = 0,013$ ) і 1,64 ( $p_{НСГ} = 0,051$ ) рази. При цьому встановили значне зниження синтезу IL-10 та, особливо, IL-13, ніж у хворих на НСГ (IL-10 – у 3,11 ( $p_{НСГ} = 0,01$ ) і 4,44



( $p_{НСГ} = 0,007$ ) раз; ІL-13 – у 1,66 ( $p_{НСГ} = 0,026$ ), 2,72 ( $p_{НСГ} = 0,009$ ) і 2,39 ( $p_{НСГ} = 0,016$ ) раз відповідно та у групі контролю (у 1,88–2,77 раз ( $p \leq 0,008–0,004$ )), яке не мало залежності від генотипів гена ІL-4.

Стосовно гена GJB2, то у дітей, хворих на КГ із мутаційним 35delG-генотипом (таблиця 4), рівень продукції всіх цитокінів як прозапальних (TNF $\alpha$ , ІL-1 $\beta$ ), так і протизапальних (ІL-4, ІL-10) був вірогідно нижчим, ніж у дітей без відсутно-

сті делеції функціональної зони (у 1,81–3,79 раз,  $p < 0,05$ ) та у таких із нейросенсорними формами порушення слуху (для ІL-4 – у 5,2 раз ( $p_{НСГ} = 0,005$ ), для ІL-10 – у 2,52 ( $p_{НСГ} = 0,046$ ) раз) і засвідчував вагоме зниження як клітинної, так і гуморальної ланки імунної відповіді на запалення при збільшеному ризику алергічних реакцій (зростання вмісту ІL-13, який сприяє продукуванню плазмоцитами Ig і переключенню синтезу антитіл на IgE).

**Таблиця 4 – Цитокиновий каскад у дітей із кондуктивною втратою слуху залежно від поліморфізму генів GJB2 (с.36delG) та ІL-4 (С-590Т), М  $\pm$  S. D.**

Показник	Контроль	Ген GJB2		Ген ІL-4		
		Non-del	35delG	CC	CT	TT
ІL-1 $\beta$ , пг/мл	33,22 $\pm$ 7,91	22,42 $\pm$ 8,33	11,50 $\pm$ 3,67; $p = 0,019$	25,40 $\pm$ 5,87	24,81 $\pm$ 4,92	20,50 $\pm$ 1,85
TNF $\alpha$ , пг/мл	29,01 $\pm$ 6,38	39,63 $\pm$ 9,49	12,50 $\pm$ 4,21; $p = 0,039$ , $p_1 = 0,014$	35,20 $\pm$ 8,34	20,12 $\pm$ 6,41	49,0 $\pm$ 6,30; $p = 0,033$ , $p_2 = 0,012$ , $p_{НСГ} = 0,014$
ІL-4, пг/мл	24,61 $\pm$ 7,25	31,87 $\pm$ 9,57	6,50 $\pm$ 2,31; $p = 0,024$ , $p_1 = 0,015$ , $p_{НСГ} = 0,005$	2,80 $\pm$ 0,51; $p < 0,001$ , $p_{НСГ} = 0,013$	26,06 $\pm$ 6,48; $p_1 = 0,008$ , $p_{НСГ} = 0,051$	100,0 $\pm$ 8,16; $p-p_2 < 0,001$
ІL-10, пг/мл	22,57 $\pm$ 7,36	13,50 $\pm$ 2,72; $p_{НСГ} = 0,007$	12,50 $\pm$ 2,04; $p_{НСГ} = 0,046$	12,60 $\pm$ 2,46	15,62 $\pm$ 3,29; $p_{НСГ} = 0,01$	16,0 $\pm$ 0,82; $p_{НСГ} = 0,007$
ІL-13, пг/мл	30,45 $\pm$ 4,82	13,42 $\pm$ 2,35; $p = 0,011$ , $p_{НСГ} = 0,003$	24,0 $\pm$ 5,71	16,20 $\pm$ 1,58; $p = 0,008$ , $p_{НСГ} = 0,026$	14,62 $\pm$ 1,97; $p = 0,004$ , $p_{НСГ} = 0,009$	11,0 $\pm$ 2,71; $p = 0,008$ , $p_{НСГ} = 0,016$

Примітка:  $p$  – вірогідність різниць із практично здоровими;  $p_1$  – вірогідність різниць із носіями Non-del алеля гена GJB2 та CC-генотипу гена ІL-4;  $p_2$  – вірогідність різниць із носіями CT-генотипу гена ІL-4;  $p_{НСГ}$  – вірогідність різниць показників із дітьми з нейросенсорною глухотою за відповідним генотипом (таблиця 3)

Необхідно зауважити, що у дітей із НСГ спостерігали частіше супутні хронічні необструктивні та обструктивні захворювання верхніх і нижніх дихальних шляхів, ніж у таких із КГ: 86,76 % проти 44,12 % ( $\chi^2 = 18,89$ ,  $p < 0,001$ ); за НСГ частіше виявляли супутню патологію шлунково-кишкового тракту, розлади ендокринної системи та вестибулярні, патологію центральної і периферичної нервової системи.

**Обговорення результатів**

Дані, які ми одержали, засвідчують, що розвиток НСГ у дітей асоціює зі зниженням концентрації TNF $\alpha$ , останнє свідчить про меншу активність Т-лімфоцитів-хелперів типу 1 (Th1) і знижену функцію макрофагів (пригнічення клітинного типу відповіді), що зумовило і низьку продукцію ІL-1 $\beta$ . У свою чергу, ІL-1 $\beta$  як фактор активації, росту і дозрівання Т- і

В-лімфоцитів, НК-клітин, фібробластів, клітин ендотелію, взаємодіючи з Т-лімфоцитами-хелперами 2-го типу (Th2), індукуює синтез ІL-3, ІL-4, ІL-5, ІL-6, ІL-8, ІF- $\gamma$ , експресію рецепторів ІL-2, підвищує секрецію антитіл В-лімфоцитами, викликає хемотаксис макрофагів, нейтрофілів, сприяє їх міграції через ендотелій судин у вогнище запалення, де активує синтез цитокінів, простагландинів, колагену і фібронектину, білків гострої фази (С-реактивного, манозозв'язувального та ін.), виявляє пірогенну дію [10-13]. Натомість, ми встановили компенсаторне підвищення альтернативними шляхами вмісту ІL-4 – фактора росту В-лімфоцитів-1 (виділяється в основному Th2-клітинами) та ІL-10 (відомого як інгібітор активності Th1 клітин), без вагомих змін за вмістом ІL-13 у плазмі (переважно продукт Th2). Аналіз літератури засвідчує, що ІL-4 і



IL-10 сприяють розвитку гуморальної відповіді, стимулюючи В-лімфоцити, опасисті клітини і, натомість, інгібує клітинну імунну відповідь через пригнічення антигенпрезентуючої та ефекторної функцій макрофагів, зниження проліферації Т-клітин і продукції цитокінів [14; 15]. IL-13 стимулює ріст В-клітин, але інгібує диференціювання Th1 з відхиленням у бік утворення Th2; пригнічує макрофагальну відповідь і синтез макрофагами прозапальних цитокінів (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) та IL-2, що ми і спостерігали в наших дослідженнях. Також IL-13 сприяє продукуванню плазмочитами Ig і переключенню синтезу антитіл на IgE [10; 15]. Вищезазначені зміни у цитокіновому каскаді частково пояснюють часту супутню патологію верхніх та нижніх дихальних шляхів, розлади ендокринної системи у дітей із НСГ, що є свідченням недостатньої сили клітинної імунної відповіді для елімінації патогену, збільшує ризик бактеріальних ускладнень чи первинно хронічний перебіг будь-якого супутнього інфекційного захворювання та можливу появу алергічних реакцій.

#### Висновки

Дисбаланс імунної відповіді у дітей із нейросенсорною глухотою характеризується пригніченням клітинної ланки імунітету Th1 із активацією гуморальної Th2, спадково зумовленою низькою продукцією TNF- $\alpha$  та IL-1 $\beta$ , у носіїв СТ-, ТТ-генотипів гена IL-4 із гіперпродукцією протизапальних цитокінів IL-4 і IL-10, що свідчить про знижену активність факторів неспецифічного протиінфекційного імунного захисту та підвищену реактивність організму.

Кондуктивна глухота у дітей проходить з активацією як клітинної (переважно), так і гуморальної (менше) ланки імунної відповіді

#### Перспективи подальшого дослідження

Планується провести аналіз імунологічних змін у дітей із різними видами глухоти залежно

у наших дослідженнях перебіг КГ у дітей асоціює зі збільшенням продукції TNF- $\alpha$  (у носіїв ТТ-генотипу гена IL-4), що, однак, було недостатньо для стимуляції синтезу IL-1 $\beta$ , але викликало пряму компенсаторну гіперпродукцію IL-4 (у власників ТТ-генотипу гена IL-4) як протизапального цитокіна ранньої імунної відповіді для інгібіції клітинної ланки імунітету на тлі ще низької продукції IL-10 та IL-13, що засвідчує наявність гострозапального процесу переважно інфекційної природи із активацією клітинної (переважно) та гуморальної (менше) ланки імунної відповіді (у гомозиготних носіїв Т-алеля гена IL-4). Натомість пригнічення продукції як прозапальних (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), так і протизапальних (IL-4, IL-10) цитокінів на тлі збереженого рівня синтезу IL-13 у хворих на КГ носіїв мутаційного 35delG-генотипу гена CJB2 свідчить про зниження активності у цих дітей як клітинної, так і гуморальної ланки імунної відповіді і збільшену ймовірність переключення синтезу антитіл на IgE, що підвищує ризик алергічних реакцій.

зі збільшеним синтезом TNF- $\alpha$  і компенсаторною гіперпродукцією протизапального IL-4 (у носіїв ТТ-генотипу гена IL-4), низькими рівнями IL-10 та IL-13, що загалом є свідченням гострозапального процесу переважно інфекційної природи. Натомість у носіїв мутаційного 35delG-генотипу гена CJB2 кондуктивна глухота асоціює зі зниженням активності клітинної і гуморальної ланок імунітету та підвищеною ймовірністю алергічних реакцій (пригнічення продукції прозапальних (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) та протизапальних (IL-4, IL-10) цитокінів на тлі збереженого рівня синтезу IL-13).

від гаплотипів генів CJB2 (rs80338939) та IL-4 (rs 2243250).

#### References (список літератури)

1. WHO. Press release 1.1 billion people at risk of hearing loss. Media centre. 2015. Retrieved from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/ear-care/en/>.
2. Smith RJH, Shearer AE, Hildebrand MS. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, eds. GeneReviews® [Internet]. University of Washington, Seattle (WA), 2015. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1434/>
3. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M. High carrier fre-





- quency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J of Human Genetics*. 2000;8(1):19-23.
4. GJB2 gap junction protein beta 2 [ Homo sapiens (human) ]. Gene ID: 2706, updated on 3-Jan-2016 [Electronic resource]. Bethesda: National Institute of Health, USA, 2016. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2706>.
  5. Ministry of Health of Ukraine Order №181 dated 21.04.2005 ["Clinical protocol of children's care on a specialty "Children's otolaryngology"]. Kyiv: Ministry of Health of Ukraine Publ., 2005. Retrieved from: <http://medstandart.net/browse/1877>. 2015. (Order In Ukrainian).
  6. Ministry of Health of Ukraine Order №449 dated 25.06.2009 ["On amending to the order of Ministry of Health dated 21.04.05 №181" Protocols of medical care on a specialty "Children's otolaryngology"]. Kyiv: Ministry of Health of Ukraine Publ., 2009. Retrieved from: <http://medstandart.net/byspec/33/page/1>. (Order In Ukrainian).
  7. National Institute on Deafness and Other Communication Disorders. Hearing, Ear Infections, and Deafness. U.S. Department of Health & Human Services. 2015. Retrieved from: [www.nidcd.nih.gov/health/hearing/Pages/Default.aspx](http://www.nidcd.nih.gov/health/hearing/Pages/Default.aspx).
  8. WHO. Guidelines for hearing aids and services for developing countries (2<sup>nd</sup> Edition). Preventing of Blindness and Deafness. WHO Library. 2004. Retrieved from: [http://www.who.int/pbd/deafness/en/hearing\\_aid\\_guide\\_en.pdf](http://www.who.int/pbd/deafness/en/hearing_aid_guide_en.pdf)
  9. Entrez Gene. Sequence analysis 2015. National Center for Biotechnology Information. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
  10. Anthony A Cuneo, Michael V Autier. Expression and Function of Anti-Inflammatory Interleukins: The Other Side of the Vascular Response to Injury. *Curr Vasc Pharmacol* 2009; 7(3):267–276.
  11. Sydorчук A, Sydorчук L, Amosova K, Kushnir O, Biletskiy S, Sydorчук R, et al. Caspases and TNF-alfa in hypertension: response to combination therapy and genes mutations. *J Hypertension*. 2012;30(e-Suppl):367(PP.20.191).
  12. Mfunu Endam L, Cormier C, Bossé Y, Filali-Mouhim A, Desrosiers M. Association of IL1A, IL1B, and TNF gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: a replication study. *Archives of Otolaryngology – Head and Neck Surgery* 2010; 136(2):187–192.
  13. Sydorчук L, Sydorчук R, Sydorчук I. Pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with reactive arthritis, ischemic heart disease and chronic obstructive bronchitis under probiotic treatment. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2004;63(Suppl.1):527.
  14. Irina G Luzina, Achsa D Keegan, Nicola M Heller, Graham AW Rook. Regulation of inflammation by interleukin-4: A review of "alternatives" Regulation of inflammation by interleukin-4: A review of "alternatives". *J of Leukocyte Biology*. 2012;92(4):753-64.
  15. Radbruch A, Lipsky PE (Eds). Current Concept in Autoimmunity and Chronic inflammation. Springer, 2006, 282p.

(received 18.01.2016, published online 28.03.2016)

(одержано 18.01.2016, опубліковано 28.03.2016)

