

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА CCL5 В ОЦЕНКЕ РИСКА РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ У ЖИТЕЛЕЙ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Хотько Е. А., Кадушкин А. Г., Марчук С. И., Мигас А. А., Таганович А. Д.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Хемокины и цитокины, как известно, играют важную роль в привлечении лимфоцитов в очаг воспаления. Изменение концентрации или функциональной активности этих молекул может быть обусловлено наличием однонуклеотидных замен в структуре генов, кодирующих эти белковые образования. В статье представлены результаты исследования полиморфизма rs 2280788 в промоторе гена хемокина CCL5 у 53 пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (далее — ХОБЛ) и 47 здоровых лиц. Частоты аллелей и генотипов полиморфного варианта CCL5 значительно различались в группе пациентов с ХОБЛ и группе контроля. Обнаружено, что носители гетерозиготного генотипа и «мутантной» аллели имеют более высокую вероятность развития ХОБЛ, чем лица, не имеющие мутации в гене CCL5. Также отсутствовали статистически значимые различия в частоте встречаемости гомозиготного «нормального» и гетерозиготного генотипов у курящих и некурящих пациентов с ХОБЛ.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, полиморфизм генов, хемокин CCL5.

Введение. Вопросы, связанные с риском и механизмом развития ХОБЛ, особенностями течения этого заболевания, на сегодняшний день являются одними из наиболее актуальных проблем здравоохранения в стране и мире, о чем свидетельствуют регулярно обновляемые статистические данные. Прогнозируется, что к 2020 г. ХОБЛ станет третьей наиболее распространенной причиной смертности и пятой причиной инвалидности в мире, а в течение жизни 27,6 % людей подвержены риску развития ХОБЛ [2]. Это заболевание наносит существенный экономический и социальный ущерб обществу.

Многочисленные исследования показали, что окислительный стресс, дисбаланс протеаз и антипротеаз, а также развитие воспалительной реакции играют важную роль в патогенезе ХОБЛ [3]. Хорошо известно, что длительное воздействие сигаретного дыма является ведущим экзогенным фактором риска развития заболевания. Интересно, что только у 15–20 % курильщиков развивается ХОБЛ, в то же время 30 % некурящих также имеют этот диагноз [4]. Более того, различия в клинической картине и тяжести течения между расовыми и этническими группами указывают на значительную генетическую предрасположенность к заболеванию [5]. Несмотря на всю сложность молекулярных механизмов патогенеза ХОБЛ поиск генетических маркеров, используемых на ранних этапах диагностики развития заболевания, особенно актуален. Выявление ранних маркеров позволит своевременно проводить необходимые профилактические мероприятия и максимально отдалить развитие тяжелых осложнений у пациентов с ХОБЛ.

Учитывая, что накопление воспалительных иммунных клеток и процессы ремоделирования стенки дыхательных путей являются основными характеристиками течения ХОБЛ, в настоящее время активно ведется поиск маркеров заболевания среди генов цитокинов и их рецепторов на поверхности иммуноком-

петентных клеток. Это обусловлено их участием в формировании воспалительной реакции в легких при этом заболевании. Ранее было обнаружено, что СС-хемокиновый лиганд 5 (CCL5) может участвовать в патогенезе эпителиального ремоделирования и хронической гиперреактивности в ответ на вирусные инфекции [6].

Обострение ХОБЛ связано с повышением синтеза CCL5 как в воспалительных, так и эпителиальных клетках слизистой оболочки бронхов [6]. Наряду с этим обнаружено, что однонуклеотидная замена цитозина (C) на гуанин (G) (-28C>G) в промоторе гена (CCL5) связана с повышением уровня мРНК и увеличением экспрессии этого белка *in vitro* [6].

В литературе отмечено наличие ассоциации между носительством полиморфизма 28C>G (rs 2280788) и риском развития аллергического ринита и бронхиальной астмы у жителей Южной Кореи. При этом, частота встречаемости мутантной аллели -28 G различается в зависимости от этнической принадлежности. Она составляет ~ 15–20 % среди азиатов, включая японцев, китайцев и корейцев, тогда как среди кавказцев и афро-американцев встречаемость аллели очень низкая ($\leq 2\%$) [7]. Полученные результаты вызывают интерес к изучению взаимосвязи носительства этой мутации и предрасположенности к развитию заболевания в популяции белорусов.

Цель работы — выявление ассоциации полиморфного варианта rs 2280788 (28C>G) гена CCL5 с риском развития ХОБЛ у жителей Республики Беларусь.

Материалы и методы. Клинико-функциональное исследование проведено на базе УЗ «Минский консультационно-диагностический центр» МЗ РБ. В исследование было включено 53 пациента с установленным диагнозом «хроническая обструктивная болезнь легких», этнических белорусов, средний возраст которых составил $61,9 \pm 8,7$ года. Диагностика ХОБЛ осуществлялась в соответствии с классификацией GOLD и основывалась на результатах клинического обследования и данных спирометрии. Группу сравнения составили 47 здоровых людей, постоянно проживающих в г. Минске, с нормальным уровнем ОФВ₁ и нормальной величиной отношения ОФВ₁/ФЖЕЛ, не имевших в анамнезе патологии бронхолегочной системы и других хронических заболеваний. От всех обследуемых получено информированное согласие на проведение исследования.

Критериями включения в исследуемую группу являлись: наличие установленного диагноза ХОБЛ (GOLD, 2011), период ремиссии, согласие пациента участвовать в исследовании.

Критерии исключения: наличие бронхиальной астмы, туберкулеза легких и других заболеваний бронхолегочной системы, прием пероральных стероидных препаратов, неспособность правильно выполнить дыхательный маневр при тестировании функции внешнего дыхания.

Для проведения молекулярно-генетического исследования у всех обследуемых из лимфоцитов периферической крови выделяли ДНК с помощью набора NucleoSpinBlood (MACHERY-NAGEL, Германия) согласно методике производителя. Генотипирование проводили методом, основанным на полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с применением набора TaqMan® SNP Genotyping Assays от Applied Biosystems (детектирующий амплификатор BioRadCFX96, «Bio-Rad Laboratories», США). Принцип метода заключается в использовании флуоресцентной детекции на основе разрушаемых олигонуклеотидных зондов.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием пакета статистических программ «Statistica 23.0». Для оценки характера распределения количественных данных в совокупности с учетом размера групп использовали критерии Шапиро–Уилка (при $n \leq 50$) и Колмогорова–Смирнова (при $n > 50$). Во всех случаях распределение признаков соответствовало закону нормального распределения. При сравнении количественных признаков был использован t-критерий Стьюдента для двух независимых выборок. Для проверки однородности дисперсий использовали критерий Левена. Количественные величины представлены в виде средней арифметической (M) \pm стандартная ошибка средней (m).

Анализ отклонения наблюдаемых частот генотипов от равновесия Харди–Вайнберга (HWE) проводили с использованием онлайн-программы «Ген-эксперт». Номинативные (категориальные) переменные сравнивали путем составления таблиц сопряженности и вычисления критерия χ^2 с поправкой на правдоподобие с использованием пакета программ SPSS. Для оценки силы связи между двумя номинальными переменными использовали V-критерий Крамера. Количественную оценку связи носительства аллелей и генотипов гена CCL5 с вероятностью развития ХОБЛ определяли на основании показателей отношения шансов (ОШ). Величину p считали значимой при уровне $< 0,05$ при условии, что значение 95 % доверительного интервала (ДИ) для ОШ не пересекало [1].

Результаты и их обсуждение. Клинико-функциональное исследование показало, что сравниваемые группы статистически значимо различались по возрасту, индексу курения, а также показателям ОФВ₁ и ОФВ₁/ФЖЕЛ, выраженным в процентах. Для проверки гипотезы о равенстве выборок было вычислено двустороннее значение p -критерия, связанное с критерием равенства Левена (F). Поскольку p по критерию

Левена для показателей индекса курения и ОФВ₁/ФЖЕЛ не превышал заданный уровень значимости ($p < 0,05$), то гипотезу о равенстве выборок отвергали, а исследуемые группы считали сопоставимыми по возрасту и величине ОФВ₁ (таблица 1).

Таблица 1. — Клинико-функциональные показатели у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и здоровых лиц

| Показатель | Пациенты с ХОБЛ | Здоровые лица | p | Критерий равенства дисперсий Левена | |
|---------------------------|-----------------|---------------|-------|-------------------------------------|-------|
| | | | | F | p |
| Возраст, годы | 61,9±1,3 | 50,2±2,5 | 0,000 | 0,381 | 0,539 |
| Индекс курения, пачка/лет | 29,9±4,7* | 9,6±3,6 | 0,008 | 4,543 | 0,037 |
| ОФВ ₁ , % | 46,7±2,1 | 99,9±5,4 | 0,000 | 0,145 | 0,705 |
| ОФВ ₁ /ФЖЕЛ, % | 55,5±1,6* | 81,9±1,9 | 0,000 | 4,303 | 0,043 |

* — $p < 0,05$ на основании двустороннего критерия p, связанного с критерием равенства Левена.

Далее было проведено сравнение частот генотипов CCL5 в обследуемых выборках с частотами в генеральной совокупности согласно распределению, рассчитанному по соотношению Харди–Вайнберга (таблицы 2, 3).

Таблица 2. — Распределение генотипов в группе пациентов с ХОБЛ (тест Харди–Вайнберга)

| Генотипы | Пациенты с ХОБЛ, % | HWE, % | χ^2 | p |
|-------------|--------------------|--------|----------|------|
| Генотип C/C | 81,1 | 82,0 | 0,58 | 0,45 |
| Генотип C/G | 18,9 | 17,1 | | |
| Генотип G/G | 0,0 | 0,9 | | |
| Всего | 100,0 | 100,0 | | |

Таблица 3. — Распределение генотипов в группе здоровых лиц (тест Харди–Вайнберга)

| Генотипы | Здоровые лица, % | HWE, % | χ^2 | p |
|-------------|------------------|--------|----------|------|
| Генотип C/C | 97,9 | 97,9 | 0,01 | 0,94 |
| Генотип C/G | 2,1 | 2,1 | | |
| Генотип G/G | 0,0 | 0,0 | | |
| Всего | 100,0 | 100,0 | | |

Наблюдаемые частоты генотипов у здоровых лиц ($\chi^2 = 0,01$; $p = 0,94$) и пациентов с ХОБЛ ($\chi^2 = 0,58$; $p = 0,45$) были сопоставимы с их ожидаемыми частотами в соответствии с равновесием Харди — Вайнберга.

Исследование частот распределения аллелей показало, что «мутантная» аллель G гена CCL5 встречается в группе контроля в 1 % случаев, в группе пациентов с ХОБЛ — в 10 % случаев ($\chi^2 = 7,87$, $p = 0,01$) (таблица 4). Между носительством «мутантной» аллели G и развитием заболевания отмечена слабой силы связь ($V = 0,183$) согласно рекомендациям L. M. Reau, R. A. Parker (таблица 5) [1].

Оценка частот распределения генотипов полиморфизма -28C>G выявила статистически значимое ($p = 0,01$) уменьшение доли "нормального" генотипа C/C у заболевших (81,8 %) по сравнению с аналогичным показателем у здоровых лиц (97,9 %). Сила связи между носительством генотипа и наличием заболевания средняя ($V = 0,267$) (таблица 4).

Помимо изучения частоты полиморфизмов генов была также проведена оценка риска возникновения ХОБЛ в зависимости от наличия мутации указанного гена. Для количественной оценки вероятности исследуемого события рассчитывали показатель отношения шансов (ОШ) и 95 % доверительный интервал (95 % ДИ). ОШ для пациентов с ХОБЛ и группы контроля составило 9,69 при наличии «мутантной» аллели G (95 % ДИ = 1,22–77,18) и 10,7 при наличии гетерозиготного генотипа C/G (95 % ДИ = 1,31–87,12)

(таблица 4). Это свидетельствует о повышенном риске развития ХОБЛ у носителей аллели G или генотипа с аллелью G в 9,69 и 10,7 раза соответственно.

Таблица 4. — Частота аллелей и генотипов полиморфного локуса rs 2280788 гена CCL5 в группе пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц

| Носительство аллелей и генотипа | Пациенты с ХОБЛ, n (%) | Здоровые лица, n (%) | χ^2 | p | V Крамера | ОШ | 95 % ДИ |
|---------------------------------|------------------------|----------------------|----------|------|-----------|------|------------|
| C | 96 (90,6) | 93 (98,9) | 7,87 | 0,01 | 0,183 | 0,10 | 0,01–0,82 |
| G | 10 (9,4) | 1 (1,1) | | | | 9,69 | 1,22–77,18 |
| C/C | 43 (81,8) | 46 (97,9) | 8,29 | 0,01 | 0,267 | 0,09 | 0,01–0,76 |
| C/G | 10 (18,9) | 1 (2,1) | | | | 10,7 | 1,31–87,12 |
| G/G | 0 (0,0) | 0 (0,0) | | | | 0,89 | 0,02–45,63 |

Таблица 5. — Интерпретация значений критерия V Крамера согласно рекомендациям L. M. Reau, R. A. Parker

| Значение V-критерия Крамера | Сила взаимосвязи |
|-----------------------------|----------------------|
| <0,1 | Несущественная |
| 0,1–<0,2 | Слабая |
| 0,2–<0,4 | Средняя |
| 0,4–<0,6 | Относительно сильная |
| 0,6–<0,8 | Сильная |
| 0,8–1,0 | Очень сильная |

В группе пациентов с ХОБЛ был также проведен анализ распределения частот генотипов в зависимости от статуса курения обследуемого. Так, доля курильщиков, имеющих генотип C/C, среди пациентов с ХОБЛ была выше (82,9 %), чем в группе некурящих (75,0 %). Сила связи между фактором риска и носительством мутации оценивалась как несущественная ($V = 0,085$), а различия в частоте встречаемости лиц с «мутантным» и «нормальным» генотипом среди пациентов с ХОБЛ статистически не значимы ($\chi^2 = 0,36$, $p = 0,8$).

Таблица 6. — Частота аллелей и генотипов полиморфного локуса rs 2280788 гена CCL5 в группе пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц в зависимости от статуса курения

| Носительство генотипа | Курящие пациенты с ХОБЛ, n (%) | Некурящие пациенты с ХОБЛ, n (%) | χ^2 | p | V Крамера | ОШ | 95 % ДИ |
|-----------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------|------|-----------|------|-----------|
| C/C | 34 (82,9) | 8 (45,0) | 0,36 | 0,58 | 0,085 | 1,62 | 0,35–7,55 |
| C/G | 7 (17,1) | 3 (25,0) | | | | 0,62 | 0,13–2,88 |

Заключение. Таким образом, на основании полученных результатов можно сформулировать следующие выводы:

1. Результаты исследования показали, что изученный полиморфный локус -28 C>G гена CCL5 может вносить вклад в предрасположенность к развитию хронической обструктивной болезни легких у белорусов.
2. При наличии мутантной аллели G гена CCL5 риск развития ХОБЛ увеличивается в 9,69 раза.
3. У носителей гетерозиготного генотипа C/G гена CCL5 риск развития ХОБЛ увеличен в 10,7 раза.
4. Курение не имеет связи с носительством нормального или мутантного генотипов CCL5 у пациентов с ХОБЛ.

Литература

1. Гржибовский, А. М. Анализ номинальных данных (независимые наблюдения) / А. М. Гржибовский // Экология человека. — 2008. — № 6. — С. 58–68.
2. Lifetime risk of developing chronic obstructive pulmonary disease: a longitudinal population study / A. S. Gershon [et al.] // Lancet. — 2011. — Vol. 378, № 9795. — P. 991–996.

3. Barnes, P. J. Systemic manifestations and comorbidities of COPD / P. J. Barnes, B. R. Celli // Eur. Respir. J. — 2009. — Vol. 33, № 5. — P. 1165–1185.
4. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease / M. D. Eisner [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2010. — Vol. 182, № 5. — P. 693–718.
5. Gene polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease / X. Wu [et al.] // J. Cell. Mol. Med. — 2014. — Vol. 18, № 1. — P. 15–26.
6. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression / H. Liu // Proc. Natl. Acad. Science USA. — 1999. — Vol. 96, № 8. — P. 4581–4585.
7. Functional single nucleotide polymorphisms of the CCL5 gene and nonemphysematous phenotype in COPD patients / N. Hizawa [et al.] // Eur. Respir. J. — 2008. — Vol. 32, № 2. — P. 372–378.

ASSOCIATION BETWEEN CCL5 GENE POLYMORPHISM AND RISK OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE IN BELARUSIAN POPULATION

Khotko E. A., Kadushkin A. H., Marchuk S. I., Migas A. A., Taganovich A. D.

Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus

Chemokines and cytokines are known to play an important role in the attracting lymphocytes to the area of inflammation. Changes of their concentration or functional activity may depend on single nucleotide polymorphism in genes, which encoding these proteins. Hence, in the present study, we investigated whether the rs 2280788 polymorphism in the promoter region of CCL5 gene is associated with the risk of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Polymorphism was studied in 53 COPD patients and 47 healthy controls. Allele and genotype frequencies of the promoter rs2280788 polymorphism were significantly different between patients with COPD and control subjects. It was found that the patients with heterozygous genotype or mutant allele of the CCL5 gene have higher risk of COPD. We have reviewed the association between CCL5 gene polymorphism and smoking status. There was no significant difference in frequency of genotypes between smokers and non-smokers.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, gene polymorphisms, chemokine CCL5.