

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ХЕМОКИНОВ CCL5 И CXCL10 ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»²

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – это неизлечимое и быстро прогрессирующее заболевание, характеризующееся необратимым ограничением воздушного потока. Патогенез ХОБЛ сложен и характеризуется миграцией иммунокомпетентных клеток в очаг воспаления. Основными белками, участвующими в привлечении воспалительных клеток, являются хемокины. Целью данного исследования было определение ассоциации полиморфных вариантов генов CCL5 и CXCL10 с восприимчивостью к ХОБЛ у жителей Республики Беларусь. Для определения взаимосвязи между полиморфизмами CXCL10 (rs4508917), CCL5 (rs2280788) и развитием ХОБЛ было проанализировано 74 пациента с ХОБЛ и 70 здоровых лиц. Распределение частот генотипов CXCL10 не отличалось в группе здоровых лиц и пациентов с ХОБЛ ($p = 0,25$). Носительство различных аллелей и генотипов полиморфизма rs2280788 гена CCL5 значительно отличалось между пациентами с ХОБЛ и здоровыми индивидуумами ($p = 0,008$ и $p = 0,02$ соответственно). Частота генотипа C/G гена CCL5 выше в контрольной группе, чем у пациентов с ХОБЛ (18,9 % против 4,3 %). Гетерозиготное носительство rs2280788 увеличивает риск развития ХОБЛ в 5,26 раза (95 % ДИ: 1,43–19,02). В заключение, полиморфизм rs2280788 CCL5 может быть использован для прогнозирования предрасположенности к ХОБЛ и выбора эффективной профилактики заболевания в группах риска.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, полиморфизм генов, хемокин CCL5, хемокин CXCL10.

E. A. Khot'ko, A. A. Migas, A.G. Kadushkin, A. D. Taganovich

ALLELIC POLYMORPHISM OF GENES OF CHEMOKINES CCR5 AND CXCL10 IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a disease characterized by airflow limitation. It is not completely reversible and shows progressive development. The pathogenesis of COPD is a multifactorial process including migration of the inflammatory cells to the lung. Chemokines are proteins mainly involved in the recruitment inflammatory cells. The aim of this study was to determine the association of CCL5 and CXCL10 gene variants and COPD susceptibility in the population of Republic of Belarus. The association between CXCL10 (rs4508917), CCL5 (rs2280788) and COPD were analyzed in 74 COPD patients and 70 control subjects. The distribution of CXCL10 genotypes did not vary between healthy and COPD patients ($p = 0.25$). The genotype and allele distributions of CCL5 were differed significantly in COPD patients and controls ($p = 0.008$ and $p = 0,02$ respectively, χ^2 test). The frequency of genotype C/G was higher in the control group than in COPD patients (18.9 % vs. 4.3 %). Heterozygous carrier state of CCL5 indicates 5,26-fold higher risk of COPD (95 %CI: 1.43-19.02). In conclusion the rs2280788 genotype variant of CCL5 contributes to the prediction of COPD and may be used for the choice of the effective disease prevention.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, gene polymorphisms, chemokine CCL5, chemokine CXCL10.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является неизлечимым и неуклонно прогрессирующим заболеванием, для которого характерны затрудненное дыхание вследствие необратимой обструкции дыхательных путей, кашель с выделением мокроты и одышка – основные симптомы развития эмфиземы легких и хронического бронхита. В настоящее время в мире насчитывается более 251 млн человек, страдающих этим заболеванием [10].

Несмотря на то, что воздействие сигаретного дыма признано основным экзогенным фактором риска развития ХОБЛ, не у всех курильщиков возникает заболевание, а степень снижения функциональной способности легких не зависит от статуса курения.

В 2013 г. J. Zhou с коллегами впервые выдвинули предположение, что генетические факторы играют первостепенную роль в развитии ХОБЛ [6]. В результате полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) был определен регион ДНК, изменения в структуре которого связаны с возникновением данной патологии [2]. Установлено, что наличие мутаций в гене SERPINA1 приводит к дефициту α_1 -антитрипсина – белка, ответственного за развитие эмфиземы легких при этом заболевании [2].

В настоящее время активно ведется поиск других генетических маркеров. В качестве возможных кандидатов выступают гены хемокинов и их рецепторов. Хемокины взаимодействуют с рецепторами на поверхности иммунокомпетентных клеток (лимфоцитов, моноцитов и др.), привлекая их к месту формирования воспалительного ответа,

и тем самым принимают активное участие в развитии, течении и исходе заболевания.

Так, хемокин CXCL10, также известный как интерферон-гамма-индуцированный белок 10 (IP-10), связывается с рецептором CXCR3 и привлекает в очаг воспаления в легких CD8⁺ Т-лимфоциты и моноциты, регулируя взаимодействие между этими клетками. Обнаружено, что воспалительные заболевания легких, включая ХОБЛ, характеризуются увеличением уровня CXCL10 в крови пациентов [8]. Значительно более высокий уровень CXCL10 в плазме крови отмечен у пациентов, имеющих однонуклеотидную замену (-1447A > G) аденина (A) на гуанин (G) в промоторной области гена CXCL10 [4]. Частота встречаемости минорной аллели G полиморфизма -1447A > G (rs4508917) гена CXCL10 различается в зависимости от этнической принадлежности. Среди жителей Восточной Азии она составляет ~50 %, тогда как среди европейцев и африканцев встречаемость аллели значительно ниже (~20 %).

Хемокин CCL5 экспрессируется эпителиальными клетками бронхов и также регулирует миграцию лейкоцитов в результате взаимодействия с рецепторами CCR5 на поверхности этих клеток. Показано, что количество CCL5 в подслизистом слое бронхов в 2–15 раз выше, чем других хемокинов при ХОБЛ [3]. У пациентов с тяжелым течением ХОБЛ также отмечается возрастание мРНК CCL5 в бронхиальном биоптате [3]. Среди возможных причин измененного синтеза хемокина CCL5 отмечают носительство полиморфизма -28C > G в промоторе гена. Экспериментально показано, что одно-

нуклеотидная замена цитозина (С) на гуанин (G) (-28С > G) связана с увеличением экспрессии этого белка *in vitro* [7]. Встречаемость минорной аллели С полиморфизма 28С > G (rs2280788) гена **CCL5**, так же, как и большинства других однонуклеотидных замен, варьирует среди лиц различных этнических популяций. Так, среди африканцев аллель С встречается лишь в 0,3 % случаев, в то время как у жителей Европы и Восточной Азии в ~3 % и ~11 % случаев соответственно.

Приведенные данные литературы наводят на мысль о том, что определение мутаций генов хемокинов и их рецепторов, носительство которых связано с более высоким риском развития ХОБЛ, может помочь в выявлении пациентов, нуждающихся в проведении целенаправленной профилактики. Поэтому нами было предпринято исследование, в ходе которого изучалась взаимосвязь носительства вышеназванных полиморфизмов с предрасположенностью к развитию ХОБЛ у пациентов – жителей Республики Беларусь.

Материалы и методы

Проведено клиничко-функциональное исследование 74 пациентов с установленным диагнозом «хроническая обструктивная болезнь легких», постоянно проживающих на территории Республики Беларусь, средний возраст которых составил 62 года. Контрольная группа сформирована из здоровых лиц, коренных жителей Беларуси, не являющихся родственниками, с нормальным уровнем $ОФВ_1$ и нормальной величиной отношения $ОФВ_1/ФЖЕЛ$, не имевших в анамнезе патологии бронхолегочной системы и других хронических заболеваний и соответствующих выборке пациентов с ХОБЛ по возрасту, полу и этнической принадлежности (70 человек) (таблица 1).

Таблица 1. Характеристика пациентов обследуемых групп

Характеристика	Пациенты с ХОБЛ (n = 74)	Здоровые лица (n = 70)
Возраст, лет	62,0 (53,0–71,0)	50,0 (47,0–52,0)
Пол (м/ж)	62/12	50/20
Индекс курения (пачек/лет)	38 (25–51)	21 (12–30)
$ОФВ_1$, %	45,5 (39,0–52,0)	100,0 (88,0–112,0)
$ОФВ_1/ФЖЕЛ$	55,0 (47,0–63,0)	84,0 (81,0–87,0)

Критериями включения в исследуемую группу являлись отсутствие обострений в течение 2 месяцев до включения в исследование и информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями исключения были наличие у пациентов бронхиальной астмы, туберкулеза легких и других заболеваний бронхолегочной системы, неспособность правильно выполнить дыхательный маневр при тестировании функции внешнего дыхания.

У испытуемых проводили забор венозной крови из локтевой вены в объеме 10–15 мл с целью экстракции ДНК. Выделение ДНК производили с помощью набора NucleoSpin Blood (MACHEREY-NAGEL, Германия) согласно методике производителя. Для дальнейшего генотипирования применяли метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием локус-специфических олигонуклеотидных праймеров с флуоресцентными метками.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием пакета статистических программ SPSS 23.0. Для сравнения количественных данных использовали **t-критерий Стьюдента** в случае их соответствия нормальному распределению. К признакам, имеющим распределение, отличное от нормального, применяли непараметрические методы (U-критерий Манна-Уитни).

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 изучаемыми признаками использовали критерий ϕ (фи) для четырехпольных таблиц и критерий V Крамера для многопольных таблиц. Интерпретацию полученных значений критериев ϕ и V Крамера производили согласно рекомендациям **L. M. Rea и R. A. Parker [1]. Количественную оценку вероятности развития ХОБЛ при носительстве аллелей и генотипов генов CCL5 и CXCL10 определяли на основании показателей отношения шансов (ОШ). Величину p считали значимой при уровне < 0,05 при условии, что значение 95 % доверительного интервала (ДИ) для отношения шансов не пересекали 1 [1].**

Результаты и обсуждение

Проведение клиничко-функционального исследования показало, что пациенты с ХОБЛ и группа здоровых лиц статистически значимо различались по индексу курения, показателям $ОФВ_1$ и $ОФВ_1/ФЖЕЛ$ и были сопоставимы по полу и возрасту.

Для каждого однонуклеотидного полиморфизма было проверено равновесие Харди-Вайнберга (HWE)

Таблица 2. Распределение генотипов в группе пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц гена CCL5 (тест Харди-Вайнберга)

Генотипы CCL5	Равновесие для «опытной» группы				Равновесие для «контрольной» группы			
	пациенты с ХОБЛ, %	HWE, %	χ^2	p	здоровые лица, %	HWE, %	χ^2	p
C/C	81,1	82,0	0,81	0,37	95,7	95,8	0,03	0,85
C/G	18,9	17,1			4,3	4,2		
G/G	0,0	0,9			0,0	0,0		
Всего	100,0	100,0			100,0	100,0		

Таблица 3. Распределение генотипов в группе пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц гена CXCL10 (тест Харди-Вайнберга)

Генотипы CXCL10	Равновесие для «опытной» группы				Равновесие для «контрольной» группы			
	пациенты с ХОБЛ, %	HWE, %	χ^2	p	здоровые лица, %	HWE, %	χ^2	p
A/A	36,5	39,5	1,22	0,27	50,0	51,0	0,18	0,68
A/G	52,7	46,7			42,9	40,8		
G/G	10,8	13,8			7,1	8,2		
Всего	100,0	100,0			100,0	100,0		

для оценки его генетического баланса в изучаемых группах. Наблюдаемые частоты генотипов у здоровых лиц и пациентов с ХОБЛ для полиморфных вариантов генов CCL5 и CXCL10 соответствовали ($p > 0,05$) их ожидаемым частотам, рассчитанным по уравнению Харди-Вайнберга (таблица 2, 3). Таким образом, исследуемые выборки считали репрезентативными и использовали для дальнейшего анализа.

При дальнейшем исследовании частот было обнаружено статистически значимое различие в носительстве аллелей полиморфизма rs2280788 гена CCL5. Так, «мутантная» аллель G встречалась в группе здоровых лиц в 2 % случаев, а в группе пациентов с ХОБЛ значительно чаще – почти в 10 % случаев ($\chi^2 = 6,93$, $p = 0,008$). Вместе с тем роль аллельного профиля в развитии ХОБЛ невелика, о чем свидетельствует среднее значение критерия ϕ ($\phi = 0,208$). Аналогичные результаты были получены другими исследователями. Отмечено, что носительство рецессивной аллели G среди жителей острова Хоккайдо (Япония) является предрасполагающим фактором к более частому развитию ХОБЛ [5].

Анализ частот генотипов показал, что среди пациентов с ХОБЛ высока доля носителей-гетерозигот C/G (18,9 %) по сравнению со здоровыми лицами (2,1 %), а в контрольной группе, наоборот, преобладают носители генотипа с двумя доминантными аллелями – C/C (95,7 %). Среди изучаемых групп не было выявлено ни одного гомозиготного носителя «мутантной» аллели G. Вероятно, отсутствие лиц с генотипом G/G в обеих выборках обусловлено как эпидемиологической однородностью в распространении этого генотипа среди белорусов, так и низкой его встречаемостью во всех изученных популяциях. В то же время оценка силы связи между изучаемыми признаками показала, что сочетанное носительство аллелей (генотипический профиль) имело связь средней силы с развитием заболевания (V Крамера = 0,227).

В обоих случаях выявленная взаимосвязь являлась устойчивой, о чем свидетельствует соответствие вышеназванных критериев и показателей χ^2 для изучаемых выборок (таблица 4). Несмотря на умеренный вклад полиморфизма rs2280788 гена CCL5 в развитие ХОБЛ, не исключено, что при сочетании с другими факторами риска он может

Таблица 4. Частота аллелей и генотипов полиморфного локуса rs2280788 гена CCL5 в группе пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц

Носительство аллелей и генотипа	Пациенты с ХОБЛ, n (%)	Здоровые лица, n (%)	χ^2	p	ϕ/V Крамера*	ОШ	95 % ДИ
C	134 (90,5)	137 (97,9)	6,93	0,008	0,208	0,21	0,06–0,75
G	14 (9,5)	3 (2,1)				4,77	1,34–16,98
C/C	60 (81,1)	67 (95,7)	7,40	0,02	0,227	0,19	0,05–0,70
C/G	14 (18,9)	3 (4,3)				5,21	1,43–19,02
G/G	0 (0,0)	0 (0,0)				0,95	0,02–48,34

* здесь и в таблице 5 значения критериев ϕ и V Крамера: $<0,1$ – незначительная сила взаимосвязи, $0,1–<0,2$ – слабая сила взаимосвязи, $0,2–<0,4$ – средняя сила взаимосвязи.

оказаться более существенным для развития заболевания.

Помимо изучения частот полиморфных вариантов гена, была также проведена оценка риска возникновения ХОБЛ в зависимости от носительства той или иной аллели и генотипа. Для количественной оценки вероятности исследуемого события рассчитывали показатель отношения шансов (ОШ) и 95 % доверительный интервал (95 % ДИ). ОШ для пациентов с ХОБЛ и контрольной группы составило 4,77 при наличии «мутантной» аллели G (95 % ДИ = 1,34–16,98) и 5,21 при наличии гетерозиготного генотипа C/G (95 % ДИ = 1,43–19,02). Таким образом, несмотря на невысокую взаимосвязь полиморфных вариантов rs2280788 гена CCL5 с заболеванием, носители рецессивной аллели G имеют в 4,77 раз больший риск развития ХОБЛ, чем носители «дикой» аллели C, а среди лиц, имеющих генотип C/G риск развития ХОБЛ статистически значимо увеличивается до 5,21 раз по сравнению с носителями других генотипов (см. таблица 4).

Анализ полиморфного варианта rs4508917 гена CXCL10 показал несущественную связь аллельного профиля ($\phi = 0,097$) и слабую связь носительства генотипа ($V = 0,129$) с исходом – развитием ХОБЛ. Использованная модель оценки распределений частот не выявила значимых различий встречаемости аллелей и генотипов между группой пациентов с ХОБЛ и группой здоровых лиц ($\chi^2 = 2,40$, $p = 0,12$ и $\chi^2 = 2,79$, $p = 0,25$ соответственно) (таблица 5).

Таблица 5. Частота аллелей и генотипов полиморфного локуса rs4508917 гена CXCL10 в группе пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц

Носительство аллелей и генотипа	Пациенты с ХОБЛ, n (%)	Здоровые лица, n (%)	χ^2	p	ϕ/V Крамера*	ОШ	95 % ДИ
A	93 (62,8)	100 (71,4)	2,40	0,12	0,097	0,68	0,41–1,11
G	55 (37,2)	40 (28,6)				1,48	0,90–2,43
A/A	27 (36,5)	35 (50,0)	2,79	0,25	0,129	0,57	0,30–1,12
A/G	39 (52,7)	30 (42,9)				1,49	0,77–2,87
G/G	8 (10,8)	5 (7,1)				1,58	0,49–5,07

Результаты оценки полиморфизма rs4508917 в развитии ХОБЛ согласуются с результатами исследования в популяции жителей южной части Китая [9]. Так, при изучении различных однонуклеотидных замен в структуре гена CXCL10 не было обнаружено взаимосвязи полиморфизма rs4508917 с развитием ХОБЛ, в то время как полиморфизм rs56316945 способствовал восприимчивости к заболеванию, а полиморфизм rs56061981 был связан со снижением вероятности неблагоприятного исхода. Подобные результаты согласуются с теорией малого эффекта генетических полиморфизмов при мно-

гофакторных патологиях человека, когда большинство генов-кандидатов ХОБЛ при оценке вклада каждой отдельной однонуклеотидной замены не достигают критических величин, то есть не являются единственными достоверными факторами риска.

В исследованиях, где применяется молекулярно-генетический метод, принято обнаруженные частоты распределения полиморфных аллелей и генотипов сравнивать с т. н. популяционными частотами, то есть с имеющимися в данном географическом регионе у конкретной этнической группы. К сожалению, такой информации по РБ в международных базах данных нет. Полученные нами результаты показали, что носительство различных вариантов полиморфизма rs2280788 гена CCL5 значительно отличается между пациентами с ХОБЛ и здоровыми индивидуумами. В то же время данный полиморфизм вносит довольно существенный вклад в формирование предрасположенности к ХОБЛ у жителей Республики Беларусь, а среди трех представленных вариантов генотипов (C/C, C/G и G/G) наиболее неблагоприятным фактором риска является носительство генотипа C/G. Также, согласно нашим результатам, полиморфизм rs4508917 гена CXCL10 не имеет связи с развитием заболевания.

Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать следующие **выводы**:

1. При наличии рецессивной аллели G гена CCL5 риск развития ХОБЛ увеличивается в 4,77 раза по сравнению с носительством аллели C.

2. У носителей гетерозиготного генотипа C/G гена CCL5 риск развития ХОБЛ увеличен в 5,21 раза по сравнению с носителями других генотипов.

3. Отсутствует ассоциация между полиморфизмом rs4508917 гена CXCL10 и развитием ХОБЛ.

Литература

- Гржибовский, А. М. Анализ номинальных данных (независимые наблюдения) / А. М. Гржибовский // Экология человека. – 2008. – № 6. – С. 58–68.
- Alpha-1-antitrypsin deficiency: Current perspective from genetics to diagnosis and therapeutic approaches /

S. Santangelo [et al.] // *Current Medicinal Chemistry*. – 2017. – Vol. 24, № 1. – P. 65–90.

3. *Association of increased CCL5 and CXCL7 chemokine expression with neutrophil activation in severe stable COPD* / A. Di Stefano [et al.] // *Thorax*. – 2009. – Vol. 64, № 11. – P. 968–975.

4. *CXCL10 Gene Promoter Polymorphism -1447A > G Correlates with Plasma CXCL10 Levels and is Associated with Male Susceptibility to Cerebral Malaria* / N. Wilson [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 12. – P. 1–11.

5. *Functional single nucleotide polymorphisms of the CCL5 gene and nonemphysematous phenotype in COPD patients* / N. Hizawa // *Eur. Respir. J.* – 2008. – Vol. 32. – P. 372–378.

6. *Heritability of chronic obstructive pulmonary disease and related phenotypes in smokers* / J. J. Zhou [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2013. – Vol. 188, № 8. – P. 941–947.

Оригинальные научные публикации

7. *Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression* / H. Liu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Science USA*. – 1999. – Vol. 96, № 8. – P. 4581–4585.

8. *Singh, B., Anbalagan S., Selvaraj P. Regulatory role of CCL5 (rs2280789) and CXCL10 (rs56061981) gene polymorphisms on intracellular CCL5 and CXCL10 expression in pulmonary tuberculosis* / B. Singh, S. Anbalagan, P. Selvaraj // *Hum. Immunol.* – 2017. – Vol. 78, № 5-6. – P. 430–434.

9. *The effects of CXCL10 polymorphisms on COPD susceptibility* / Y. Wang [et al.] // *Mol. Genet. Genomics*. – 2018. – Vol. 293, № 3. – P. 649–655.

10. *Why is chronic obstructive pulmonary disease linked to atrial fibrillation? A systematic overview of the underlying mechanisms* / A. Matarese [et al.] // *Int. J. Cardiol.* – 2018. – Vol. 276. – P. 149–151.

Поступила 20.03.2019 г.