

Идентификация однонуклеотидных полиморфных маркеров предрасположенности к развитию хронической обструктивной болезни легких у жителей Республики Беларусь

Хотько Е. А.¹, Кадушкин А. Г.¹, Марчук С. И.¹, Мигас А. А.², Таганович А. Д.¹

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь;

²Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Хроническая обструктивная болезнь легких (далее — ХОБЛ) представляет собой сложное хроническое воспалительное заболевание дыхательной системы, поражающее преимущественно дистальные дыхательные пути и паренхиму легкого. Целью данного исследования типа «случай—контроль» явилось изучение ассоциации полиморфизмов генов

цитокинов и их рецепторов с ХОБЛ в белорусской популяции. Однонуклеотидные замены IL-4R (rs1801275), IL-4 (rs2243250), IL-6 (rs1800795), IL-10 (rs1800896) и TNF- α (rs1800629) были генотипированы с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (с использованием TaqMan-проб) у 80 больных ХОБЛ и 80 человек контрольной группы. В исследуемых группах получены значимые ассоциации полиморфных вариантов IL-4 (rs2243250) ($p = 0,02$, ОШ = 11,29, ДИ95% = 1,41–90,40 в аддитивной модели) и IL-6 (rs1800795) ($p = 0,04$, ОШ = 0,44, ДИ95% = 0,22–0,87 в аддитивной модели) с ХОБЛ. Отсутствовали статистически значимые различия в распределении частот генотипов IL-10 (rs1800896) и TNF- α (rs1800629) у пациентов с ХОБЛ и лиц контрольной группы.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, полиморфизм генов, цитокины, рецепторы.

Введение. Хроническая обструктивная болезнь легких является одной из наиболее важных причин смерти в большинстве стран. Согласно современному определению ХОБЛ является многофакторным гетерогенным хроническим воспалительным заболеванием дыхательной системы, преимущественно поражающим нижние дыхательные пути и паренхиму легкого.

В последние годы генетические механизмы, лежащие в основе развития ХОБЛ, стали предметом обширных исследований. Исследования геномных ассоциаций (*GWAS*) позволили обнаружить несколько хромосомных локусов, связанных с ХОБЛ: 15q25.1 (CHRNA3, CHRNA5, IREB2, PSMA4, NYKK), 4q31.21 (HNP), 4q22.1 (FAM13A, GPRIN3) и 19q13 (EGLN2, RAB4B) [1]. При обследовании родственников пациентов с ХОБЛ были выявлены наследственные факторы восприимчивости к этому заболеванию, а наличие характерных особенностей в клинических картинах у представителей различных этнических групп указывает на значительную генетическую детерминированность ХОБЛ [2].

Одним из наиболее вероятных механизмов формирования наследственной компоненты при ХОБЛ считается носительство полиморфизмов, вызванных мутациями в локусах тех генов, белковые продукты которых принимают активное участие в патогенезе ХОБЛ. Среди них особая роль отводится цитокинам, хемокинам и их рецепторам, содержание которых в крови и легочной ткани пациентов, страдающих ХОБЛ, значительно изменяется. Так, в литературе имеются данные, что уровень фактора некроза опухоли α (TNF- α) в крови значимо повышается при ХОБЛ, а интерлейкин-6 (IL-6) при прогрессировании заболевания проявляет свои провоспалительные свойства [3]. В то же время было отмечено изменение содержания интерлейкина-4 (IL-4) и интерлейкина-10 (IL-10) в сыворотке кровипациентов с ХОБЛ, при этом снижение противовоспалительной активности последнего коррелировало с легочной дисфункцией [4].

Согласно имеющейся в литературе информации характерные изменения патогенетической картины при ХОБЛ могут быть обусловлены нарушением синтеза не только цитокинов, но и их рецепторов, что оказывает непосредственное влияние на лиганд-рецепторное взаимодействие. Установлено, что у мышей, у которых отсутствует рецептор интерлейкина 4 подтипа α (IL-4R α) происходит ингибирование многих функций IL-4 и IL-13, включая дифференцировку Th2 клеток и уменьшение продукции слизи эпителием дыхательных путей [5].

Изменения лиганд-рецепторных взаимодействий приводят к нарушению синтеза и других белков, принимающих участие в формировании воспалительной реакции. Так, активация рецепторов фактора некроза опухоли 1 и 2-го типов (TNFR1 и TNFR2) может приводить к стимуляции ядерного фактора NF κ B в различных клетках и, следовательно, запускать выработку провоспалительных цитокинов, приводящих к усилению воспаления у курильщиков и пациентов с ХОБЛ [6]. Также в плазме крови пациентов с ХОБЛ стимуляция моноцитов путем связывания IL-6 со своим растворимым рецептором sIL-6R приводит к увеличению экспрессии гена, кодирующего рецептор CCR5 в клетках. Последний, как известно, принимает активное участие в прогрессировании заболевания.

Среди генетических причин изменения количества и взаимодействия про- и противовоспалительных молекул и их рецепторов особое внимание отводится однонуклеотидным заменам (*SNP*) в структуре их генов. Так, среди наиболее распространенных *SNP* гена IL-4R полиморфизм rs1801275, согласно данным литературы, связан с развитием заболеваний легких. Частота встречаемости минорной аллели rs1801275 в мире составляет приблизительно 24,77 %, при этом ее носительство среди африканцев встречается в 70 % случаев, в то время как в популяциях азиатов, европейцев и американцев это значение не превышает 30 %. К наиболее распространенным генам, подверженным однонуклеотидным заменам, белковые продукты которых принимают активное участие в патогенезе различных воспалительных заболеваний легких, в том числе ХОБЛ, относятся TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 и IL-4R.

В настоящее время активно разрабатываются специфические ингибиторы цитокинов и хемокинов для использования в терапии легочных заболеваний. Так, ингибирование TNF- α может быть по-

лезным при лечении тяжелой ХОБЛ с системными особенностями. Поэтому знание генетических изменений, ответственных за образование модифицированных форм цитокинов и их рецепторов, важно для клинической разработки новых лекарственных препаратов.

Таким образом, ХОБЛ представляет собой сложное заболевание, раскрытие генетических детерминант которого может способствовать пониманию молекулярных механизмов развития и течения ХОБЛ, тем самым, улучшению диагностики и лечения этого заболевания.

Цель работы — выявление ассоциации полиморфных вариантов rs1801275 гена IL-4R, rs2243250 гена IL-4, rs1800795 гена IL-6, rs1800896 гена IL-10 и rs1800629 гена TNF- α с риском развития хронической обструктивной болезни легких у жителей Республики Беларусь.

Материалы и методы. В исследовании типа «случай—контроль» проанализировано 160 образцов ДНК неродственных лиц из одного и того же региона Республики Беларусь, которые были отобраны в период с 2016 по 2018 г. Сведения об этническом происхождении всех участников получены путем анкетирования обследуемых лиц. У 80 пациентов с ХОБЛ, возраст которых варьировал от 38 до 78 лет, были отобраны случайным образом. Средний возраст обследуемых группы «случай» составил $62 \pm 9,4$ года. Все пациенты имели установленный диагноз ХОБЛ в соответствии с классификацией GOLD (2014), который ставили на основании результатов клинического обследования и данных спирометрии. Из исследования исключались пациенты, у которых были диагностированы бронхиальная астма, туберкулез легких и другие заболевания бронхолегочной системы, а также которые не способны были правильно выполнить дыхательный маневр при тестировании функции внешнего дыхания.

Контрольная группа была представлена 80 практически здоровыми лицами, средний возраст которых составил $54 \pm 9,2$ года. В группу сравнения включались лица, не имевшие в анамнезе патологии бронхолегочной системы и других хронических заболеваний и постоянно проживающие в г. Минске. Из группы контроля были исключены те, у кого в ходе спирометрии отмечены уровень ОФВ₁ менее 80 % и величина отношения ОФВ₁/ФЖЕЛ менее 70 %. Все исследования проводились с информированного согласия пациентов.

Молекулярно-генетические исследования генов IL-4R, IL-4, IL-6, IL-10 и TNF- α включали определение аллельных вариантов однонуклеотидных замен с использованием подхода «гены—кандидаты», в результате которого были отобраны только полиморфизмы генов, кодирующих белки с известными функциями и участием в патогенезе заболеваний бронхолегочной системы и связанные с развитием ХОБЛ в других популяциях.

Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови осуществляли с помощью набора *Nucleo Spin Blood (MACHERY-NAGEL, Германия)* согласно методике производителя, полученные образцы хранили при -20°C . Типирование полиморфных локусов IL-4R (rs1801275), IL-4 (rs2243250), IL-6 (rs1800795), IL-10 (rs1800896) и TNF- α (rs1800629) проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (*RealTime*) с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплиментарных полиморфным участкам ДНК (детектирующий амплификатор BioRadCFX96, *Bio-Rad Laboratories, США*). Каждый образец амплифицировали с использованием пары специфических праймеров и двух зондов, несущих «гаситель» на 3'-конце и один из флуоресцентных красителей (*FAM* или *VIC*) на 5'-конце. Конечную флуоресценцию и дискриминацию по генотипу определяли в соответствии с протоколом BioRadCFX96 с использованием программного обеспечения *CFX Manager*.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием пакета статистических программ SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences, версия 23.0*). Соответствие частот генотипов изучаемых генов цитокинов и цитокинового рецептораравновесию Харди — Вайнберга оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона с использованием онлайн-калькулятора Ген Эксперт (режим доступа: http://gen-exp.ru/calculator_or.php). В этом случае нулевую гипотезу отвергали при $p \leq 0,05$.

Ассоциацию определенных генотипов изученных генов с развитием ХОБЛ выявляли, сравнивая выборки больных и здоровых индивидов по частоте одного признака, с использованием критерия χ^2 , а для количественной оценки ассоциации использовали показатель отношения шансов (ОШ). В качестве базовой исследовали аддитивную модель наследования признака. Величину p считали значимой при уровне $<0,05$ при условии, что значение 95 % доверительного интервала (ДИ) для ОШ не пересекали 1. Ко всем экспериментально установленным значениям p -критерия была применена поправка на правдоподобие с целью исключения статистических ошибок при множественных сравнениях.

Результаты и их обсуждение. До того, как полиморфизмы генов-кандидатов были проанализированы на предмет ассоциаций с ХОБЛ, мы проверили, соответствовали ли распределения частот их генотипов равновесию Харди — Вайнберга (HWE) как в группе пациентов, так и в группе здоровых лиц (таблица 1).

Таблица 1 — Распределение генотипов в группе пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц (тест Харди – Вайнберга)

Полиморфизм гена/ генотип	Равновесие для опытной группы				Равновесие для контрольной группы			
	Пациенты с ХОБЛ, %	HWE, %	χ^2	p	Здоровые лица, %	HWE, %	χ^2	p
IL-4R, rs1801275								
A/A	30,0	38,3	9,87	0,002	26,3	30,3	2,09	0,15
A/G	63,8	47,2			57,5	49,5		
G/G	6,3	14,5			16,3	20,3		
IL-4, rs2243250								
C/C	56,3	51,7	4,12	0,04	68,8	70,1	0,84	0,36
C/T	31,3	40,4			30,0	27,2		
T/T	12,5	7,9			1,3	2,6		
IL-6, rs1800795								
C/C	22,5	22,6	0,0	0,98	40,0	35,3	3,10	0,08
C/G	50,0	49,9			38,8	48,2		
G/G	27,5	27,6			21,3	16,0		
IL-10, rs1800896								
T/T	35,0	25,6	11,24	0,001	28,8	22,6	4,93	0,03
T/C	31,3	50,0			37,5	49,9		
C/C	33,8	24,4			33,8	27,6		
TNF- α , rs1800629								
G/G	50,0	47,3	1,30	0,26	57,5	59,1	0,65	0,42
G/A	37,5	43,0			38,8	35,6		
A/A	12,5	9,8			3,8	5,3		

В результате проведения теста Харди – Вайнберга было определено, что сформированные случайным образом выборки пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц имели значимые отличия в распределении генотипов IL-10 (rs1800896) в сравнении с ожидаемыми частотами генеральной совокупности, рассчитанными по уравнению HWE. Обнаруженная нерепрезентативность послужила основанием для удаления этого полиморфизма из дальнейшего исследования.

Для оставшихся полиморфных вариантов генов было проведено сравнение частот генотипов в обследуемой выборке с частотами в группе здоровых лиц (таблица 2). Существенные различия между исследуемыми группами были выявлены для полиморфных локусов rs2243250(IL-4) и rs1800795 (IL-6). Результаты оценки частот распределения генотипов полиморфизма rs2243250(IL-4) выявили статистически значимое ($p = 0,02$) уменьшение доли «нормального» генотипа C/C у заболевших (30,0 %) по сравнению с аналогичным показателем у здоровых лиц (68,8 %). В то же время число носителей генотипа, содержащего минорную аллель T, превалировало в группе пациентов с ХОБЛ (6,2 %), в сравнении с контрольной группой (1,2 %).

Похожая картина имела место и в отношении полиморфизма rs1800795 (IL-6), где статистически значимые отличия ($p = 0,04$) наблюдались при сравнении распределений генотипов в группах и отражали преобладание носителей минорной аллели G среди пациентов с ХОБЛ (генотип C/G — 50 % и генотип G/G — 27,5 % случаев), в то время как здоровые лица чаще являлись носителями генотипа гомозиготного по аллели C (40,0 %).

Таблица 2 — Сравнительный анализ распределения частот генотипов полиморфных вариантов генов в группе пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц

Носительство генотипов	Пациенты с ХОБЛ, n (%)	Здоровые лица, n (%)	χ^2	p	ОШ	95% ДИ
IL-4R, rs1801275						
A/A	24 (30,0)	21 (26,3)	2,07	0,15	1,20	0,60-2,40
A/G	51 (63,8)	46 (57,5)			1,30	0,69-2,45
G/G	5 (6,2)	13 (16,2)			0,34	0,12-1,01

Окончание табл. 2

Носительство генотипов	Пациенты с ХОБЛ, n (%)	Здоровые лица, n (%)	χ^2	<i>p</i>	ОШ	95% ДИ
IL-4, rs2243250						
C/C	45 (30,0)	55 (68,8)	5,87	0,02	0,58	0,31-1,12
C/T	25 (63,8)	24 (30,0)			1,06	0,54-2,08
T/T	10 (6,2)	1 (1,2)			11,29	1,41-90,40
IL-6, rs1800795						
C/C	18 (22,5)	32 (40,0)	4,09	0,04	0,44	0,22-0,87
C/G	40 (50,0)	31 (38,8)			1,58	0,84-2,96
G/G	22 (27,5)	17 (21,2)			1,41	0,68-2,91
TNF- α , rs1800629						
G/G	40 (50,0)	46 (57,4)	2,57	0,11	0,74	0,40-1,38
G/A	30 (37,5)	31 (38,8)			0,95	0,50-1,80
A/A	10 (12,5)	3 (3,8)			3,67	0,97-13,87

На следующем этапе ассоциация была проанализирована с использованием показателей отношения шансов и соответствующих 95% доверительных интервалов. При наличии гомозиготного генотипа T/T полиморфного локуса rs2243250 гена IL-4 показатель сравнения ОШу пациентов с ХОБЛ и контрольной группы составил 11,29(95% ДИ = 1,41 – 90,40) (таблица 2). Это свидетельствует о повышенном риске развития ХОБЛ у носителей генотипа с аллелью T в 11,29 раза.

В литературе можно встретить похожие результаты относительно данного полиморфизма. Так, распределение генотипов показали значительные различия у жителей Японии и Египта между ХОБЛ и контрольной группой ($p < 0,001$ и $p = 0,033$ соответственно) [7]. Стоит так же отметить, что распространенность полиморфных аллельных вариантов в изучаемых нами выборках имела схожий характер как с мировой популяцией, так и населением Европы (таблица 3). Так, частота минорной аллели T в выборках пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц, сформированных из числа жителей Республики Беларусь, составила 28,1 % и 16,2 %, соответственно, в то же время среди европейского населения, согласно базе данных *gnomAD — Genomes* (режим доступа: <https://gnomad.broadinstitute.org/>), аллель T встречается в 20,9 % случаев (таблица 3). Незначительные отличия обнаруженных нами частот генотипов у белорусского населения и в других базах данных могут быть связаны с генетическим разнообразием между различными этническими группами.

Таблица 3 — Частота аллелей полиморфных локусов rs2243250 гена IL-4 и rs1800795 гена IL-6 в группе пациентов с ХОБЛ, здоровых лиц и в некоторых популяциях (данные *gnomAD — Genomes*)

Носительство аллелей	Пациенты с ХОБЛ, %	Здоровые лица, %	Мировое население	Население Европы
rs2243250				
C	71,9	83,8	62,9	79,1
T	28,1	16,2	37,1	20,9
rs1800795				
C	47,5	59,4	31,7	45,8
G	52,5	46,6	68,3	54,2

В отношении полиморфизма rs1800795 гена IL-6 для генотипа C/C ОШ составило 0,44 (95 % ДИ = 0,22 – 0,87). Поскольку это значение меньше 1, оно указывает на возможность протективного действия данного генотипа в отношении развития ХОБЛ. Однозначного вывода о носительстве генотипов C/GиG/G сделать не удалось, так как доверительные интервалы, рассчитанные для ОШ при анализе ассоциации ХОБЛ с носительством генотипов, пересекали 1 (таблица 2).

Ассоциативные исследования полиморфизма IL-6 с ХОБЛ, согласно данным литературы, дают противоречивые результаты, что может быть связано как с недостаточным объемом выборки в статистическом анализе в отдельных исследованиях, так и с возможными этническими различиями. Так, согласно результатам мета-анализа, представленным Xie X.M. и соавторами, ряд исследований европейского населения и азиатской популяции указывает на связь полиморфизма rs1800795 гена IL-6 с развитием ХОБЛ [8]. Толь-

ко в одном исследовании обнаружено, что аллель C rs1800795 IL-6 может действовать как фактор риска ХОБЛ у европейцев. Другие авторы отмечают ассоциацию носительства генотипа G/G, содержащего минорную аллель, с развитием ХОБЛ [8]. Результаты проведенного нами исследования согласуются с последними, а полученные нами частоты аллелей приближены к таковым среди населения Европы (таблица 3).

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

1. В белорусской популяции полиморфные локусы rs2243250 гена IL-4 и rs1800795 гена IL-6 вносят вклад в предрасположенность к развитию хронической обструктивной болезни легких.
2. У носителей гомозиготного генотипа T/T гена IL-4 риск развития ХОБЛ увеличен в 11,29 раза.
3. Носительство генотипа C/C гена IL-6 может являться протективным фактором при развитии ХОБЛ.

Литература

1. Sakornsakolpat, P. Integrative genomics identifies new genes associated with severe COPD and emphysema [Электронный ресурс] / P. Sakornsakolpat [et al.] // *Respir. Res.* — Mode of access : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5863845/>. — Date of access : 29.07.2019.
2. Li, Y. What do polymorphisms tell us about the mechanisms of COPD? / Y. Li, M. H. Cho, X. N. Zhou // *Clin. Sci. (Lond.)*. — 2017. — Vol. 131, № 24. — P. 2847–2863.
3. Inflammatory markers and the risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis [Электронный ресурс] / B. Su [et al.] // *PLoS One.* — Mode of access : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4841528/>. — Date of access : 27.07.2019.
4. Effects of the ophylline on plasma levels of interleukin-4, cyclic nucleotides and pulmonary functions in patients with chronic obstructive pulmonary disease / N. Zhang [et al.] // *J. Tongji, Med. Univ.* — 1999. — Vol. 19, № 1. — P. 15–19.
5. Regulation of IL-4 receptor signaling by STUB1 in lung inflammation / Q. Wei [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2014. — Vol. 189, № 1. — P. 16–29.
6. Tumor necrosis factor receptor 2 as a possible marker of COPD in smokers and ex-smokers / L. M. O. Caram [et al.] // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* — 2017. — Vol. 1, № 12. — P. 2015–2021.
7. Polymorphisms of IL4, IL13, and ADRB2 genes in COPD / A. E. Hegab [et al.] // *Chest.* — 2004. — Vol. 126, № 6. — P. 1832–1839.
8. Interleukin-6 gene -174G>C polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease risk: a meta-analysis / X. M. Xie [et al.] // *Genet. Mol. Res.* — 2015. — Vol. 14, № 3. — P. 8516–8525.

Identification of single nucleotide polymorphic markers of risk for chronic obstructive pulmonary disease development in Belarus

Khotko E. A.¹, Kadushkin A. H.¹, Marchuk S. I.¹, Migas A. A.², Taganovich A. D.¹

¹*Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus;*

²*State Institution “Republican Scientific and Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology”, Minsk, Republic of Belarus*

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a complex chronic inflammatory disease of the respiratory system affecting primarily distal respiratory pathways and lung parenchyma. This work was designed as a case-control study with the aim of investigating the association of cytokines and their receptors gene polymorphisms with COPD in population from Belarus. Five SNPs: IL-4R (rs1801275), IL-4 (rs2243250), IL-6 (rs1800795), IL-10 (rs1800896) and TNF- α (rs1800629) were genotyped by the real-time polymerase chain reaction (TaqMan assays) in 80 COPD patients and 80 controls. Genotype frequencies of polymorphisms were significantly different between patients with COPD and control subjects. In our population, a significant association of IL-4 (rs2243250) ($P = 0.02$, OR = 11.29, CI95% = 1.41–90.40) and IL-6 (rs1800795) ($P = 0.04$, OR = 0.44, CI95% = 0.22–0.87) with COPD were revealed in additive model. There was no significant difference in genotype frequencies of IL-10 (rs1800896) and TNF- α (rs1800629) between COPD patients and controls.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, gene polymorphisms, cytokines, receptors.

Поступила 02.10.2019