

Д. И. Мурашко
**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ХЕМОКИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРИ
ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

Научный руководитель: ассист. Е. А. Хотько

*Кафедра биологической химии,
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

D. I. Murashko
**CHEMOKINE RECEPTOR GENE POLIMORPHISM IN CHRONIC OB-
STRUCTIVE PULMONARY DISEASE**

Tutor: assistant E. A. Khotko

*Department of Biological Chemistry,
Belarusian State Medical University, Minsk*

Резюме. В статье рассмотрены результаты исследования полиморфизмов генов хемокиновых рецепторов rs2228014 гена CXCR4 и del32 гена CCR5. Распределения частот генотипов полиморфизмов гена CXCR4 в группе здоровых и пациентов с ХОБЛ статистически значимо различались. В распределениях частот генотипов в контрольной и опытной группах при изучении полиморфизма гена CCR5 статистически значимых различий не выявлено.

Summary. The article describes the results of studies of the polymorphisms of the chemokine receptor genes rs2228014 of the CXCR4 gene and the del32 gene of the CCR5 gene. Frequency distribution of genotypes of polymorphisms of the CXCR4 gene in the group of healthy and patients with statistically significant differences. No statistically significant differences were found in the distribution of genotypes in the control and experimental groups when studying the polymorphism of the CCR5 genes.

Ключевые слова: хемокиновые рецепторы, полиморфизм генов, CXCR4, CCR5, хроническая обструктивная болезнь легких.

Keywords: chemokine receptors, gene polymorphism, CXCR4, CCR5, chronic obstructive pulmonary disease.

Актуальность. ХОБЛ (хроническая обструктивная болезнь легких) – заболевание дыхательной системы, для которого характерно частичное необратимое ограничение воздушного потока в дыхательных путях, имеющее прогрессирующий характер. По прогнозам ВОЗ к 2030 году ХОБЛ станет третьей по значимости причиной смертности в мире, и уже в 2015 году смертность от ХОБЛ составила примерно 5% от общей смертности.

В прошлом от ХОБЛ чаще страдали мужчины, но сегодня оба пола страдают в равной пропорции в связи с одинаковым уровнем распространенности курения и загрязнения воздуха в помещениях. Как правило, заболеванием страдают люди старше 40 лет. Основная причина развития ХОБЛ – ингаляционные воздействия. К другим факторам относятся патологии внутриутробного развития, неблагоприятный социально-экономический статус, бронхиальная астма, хронический бронхит, частые инфекционные заболевания. Важную роль играет также генетическая предрасположенность (по версии GOLD 2014). В основе патогенеза ХОБЛ лежит интенсивный воспалительный ответ на длительно воздействующие раздражающие

факторы. Он опосредуется усиленной миграцией иммунных клеток в воспалительный очаг, которая регулируется хемокинами и их рецепторами.

Установлена роль хемокиновых рецепторов CCR5, CXCR4 и их лигандов в регуляции миграции лимфоцитов в легочную ткань. Рецептор CCR5 представляет собой 7-ТМС рецептор, имеющий внеклеточный N-конец для связывания с хемокином и цитоплазматический C-конец для связи с G-белком. Он синтезируется преимущественно Т-клетками, макрофагами, дендритными клетками и клетками микроглии.

Широко известна мутация гена CCR5del32 – выпадение 32 пар нуклеотидов внутри гена, в результате чего у 7-ТМС рецептора – продукта экспрессии гена – отсутствуют три последних трансмембранных домена [1]. Белок проходит посттрансляционную модификацию в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) путём фосфорилирования и мультимеризации. Белок, образующийся в результате делеции, способен к мультимеризации, но не способен к фосфорилированию. Мутантная форма может взаимодействовать с нормальной при образовании мультимера, но такой комплекс не транспортируется на мембрану, а остаётся в ЭПР. Таким образом, внутри клетки CCR5 существует в виде мультимеров CCR5/CCR5 или CCR5/ CCR5del32 [2]. Установлено, что мутация CCR5del32 хемокинового рецептора ассоциирована с более низким уровнем С-реактивного белка [3].

Еще одним рецептором хемокинов является CXCR4, специфично связывающийся с лигандом CXCL12. Он представляет собой 7-ТМС рецептор с тремя внеклеточными петлями между трансмембранными доменами, внеклеточным N-концом и внутриклеточным C-концом. Экспрессия гена CXCR4 и содержание мРНК его лиганда CXCL12 в клетках стромы легких у пациентов с ХОБЛ достоверно снижена. Это может быть являться одной из причин снижения их миграционной способности и возможности мобилизоваться для выполнения защитных и репаративных функций [4]. Было показано, что *in vivo* мезенхимальные стволовые клетки, имеющие рецептор CXCR4, успешнее колонизируют поврежденную ткань легкого и подавляют развитие острого повреждения легких, частично модулируя уровни воспалительных молекул и количество нейтрофилов [5]. Наиболее частая мутация гена – транзиция G-A (C-T, частота мутации 4%) в экзоне гена (rs2228014), которая приводит к синонимичной замене изолейцина. Установлено, что наличие данной мутации никак не влияет на количество мРНК и самого рецептора в клетке, однако, как гомо-, так и гетерозиготное состояние гена повышает риск развития рака груди путем изменения характера взаимодействия рецептора с лигандом [6].

Цель: изучить ассоциацию полиморфизма генов хемокиновых рецепторов CXCR4 и CCR5 с развитием ХОБЛ в популяции белорусов.

Задачи:

- 1 Установить взаимосвязь носительства полиморфизма генов CCR5, CXCR4 с развитием ХОБЛ в популяции белорусов.
- 2 Установить силу влияния полиморфизма генов CCR5, CXCR4 на развитие ХОБЛ в популяции белорусов.
- 3 Рассчитать риск развития ХОБЛ в популяции белорусов в зависимости от

носительства различных генотипов полиморфных вариантов генов CCR5, CXCR4.

Материалы и методы. Клиническое обследование и диагностика проводилась на базе Минского консультативно-диагностического центра с добровольного согласия пациентов. Общее количество обследованных составило 94 человека (33 здоровых, 61 страдающий ХОБЛ) для гена CXCR4 и 96 человек (34 здоровых, 62 страдающих ХОБЛ) для гена CCR5. Генотипирование проводили с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией флюоресценции по конечной точке. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS Statistics 12.0 и Ген-эксперт. Для анализа отклонения наблюдаемых частот генотипов от равновесия Харди-Вайнберга использовали программу Ген-эксперт. Выборки сравнивали путем составления таблиц сопряженности и вычисления критерия χ^2 . Количественную оценку связи носительства аллелей с наличием ХОБЛ определяли с помощью показателя отношения шансов (ОШ). Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Значения 95% доверительного интервала (ДИ) не пересекали 1. Сила связи между носительством генотипа и развитием ХОБЛ определялась с использованием критерия Крамера.

Результаты и их обсуждение. Проведен анализ ассоциации полиморфных локусов генов rs2228014 CXCR4 и CCR5del32 с развитием ХОБЛ у жителей Республики Беларусь. Распределение генотипов в изучаемых группах соответствовало ожидаемым, рассчитанным по уравнению Харди-Вайнберга (табл.1, табл.2). Сравнение распределений генотипов rs2228014 CXCR4 в группе пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц показало, что среди пациентов с ХОБЛ чаще встречаются носители гомозиготного «мутантного» генотипа (83,6%), чем среди здоровых лиц (63,6%) ($p=0,03$). Обнаружено, что носительство генотипа А/А гена CXCR4 связано с повышением риска развития ХОБЛ (95%ДИ=1,09–7,77) в 2,91 раза (табл.3). Оценка силы связи между данным геном и развитием ХОБЛ производилась путем расчета критерия Крамера, который составил 0,268, что указывает на связь средней силы (0,2–0,4) между изучаемыми переменными.

Табл. 1. Распределение Харди-Вайнберга для контрольной группы при изучении гена CXCR4

Генотип	Здоровые лица	HWE	χ^2	p
G/G	6,1%	4,5%	0,29	0,59
G/A	30,3%	33,4%		
A/A	63,6%	62,1%		

Табл. 2. Распределение Харди-Вайнберга для пациентов с ХОБЛ при изучении гена CXCR4

Генотип	Пациенты с ХОБЛ	HWE	χ^2	p
G/G	0,0%	0,7%	0,49	0,49
G/A	16,4%	15,0%		
A/A	83,6%	84,3%		

Табл. 3. Частота генотипов гена CXCR4 в группе пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц

Генотип	Пациенты с ХОБЛ	Здоровые лица	χ^2	p	ОШ	95%ДИ
G/G	0,0%	63,6%	0,29	0,59	1,09	7,77
G/A	16,4%	30,3%	0,29	0,59	1,09	7,77
A/A	83,6%	6,1%	0,29	0,59	1,09	7,77

G/G	0,0%	6,1%	6,76	0,03	0,10	0,00 – 2,20
G/A	16,4%	30,3%			0,45	0,17 – 1,23
A/A	83,6%	63,6%			2,91	1,09 – 7,77

При оценке носительства различных полиморфных вариантов гена CCR5 была установлено, что экспериментальная группа не соответствовала ($\chi^2=23,89$, $p<0,01$) распределению Харди-Вайнберга (табл. 4, табл. 5). В связи с этим дальнейшее сравнение частот генотипов среди здоровых лиц и пациентов с ХОБЛ не проводилось.

Табл. 4. Распределение Харди-Вайнберга в группе здоровых лиц при изучении гена CCR5

Генотип	Здоровые лица	HWE	χ^2	p
non-del/non-del	73,5%	75,3%	0,79	0,37
non-del/del	26,5%	23,0%		
del/del	0%	1,8%		

Табл. 5. Распределение Харди-Вайнберга в группе пациентов с ХОБЛ при изучении гена CCR5

Генотип	Пациенты с ХОБЛ	HWE	χ^2	p
non-del/non-del	83,8%	77,3%	23,89	1,0E-6
non-del/del	8,1%	21,3%		
del/del	8,1%	1,4%		

Выводы

1 Установлена взаимосвязь носительства полиморфизма гена CXCR4 с развитием ХОБЛ в популяции белорусов.

2 Между развитием ХОБЛ и полиморфизмом rs2228014 гена CXCR4 установлена связь средней силы (критерий Крамера=0,268).

3 Носительство гомозиготного генотипа A/A, содержащего обе мутантные аллели полиморфизма rs2228014 гена CXCR4, повышает риск развития ХОБЛ в 2,91 раза по сравнению с носительством генотипов G/G и G/A ($p=0,03$, ОШ=2,91, 95%ДИ>1).

Литература

1. Common CCR5-del32 frameshift mutation associated with serum levels of inflammatory markers and cardiovascular disease risk in the Bruneck population / A.R. Afzal [et al.] // *Stroke*. — 2008. — Vol. 39, № 7. — P. 1972–1978.
2. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32 / M. Benkirane [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 1997. — Vol. 272, № 49. — P. 30603–30606.
3. The impact of CCR5-Δ32 deletion on C-reactive protein levels and cardiovascular disease: Results from the Danish blood donor study / K.M. Dinh [et al.] // *Atherosclerosis*. — 2015. — Vol. 242, № 1. — P. 222–225.
4. Impaired mRNA Expression of the Migration Related Chemokine Receptor CXCR4 in Mesenchymal Stem Cells of COPD Patients / K. Karagiannis [et al.] // *Int. J. Inflamm.* — 2017. — Epub. 2017.
5. CXCR4 overexpression in mesenchymal stem cells facilitates treatment of acute lung injury in rats / J.X. Yang [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2015. — Vol. 290, № 4. — P. 1994–2006.
6. Genetic polymorphism and expression of CXCR4 in Breast Cancer. / M .O. Kishima [et al.] // *Anal. Cell. Pathol. (Amst)*. — 2015. — Epub. 2015.