

РОЛЬ ГЕНОВ СЫВОРОТОЧНОГО АМИЛОИДНОГО БЕЛКА A1, МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ, ХЕМОКИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

© 2018 г. Г. Ф. Корытина^{1, *}, Л. З. Ахмадишина¹, О. В. Кочетова¹,
Ю. Г. Азнабаева², Ш. З. Загидуллин², Т. В. Викторова^{1, 2}

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Башкирский государственный медицинский университет, кафедра биологии,
кафедра профилактики внутренних болезней, Уфа, 450000 Россия

*e-mail: guly_kory@mail.ru

Поступила в редакцию 13.12.2017 г.

После доработки 14.03.2018 г.

Принята к публикации 03.04.2018 г.

Хроническая обструктивная болезнь легких — многофакторное хроническое воспалительное заболевание респираторной системы. Воспаление является ключевой концепцией патогенеза заболевания. Цель настоящего исследования заключалась в выявлении ассоциации аллелей и генотипов генов хемокинов и хемокиновых рецепторов (*CCL11*, *CX3CR1*, *CCR5*, *CCL5*, *CXCL12*, *CCL2*, *CCL17*), молекул адгезии (*PECAM1*, *ICAM1*) и сывороточного амилоидного белка A1 (*SAA1*) с развитием хронической обструктивной болезни легких. Ассоциация с развитием заболевания была установлена для аллеля С ($P = 0.0001$, OR = 1.58) и генотипа TC ($P = 0.00001$, OR = 2.15) гена *SAA1* (rs1136743C>T); полученная ассоциация подтверждена в группах, дифференцированных по статусу курения. Маркерами риска развития хронической обструктивной болезни легких являются генотипы CG гена *PECAM1* (rs281865545G>C) ($P = 0.028$, OR = 1.36) и GG гена *ICAM1* (rs5498A>G) ($P = 0.005$, OR = 1.66), которые статистически значимо ассоциированы с развитием заболевания только в группе курильщиков. Генотип AA гена *CCL2* (rs1024611A>G) ассоциирован с развитием болезни у некурящих индивидов ($P = 0.037$, OR = 1.82). Генотипы GG гена *PECAM1* (rs281865545G>C) и AA гена *CX3CR1* (rs3732378A>G) связаны с более высокими показателями жизненной емкости легких ($P = 0.014$ и $P = 0.04$). У индивидов с генотипом GG гена *ICAM1* (rs5498A>G) было отмечено снижение показателей объема форсированного выдоха за первую секунду и форсированной жизненной емкости легких ($P = 0.025$ и $P = 0.029$).

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, белки острой фазы воспаления, молекулы адгезии, хемокины, маркеры системного воспаления.

DOI: 10.1134/S0016675818120056

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является одним из наиболее распространенных заболеваний в мире, поздно диагностируемым, трудно поддающимся лечению и представляющим актуальную проблему здравоохранения [1]. Согласно современному определению ХОБЛ — многофакторное хроническое гетерогенное воспалительное заболевание респираторной системы с преимущественным поражением дистальных отделов дыхательных путей и легочной паренхимы [1]. Основным фактором риска развития ХОБЛ является табакокурение, однако симптомы обструкции дыхательных путей развиваются только у 10–20% постоянных курильщиков. С воздействием сигаретного дыма связывают появление патологических процессов в легких, развитие системных

воспалительных реакций и дисфункцию эндотелия сосудов [1, 2].

Генетические механизмы формирования ХОБЛ в последние годы стали объектом широкомасштабных исследований во всем мире. При полногеномных исследованиях генетических ассоциаций (GWAS) выявлено несколько локусов, связанных с развитием ХОБЛ, на 4-й и 15-й хромосомах в области 15q25.1 — *CHRNA3*, *CHRNA5*, *IREB2*, *PSMA4*, 4q31.21 — *HHIP*, 4q22.1 — *FAM13A*, rs7937 на хромосоме 19q13 [3]. С другой стороны, механизмы прогрессирования ХОБЛ и развития высокого уровня воспаления в легких остаются малоизученными.

Воспаление является ключевой концепцией патогенеза ХОБЛ. У больных ХОБЛ, особенно в тяжелой стадии и во время обострений, повышается уровень маркеров системного воспаления: циркулирующих цитокинов и хемокинов, белков острой фазы и количество лейкоцитов [4]. Мы предполагаем, что аллельные варианты генов, кодирующих факторы, вовлеченные в развитие воспалительного ответа, могут быть ассоциированы с развитием ХОБЛ и прогрессированием заболевания. В данном исследовании мы сосредоточились на полиморфных вариантах генов белков острой фазы воспаления, молекул адгезии, хемокинов и их рецепторов.

Сывороточный амилоидный A1-белок (SAA1) — ключевой фактор острой фазы воспаления, способствует хемотаксису, миграции и адгезии воспалительных клеток, особенно моноцитов и макрофагов [5]. В ряде исследований показано, что SAA играет роль в повреждении легочной ткани при курении [6].

ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1) — это одноцепочечный гликопротеин, интегральный мембранный белок, экспрессируется на различных типах эпителиальных клеток, фибробластах, тканевых макрофагах [7]. В многочисленных исследованиях доказана вовлеченность молекулы ICAM1 в патогенез воспалительных и аутоиммунных заболеваний [7–9]. PECAM1 (platelet and endothelial cell adhesion molecule 1) относится к классу молекул клеточной адгезии, принадлежит к семейству иммуноглобулинов, в основном экспрессируется сосудистыми клетками, выявляется на тромбоцитах, моноцитах, нейтрофилах. Исследования подтверждают участие PECAM1 в воспалительных реакциях и взаимодействии лейкоцитов с эндотелиальными клетками [10].

Хроническое системное воспаление при ХОБЛ связано с постоянной продукцией альвеолярными макрофагами и нейтрофилами и другими активированными клетками воспалительных факторов: провоспалительных цитокинов, фибриногена, С-реактивного белка, хемокинов [11]. Хемокины — полипептиды молекулярной массой 5–20 кДа, представляющие собой хемоаттрактантные цитокины, действующие через рецепторы [12, 13]. Выделяют четыре группы хемокинов, различающиеся спектром мишеней. Наиболее известны CC-хемокины, привлекающие моноциты и лимфоциты [12, 13].

Цель настоящего исследования заключалась в выявлении ассоциации аллельных вариантов генов хемокинов и хемокиновых рецепторов (*CCL11*, *CX3CR1*, *CCR5*, *CCL5*, *CXCL12*, *CCL2*, *CCL17*), молекул адгезии (*PECAM1*, *ICAM1*) и сывороточного амилоидного белка A1 (*SAA1*) с развитием хронической обструктивной болезни легких.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования — кандидатное исследование по принципу случай—контроль. Использовали образцы ДНК неродственных индивидов, татар по этнической принадлежности, проживающих на территории Республики Башкортостан. Группа больных (случай) ($N = 425$), из них 369 мужчин (86.82%) и 56 женщин (13.18%) в возрасте 63.38 ± 11.81 лет. Диагноз ХОБЛ устанавливали по Международной классификации болезней 10-го пересмотра и с учетом рекомендаций рабочей группы по “Глобальной стратегии диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких” (пересмотр 2017 г.) [1, 14]. Обследованные больные не подвергались ранее действию комплекса вредных производственных факторов. Исключали кандидатов с симптомами аллергических заболеваний, бронхиальной астмой, онкологическими заболеваниями и специфическими инфекционными заболеваниями органов дыхания (туберкулез). Среди больных ХОБЛ курильщиков и бывших курильщиков — 331 человек (77.88%), некурящих 94 (22.12%). Подсчет индекса курения в условных единицах (“число пачек в год”, “пачки/лет”, pack/years, PY) проводили по общепринятой формуле [1]. Индекс курения у курильщиков и бывших курильщиков составил 44.58 ± 25.92 пачек/лет. У всех больных исследовали функцию внешнего дыхания методом спирометрии, оценивали жизненную емкость легких (ЖЕЛ), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), соотношение объема форсированного выдоха в 1 с и жизненной емкости легких (ОФВ1/ЖЕЛ). В группе больных показатели (в % от нормы) составляли: ОФВ1 = 38.85 ± 16.62 , ФЖЕЛ = 46.06 ± 16.32 , ЖЕЛ = 49.02 ± 15.54 , ОФВ1/ФЖЕЛ = 54.21 ± 11.40 .

Группа контроля ($N = 457$) включала практически здоровых индивидов, без патологии дыхательной системы в анамнезе и без профессионального контакта с вредными химическими веществами, подобранных по возрасту (58.44 ± 14.79), полу (406 мужчин, 88.84%, и 51 женщина, 11.16%), статусу курения (курильщики и бывшие курильщики — 322 (70.46%) и некурящие — 135 (29.54%)), индекс курения у курильщиков составлял 37.71 ± 14.12 пачек/лет. В группе контроля показатели функции внешнего дыхания (в % от нормы) составили: ОФВ1 = 102.7 ± 52.1 , ФЖЕЛ = 107.1 ± 32.05 , ЖЕЛ = 105.3 ± 42.87 , ОФВ1/ФЖЕЛ = 87.94 ± 10.69 .

Исследование одобрено комитетом по этике ИБГ УНЦ РАН. От всех участников исследования получено информированное добровольное согласие на использование биологического материала в планируемых исследованиях.

Генотипирование. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с использованием фенольно-хлороформной очистки. Полиморфные варианты генов *CCL11* (с.-426С>Т, rs16969415), *SAAI* (с.209С>Т, rs1136743), *CX3CR1* (с.839G>А, rs3732378), *PECAM1* (с.373G>С, rs281865545), *ICAM1* (с.1405А>G, rs5498), *CCR5* (*del32*), *CCL5* (с.-471G>А, rs2107538), *CXCL12* (с.*519G>А, rs1801157), *CCL2* (с.2493А>G, rs1024611), *CCL17* (с.-59-372Т>С, rs223828) [15] анализировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени коммерческими наборами с флуоресцентной детекцией (FLASH/RTAS) (<http://testgen.ru>, Тест-Ген, Россия) на приборе BioRad CFX96™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Флуоресценцию “по конечной точке” и дискриминацию генотипов определяли по протоколу BioRad CFX96™, используя программу CFX Manager™ Software.

Статистическую обработку результатов проводили, используя пакеты прикладных программ Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., USA) и PLINK v. 1.07 [16]. Рассчитывали частоты аллелей и генотипов, соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга (χ^2 и $P_{Х-В}$ -значение для теста); оценивали статистическую значимость различий между группами по распределению частот аллелей и генотипов (тест χ^2 на однородность выборок и P -значение для теста); при попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля использовали двусторонний тест Фишера. Логистическую регрессию использовали для выявления ассоциации полиморфных вариантов изученных генов с развитием ХОБЛ; экспоненту отдельного коэффициента регрессии (β) интерпретировали как отношение шансов (OR) с расчетом 95%-ного доверительного интервала. Для минимизации статистической ошибки первого типа использовали процедуру False discovery rate (FDR) (Benjamini Hochberg), используя онлайн калькулятор <http://www.sdmproject.com/utilities/?show=FDR>, и получали новое значение $P_{FDR-corr}$. Вклад аллельных вариантов изучаемых генов-кандидатов в вариabельность количественных признаков, характеризующих тяжесть течения заболевания (показателей функции внешнего дыхания — ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ОФВ1), определяли с помощью критерия Крускала–Уоллиса (в случае трех групп) или Манна–Уитни (в случае двух групп), расчеты проводили по программе Statistica v. 6.0 program (StatSoft Inc., USA) [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Прежде чем приступить к анализу ассоциации аллельных вариантов генов-кандидатов с развитием ХОБЛ, была проведена проверка соответ-

ствия распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга. Для группы контроля были получены следующие результаты: *CCL11* (rs16969415С>Т) ($P_{Х-В}$ = 0.99), *SAAI* (rs1136743С>Т) ($P_{Х-В}$ = 0.52), *CX3CR1* (rs3732378А>G) ($P_{Х-В}$ = 0.11), *PECAM1* (rs281865545G>C) ($P_{Х-В}$ = 0.13), *ICAM1* (rs5498А>G) ($P_{Х-В}$ = 0.11), *CCR5* (*del32*) ($P_{Х-В}$ = 0.99), *CCL5* (rs2107538G>А) ($P_{Х-В}$ = 0.33), *CXCL12* (rs1801157А>G) ($P_{Х-В}$ = 0.61), *CCL2* (rs1024611А>G) ($P_{Х-В}$ = 0.074), *CCL17* (rs223828Т>C) ($P_{Х-В}$ = 0.22).

Анализ ассоциации аллельных вариантов генов-кандидатов с развитием ХОБЛ

Нами изучена ассоциация генотипов и аллелей генов *CCL11* (rs16969415С>Т), *SAAI* (rs1136743С>Т), *CX3CR1* (rs3732378А>G), *PECAM1* (rs281865545G>C), *ICAM1* (rs5498А>G), *CCR5* (*del32*), *CCL5* (rs2107538G>А), *CXCL12* (rs1801157А>G), *CCL2* (rs1024611А>G), *CCL17* (rs223828Т>C) с развитием ХОБЛ (табл. 1).

Между группами больных и здоровых индивидов выявлены статистически значимые различия в распределении частот генотипов генов *SAAI* (rs1136743С>Т) (χ^2 = 50.89, P = 0.00001), *PECAM1* (rs281865545G>C) (χ^2 = 8.254, P = 0.016), *ICAM1* (rs5498А>G) (χ^2 = 27.242, P = 0.00001) и *CCL2* (rs1024611А>G) (χ^2 = 7.37, P = 0.025).

Ассоциация с развитием ХОБЛ была установлена для аллеля С (P = 0.0001, $P_{cor-FDR}$ = 0.0003, OR = 1.58 95% CI 1.31–1.91) генотипа ТС (P = 0.00001, $P_{cor-FDR}$ = 0.00005, OR = 2.15 95% CI 1.54–2.84) гена *SAAI* (rs1136743С>Т).

Частота генотипа CG гена *PECAM1* (rs281865545G>C) была значимо выше в группе больных ХОБЛ (52.47% против 44.86% в контроле, P = 0.028, $P_{cor-FDR}$ = 0.043, OR = 1.36 95% CI 1.04–1.77).

Аллель G и генотип GG гена *ICAM1* (rs5498А>G) ассоциированы с развитием ХОБЛ (P = 0.0001, $P_{cor-FDR}$ = 0.0003, OR = 1.64 95% CI 1.35–1.98 и P = 0.005, $P_{cor-FDR}$ = 0.014, OR = 1.66 95% CI 1.17–2.36).

Риск развития ХОБЛ связан с аллелем А гена *CCL2* (rs1024611А>G) (P = 0.012, $P_{cor-FDR}$ = 0.022, OR = 1.30 95% CI 1.06–1.58).

Сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей между группами больных ХОБЛ и контроля по полиморфным вариантам генов *CCL11* (rs16969415С>Т), *CX3CR1* (rs3732378А>G), *CCR5* (*del32*), *CCL5* (rs2107538G>А), *CXCL12* (rs1801157А>G), *CCL17* (rs223828Т>C) статистически значимых различий не дал (табл. 1).

Таблица 1. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов-кандидатов в группах ХОБЛ и контроля, анализ ассоциации с развитием заболевания

Ген, полиморфный вариант	Генотипы, аллели	ХОБЛ абс. (%) (<i>N</i> = 425)	Контроль абс. (%) (<i>N</i> = 457)	<i>P</i>	<i>P</i> _{cor-FDR}	OR (95% CI)
<i>CCL11</i> с.-426C>T rs16969415	CC	379 (89.18)	406 (88.84)	0.959	—	1.03 (0.67–1.58)
	CT	43 (10.12)	49 (10.72)	0.855	—	0.93 (0.61–1.44)
	TT	3 (0.71)	2 (0.44)	0.935	—	1.61 (0.27–1.71)
	C T	801 (94.24) 49 (5.76)	861 (94.20) 53 (5.80)	0.945	—	1.0 (0.67–1.50) 0.99 (0.66–1.48)
<i>SAAI</i> с.209C>T p.Ala70Val rs1136743	TT	57 (13.41)	159 (34.79)	0.00001	0.00005	0.31 (0.22–0.43)
	TC	287 (67.53)	225 (49.23)	0.00001	0.00005	2.15 (1.54–2.84)
	CC	81 (19.06)	73 (15.97)	0.45	—	1.16 (0.81–1.65)
	T C	401 (47.18) 449 (52.82)	543 (59.41) 371 (40.59)	0.0001	0.0003	0.63 (0.52–0.76) 1.58 (1.31–1.91)
<i>CX3CR1</i> с.839G>A p.Thr280Met rs3732378	GG	266 (62.59)	269 (58.86)	0.288	—	1.16 (0.89–1.53)
	GA	141 (33.18)	172 (37.64)	0.189	—	0.82 (0.62–1.08)
	AA	18 (4.24)	16 (3.50)	0.696	—	1.21 (0.61–2.42)
	G A	673 (79.18) 177 (20.82)	710 (77.68) 204 (22.32)	0.481	—	1.09 (0.87–1.37) 0.91 (0.72–1.14)
<i>PECAM1</i> с.373G>C p.Val125Leu rs281865545	CC	145 (34.12)	161 (35.23)	0.783	—	0.95 (0.72–1.26)
	CG	223 (52.47)	205 (44.86)	0.028	0.043	1.36 (1.04–1.77)
	GG	57 (13.41)	91 (19.91)	0.013	0.022	0.62 (0.43–0.89)
	C G	513 (60.35) 337 (39.65)	527 (57.66) 387 (42.34)	0.271	—	1.12 (0.92–1.35) 0.89 (0.73–1.08)
<i>ICAM1</i> с.1405A>G p.Lys469Glu rs5498	AA	117 (27.53)	201 (43.98)	0.00001	0.00005	0.48 (0.36–0.64)
	AG	216 (50.82)	191 (41.79)	0.009	0.021	1.44 (1.10–1.88)
	GG	92 (21.65)	65 (14.22)	0.005	0.014	1.66 (1.17–2.36)
	A G	450 (52.94) 400 (47.06)	593 (64.88) 321 (35.12)	0.0001	0.0003	0.60 (0.50–0.73) 1.64 (1.35–1.98)
<i>CCR5</i> <i>del32</i>	NN	332 (78.12)	380 (83.15)	0.071	—	0.72 (0.51–1.01)
	ND	89 (20.94)	73 (15.97)	0.069	—	1.39 (0.98–1.96)
	DD	4 (0.94)	4 (0.88)	0.801	—	1.07 (0.26–4.32)
	N D	753 (88.59) 97 (11.41)	833 (91.14) 81 (8.86)	0.09	—	0.75 (0.55–1.03) 1.32 (0.97–1.8)
<i>CCL5</i> с.-471G>A rs2107538G>A	GG	259 (60.94)	290 (63.46)	0.483	—	0.89 (0.68–1.17)
	GA	147 (34.59)	153 (33.48)	0.782	—	1.05 (0.79–1.38)
	AA	19 (4.47)	14 (3.06)	0.084	—	1.96 (0.97–3.97)
	G A	665 (78.24) 185 (21.76)	733 (80.20) 181 (19.80)	0.339	—	0.88 (0.71–1.11) 1.12 (0.89–1.41)
<i>CXCL12</i> с.*519G>A rs1801157A>G	GG	220 (51.76)	243 (53.17)	0.726	—	3.23 (2.54–4.11)
	GA	170 (40.00)	177 (38.73)	0.752	—	1.05 (0.80–1.38)
	AA	35 (8.24)	37 (8.10)	0.962	—	1.01 (0.62–1.65)
	G A	610 (71.76) 240 (28.24)	663 (72.54) 251 (27.46)	0.757	—	0.96 (0.78–1.18) 1.03 (0.84–1.27)

Таблица 1. Окончание

Ген, полиморфный вариант	Генотипы, аллели	ХОБЛ абс. (%) (N = 425)	Контроль абс. (%) (N = 457)	P	P _{cor-FDR}	OR (95% CI)
<i>CCL2</i> g.2493A>G rs1024611A>G	AA	204 (48.00)	193 (42.23)	0.313	—	0.86 (0.67–1.12)
	AG	178 (41.88)	191 (41.79)	0.967	—	1.00 (0.77–1.31)
	GG	43 (10.12)	73 (15.97)	0.013	0.022	0.52 (0.39–0.88)
	A G	586 (68.94) 264 (31.06)	577 (63.13) 337 (36.87)	0.012	0.022	1.30 (1.06–1.58) 0.77 (0.63–0.94)
<i>CCL17</i> c.-59-372T>C rs223828T>C	CC	320 (75.29)	339 (74.18)	0.762	—	1.06 (0.78–1.43)
	CT	94 (22.12)	111 (24.29)	0.495	—	0.88 (0.64–1.21)
	TT	11 (2.59)	7 (1.53)	0.384	—	1.71 (0.65–4.44)
	C T	734 (86.35) 116 (13.65)	789 (86.32) 125 (13.68)	0.959	—	0.99 (0.76–1.31) 0.99 (0.76–1.30)

Примечание. *P* — значение для двустороннего теста Фишера при попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля; OR — показатель отношения шансов, 95% CI — 95%-ный доверительный интервал для OR; *P*_{cor-FDR} — значимость теста после коррекции False discovery rate (FDR).

Анализ взаимодействий средовых и генетических факторов при формировании ХОБЛ

Анализ взаимодействий средовых и генетических факторов проводился путем сопоставления величин отношения шансов, рассчитанных для аллельных вариантов генов-кандидатов в группах, сформированных по критерию наличия или отсутствия влияния фактора среды (статус курения). В табл. 2 приведены статистически значимые результаты анализа ассоциации изученных генов-кандидатов с развитием ХОБЛ в группах, дифференцированных по статусу курения.

Маркером риска развития ХОБЛ в группе курильщиков является генотип CG гена *PECAM1* (rs281865545G>C) (*P* = 0.03, *P*_{cor-FDR} = 0.037, OR = 1.42 95% CI 1.01–2.00). Частота аллеля G гена *ICAM1* (rs5498A>G) достигала 45.02% в группе курильщиков, больных ХОБЛ, тогда как у здоровых курильщиков его частота составила 34.16% (*P* = 0.0001, *P*_{cor-FDR} = 0.0002, OR = 1.58 95% CI 1.26–1.97). Риск развития ХОБЛ в группе курильщиков был связан с генотипом GG гена *ICAM1* (rs5498A>G) (*P* = 0.013, *P*_{cor-FDR} = 0.022, OR = 1.75 95% CI 1.09–2.81). Частота аллеля C гена *SAAI* (rs1136743C>T) в группе курильщиков, больных ХОБЛ, составила 51.21% против 40.22% в контрольной группе (*P* = 0.00001, *P*_{cor-FDR} = 0.00007, OR = 1.56 95% CI 1.25–1.94). Риск развития заболевания у курильщиков связан с генотипом TC (*P* = 0.0001, *P*_{cor-FDR} = 0.0003, OR = 2.55 95% CI 1.80–3.60).

В группе некурящих индивидов риск развития заболевания связан с генотипом CC гена *SAAI* (rs1136743C>T) (*P* = 0.017, *P*_{cor-FDR} = 0.026, OR = 2.33 95% CI 1.20–4.53). Значимые ассоциации

с развитием ХОБЛ только среди некурящих индивидов были получены для аллеля A (*P* = 0.005, *P*_{cor-FDR} = 0.009, OR = 1.84 95% CI 1.22–2.79) и генотипа AA (*P* = 0.037, *P*_{cor-FDR} = 0.042, OR = 1.82 95% CI 1.07–3.10) гена *CCL2* (rs1024611A>G).

Анализ вклада аллельных вариантов генов-кандидатов в вариативность количественных показателей функции внешнего дыхания

Проведен анализ количественных показателей функции внешнего дыхания: жизненной емкости легких (ЖЕЛ), форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) и объема форсированного выдоха в 1 с (ОФВ1), отражающих прогрессирование заболевания, в зависимости от аллельных вариантов изученных генов-кандидатов. Генотип GG гена *PECAM1* (rs281865545G>C) и генотип AA гена *CX3CR1* (rs3732378A>G) ассоциированы с более высокими показателями ЖЕЛ (*P* = 0.014 и *P* = 0.04) (см. табл. 3). У индивидов с генотипом GG гена *ICAM1* (rs5498A>G) было отмечено снижение показателей ОФВ1 и ФЖЕЛ (*P* = 0.025 и *P* = 0.029). Тогда как для индивидов с гетерозиготным генотипом гена *ICAM1* (rs5498A>G) были отмечены более высокие показатели ОФВ1 и ФЖЕЛ (*P* = 0.0013 и *P* = 0.0012).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен анализ ассоциации аллельных вариантов генов хемокинов и хемокиновых рецепторов: *CCL11* (rs16969415C>T), *CX3CR1* (rs3732378A>G), *CCR5* (del32), *CCL5* (rs2107538G>A), *CXCL12* (rs1801157A>G), *CCL2* (rs1024611A>G), *CCL17* (rs223828T>C); молекул адгезии: *PECAM1*

Таблица 2. Результаты анализа ассоциации аллельных вариантов генов-кандидатов с развитием ХОБЛ в группах, дифференцированных по статусу курения

Ген, полиморфный вариант	Генотипы, аллели	ХОБЛ абс. (%)	Контроль абс. (%)	<i>P</i>	<i>P</i> _{cor-FDR}	OR (95% CI)
Курильщики						
		(<i>N</i> = 331)	(<i>N</i> = 322)			
<i>PECAM1</i> c.373G>C p.Val125Leu rs281865545	CC	112 (33.84)	117 (36.33)	0.557	—	0.89 (0.64–1.24)
	CG	172 (51.96)	139 (43.16)	0.03	0.037	1.42 (1.01–2.00)
	GG	47 (14.20)	66 (20.51)	0.043	0.046	0.64 (0.42–0.60)
	C G	396 (59.82) 266 (40.18)	373 (57.92) 271 (42.08)	0.411	—	1.08 (0.86–1.34) 0.92 (0.74–1.15)
<i>ICAM1</i> c.1405A>G rs5498	AA	100 (30.21)	143 (44.41)	0.0007	0.0015	0.54 (0.39–0.74)
	AG	164 (49.55)	138 (42.86)	0.102	—	1.31 (0.96–1.78)
	GG	67 (20.24)	41 (12.73)	0.013	0.022	1.75 (1.09–2.81)
	A G	364 (54.98) 298 (45.02)	424 (65.84) 220 (34.16)	0.0001	0.0003	0.63 (0.51–0.79) 1.58 (1.26–1.97)
<i>SAA1</i> c.209C>T p.Ala70Val rs1136743	TT	47 (14.20)	117 (36.34)	0.0001	0.0003	0.28 (0.19–0.42)
	TC	229 (69.18)	151 (46.89)	0.0001	0.0003	2.55 (1.80–3.60)
	CC	55 (16.62)	54 (16.77)	0.625	—	0.88 (0.58–1.33)
	T C	323 (48.79) 339 (51.21)	385 (59.78) 259 (40.22)	0.00001	0.00007	0.64 (0.51–0.79) 1.56 (1.25–1.94)
Некурящие						
		(<i>N</i> = 94)	(<i>N</i> = 135)			
<i>SAA1</i> c.209C>T p.Ala70Val rs1136743	TT	10 (10.64)	42 (31.11)	0.0001	0.0003	0.26 (0.12–0.55)
	TC	58 (61.70)	74 (54.81)	0.367	—	1.32 (0.77–2.27)
	CC	26 (27.66)	19 (14.07)	0.017	0.026	2.33 (1.20–4.53)
	T C	78 (41.49) 110 (58.51)	158 (58.52) 112 (41.48)	0.00001	0.00007	0.50 (0.34–0.73) 1.99 (1.36–2.90)
<i>CCL2</i> g.2493A>G rs1024611	AA	53 (56.38)	56 (41.48)	0.037	0.042	1.82 (1.07–3.10)
	AG	36 (38.30)	57 (42.22)	0.647	—	0.84 (0.49–1.45)
	GG	5 (5.32)	22 (16.30)	0.02	0.027	0.28 (0.10–0.70)
	A G	142 (75.53) 46 (24.47)	169 (62.59) 101 (37.41)	0.005	0.009	1.84 (1.22–2.79) 0.54 (0.36–0.82)

Примечание. *P* – значение для двустороннего теста Фишера при попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля; OR – показатель отношения шансов, 95% CI – 95%-ный доверительный интервал для OR; *P*_{cor-FDR} – значимость теста после коррекции False discovery rate (FDR).

(rs281865545G>C), *ICAM1* (rs5498A>G) и сывороточного амилоидного белка *SAA1* (rs1136743C>T) с развитием ХОБЛ в популяции татар.

Наиболее значимые ассоциации с развитием заболевания в целом и в группах, дифференцированных по статусу курения, были установлены для аллельных вариантов гена *SAA1* (rs1136743), кодирующего сывороточный амилоидный A1-белок [5]. У человека имеется четыре гена *SAA* (*SAA1*, *SAA2*, *SAA3* и *SAA4*), локализованных на хромосоме 11p15.1. Среди них *SAA1* и *SAA2* кодируют белок острой фазы воспаления – сыворо-

точный амилоидный A-белок. *SAA4* – конститутивно экспрессирующийся родственный белок *SAA*, который не реагирует на воспалительные стимулы, а *SSA3* является псевдогеном. Ген *SAA1* содержит четыре экзона, кодирующая последовательность охватывает второй, третий и часть четвертого экзона. Полиморфный вариант rs1136743, 209C>T гена *SAA1* находится в 3-м экзоне, приводит к замене аланина на валин в молекуле белка (p.Ala70Val) [5, 15]. Нами установлено, что аллель С и генотип ТС полиморфного варианта rs1136743C>T гена *SAA1* являются маркерами рис-

Таблица 3. Зависимость количественных показателей, характеризующих функцию внешнего дыхания, от аллельных вариантов изученных генов-кандидатов

Ген, полиморфный вариант	Генотип	<i>N</i>	<i>M</i> ± <i>S.E.</i>	<i>P</i>
ЖЕЛ (жизненная емкость легких) (<i>N</i> = 425)				
<i>PECAM1</i> c.373G>C p.Val125Leu rs281865545	CC	136	51.79 (2.09)	0.041
	CG	238	50.36 (1.41)	
	GG	51	59.17 (3.01)	
	(CC+CG)	374	50.88 (1.17)	0.014
	GG	51	59.17 (3.01)	
<i>CX3CR1</i> c.839G>A p.Thr280Met rs3732378	(GG+GA)	412	51.74 (1.03)	0.04
	AA	13	62.69 (5.13)	
	ОФВ1 (объем форсированного выдоха в 1 с) (<i>N</i> = 425)			
<i>ICAM1</i> c.1405A>G rs5498	AA	102	37.5 (2.06)	0.005
	AG	221	43.47 (1.5)	
	GG	102	36.1 (1.91)	
	(AA+AG)	23	41.55 (1.23)	0.025
	GG	102	36.1 (1.91)	
	(AA+GG)	204	36.8 (1.4)	0.0013
	AG	221	43.47 (1.5)	
ФЖЕЛ (форсированная жизненная емкость легких) (<i>N</i> = 425)				
<i>ICAM1</i> c.1405A>G rs5498	AA	110	47.25 (2.53)	0.0045
	AG	221	54.66 (1.77)	
	GG	94	45.42 (2.45)	
	(AA+AG)	331	52.18 (1.47)	0.029
	GG	94	45.42 (2.45)	
	(AA+GG)	204	46.42 (1.77)	0.0012
	AG	221	54.66 (1.77)	

Примечание: *M* ± *S.E.* – средние значения и стандартная ошибка среднего, *P* – уровень значимости для критерия Манна–Уитни или Крускала–Уоллиса.

ка развития ХОБЛ, данная ассоциация сохраняла свою значимость после коррекции на множественность сравнений и была подтверждена в группах, дифференцированных по статусу курения. Ранее ассоциативных исследований полиморфных локусов гена *SAA1* с ХОБЛ не проводилось, но в работе [18] было установлено, что продукция С-реактивного белка и SAA увеличена в паренхиме легких и бронхах у больных ХОБЛ [18]. В исследовании [19] было показано, что SAA активно продуцируется в эндотелиальных клетках и макрофагах нормальной легочной ткани. Доказано, что сосудистая система легких является основным местом продукции белков SAA и С-реактивного белка и источником системного воспаления при ХОБЛ [18].

В результате проведенного исследования нами установлена ассоциация аллельных вариантов генов молекул адгезии *ICAM1* и *PECAM1* с развитием ХОБЛ и показателями, характеризующими функцию внешнего дыхания и прогрессирование заболевания. Риск развития ХОБЛ был связан с аллелем G и генотипом GG гена *ICAM1* (rs5498A>G). Кроме того, нами была показана зависимость показателей функции внешнего дыхания от генотипов данного гена. Так, у гомозигот GG гена *ICAM1* (rs5498A>G) установлены более низкие показатели объема форсированного выдоха в 1 с (ОФВ1) и форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), что согласуется с результатами анализа ассоциации с развитием заболевания в целом. Ген *ICAM1* (rs5498A>G) локализован на

участке 19p13.2 [15], кодирует мембранный белок, содержащий пять Ig-подобных внеклеточных доменов. ICAM1 индуцируется медиаторами воспаления, такими как IL-1, TNF α и IFN γ [9]. Полиморфный вариант rs5498A>G в экзоне 6 приводит к замене в аминокислотной последовательности белкового продукта (p.Lys469Glu) [7]. Ассоциация с развитием ХОБЛ была выявлена для полиморфного варианта rs281865545 (с.373G>C) гена *PECAM1*. Гетерозиготный генотип был связан с развитием заболевания в общей группе и у курильщиков. У носителей генотипа GG также отмечены более высокие показатели жизненной емкости легких (ЖЕЛ) и снижен риск развития ХОБЛ. Ген *PECAM1*, локализованный на хромосоме 17q23.3, кодирует молекулу межклеточной адгезии PECAM1 [15]. С участием PECAM1 осуществляется миграция лейкоцитов через межклеточное пространство эндотелиальных клеток сосудов [10]. Однонуклеотидная замена rs281865545 (с.373G>C) в 3-м экзоне гена *PECAM1* приводит к изменению в полипептидной последовательности валина на лейцин в 125-м кодоне (p.Val125Leu), что отражается на функции PECAM1 [15]. Вклад аллельных вариантов генов молекул адгезии в развитие ХОБЛ ранее не изучался. Переход местного воспаления в легочной ткани при ХОБЛ в хроническое системное воспаление может быть связан с высокой проницаемостью сосудов легких у больных, что приводит к выбросу провоспалительных факторов в системный кровоток [2, 11]. Все полученные ранее данные и результаты нашего исследования подтверждают, что аллельные варианты генов молекул адгезии *ICAM1* и *PECAM1* могут быть важным фактором риска возникновения и прогрессирования заболеваний, связанных хроническим системным воспалением, в частности ХОБЛ.

Макрофаги являются одним из основных факторов развития воспаления при ХОБЛ вследствие способности продуцировать провоспалительные цитокины и хемокины [11–13]. Макрофаги секретируют CCL2, что, в свою очередь, приводит к рекрутингу моноцитов в легкие, которые впоследствии дифференцируются в макрофаги. Среди провоспалительных СС-хемокинов ключевая роль в инициации и развитии воспалительных процессов, обусловленных преимущественной активностью моноцитов, принадлежит хемокинам CCL2 и CCL5 [13]. В нашем исследовании установлено, что аллель А гена *CCL2* (rs1024611A>G) статистически значимо ассоциирован с развитием ХОБЛ. Более детальный анализ подтвердил ассоциацию генотипа AA с развитием ХОБЛ только в группе некурящих индивидов. Ген *CCL2* локализован на 17q11.2-q12 хромосоме [15]. CCL2 — хемотаксический фактор моноцитов 1 (monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)), продуцируется моноцитами, макрофагами и дендритными клетками после их активации.

CCL2 играет ключевую роль в привлечении макрофагов, базофилов, Т-лимфоцитов к очагу воспаления, участвует в активации матриксных металлопротеаз, играющих ключевую роль в процессах ремоделирования легочной ткани при ХОБЛ [13, 20]. Полиморфный вариант rs1024611A>G (–2518A>G) находится в регуляторном участке гена *CCL2* [20]. Показано, что аллель G связан с увеличением уровня CCL2 в сыворотке и плазме [20]. Ассоциация генотипа GG гена *CCL2* (rs1024611A>G) с развитием ХОБЛ ранее была показана в популяции Китая [21]. С другой стороны, в исследованиях [22] и [23] ассоциации аллельных вариантов гена *CCL2* (rs1024611A>G) с развитием ХОБЛ в популяциях Тайваня и Франции выявлено не было.

Была установлена зависимость количественного показателя, характеризующего жизненную емкость легких (ЖЕЛ) от аллельных вариантов гена *CX3CR1* (rs3732378G>A). Индивиды с генотипом AA имели значимо более высокие показатели ЖЕЛ. CX3CR1 — хемокиновый рецептор, представленный на моноцитах, активированных Т-клетках, натуральных киллерах, дендритных клетках [13]. Кодируется геном *CX3CR1* (3p22.2), является специфическим рецептором для хемокина CX3CL1 (fractalkine), который действует как хемоаттрактант, приводя к адгезии, миграции и пролиферации активированных воспалительных клеток [15]. Однонуклеотидная замена rs3732378G>A в последовательности гена *CX3CR1* приводит к аминокислотной замене p.Thr280Met [15]. В работе [24] было продемонстрировано, что аллель А, или метионин в аминокислотной последовательности рецептора, ассоциирует с низким уровнем клеточной адгезии и хемотаксисом лейкоцитов. Моноциты/макрофаги, несущие рецептор CX3CR1, активно мигрируют через эндотелий сосудов легких, накапливаются в стенках сосудов легких и паренхиме [13, 24]. Инфильтрация иммунных клеток приводит к высвобождению медиаторов воспаления и ремоделированию легочной ткани, стимулируя пролиферацию воспалительных клеток [2].

Полученные результаты представляют интерес для понимания молекулярных механизмов развития ХОБЛ. Установлено, что аллельные варианты гена *CCL2*, молекул адгезии (*PECAM1*, *ICAM1*) и сывороточного амилоидного белка (*SAAI*) являются маркерами риска развития ХОБЛ в популяции татар. Установлено, что генотипы генов *PECAM1*, *ICAM1* и *CX3CR1* ассоциированы с показателями функции внешнего дыхания, отражающими прогрессирование ХОБЛ.

Исследование частично поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (№ 18-015-00050); биологический материал (ДНК) для исследования взят из коллекции “Коллекция биологических материалов человека

ИБГ УНЦ РАН” ИБГ УНЦ РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Биомика” и УНУ “КОДИНК” (ИБГ УФИЦ РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2017. Available from: <http://goldcopd.org>.
2. Barnes P.J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD // Clin. Sci. (Lond.). 2017. V. 131. № 13. P. 1541–1558. doi 10.1042/CS20160487
3. Busch R., Cho M.H., Silverman E.K. Progress in disease progression genetics: dissecting the genetic origins of lung function decline in COPD // Thorax. 2017. V. 72. № 5. P. 389–390. doi 10.1136/thoraxjnl-2016-209666
4. Calero C., Arellano E., Lopez-Villalobos J.L. et al. Differential expression of C-reactive protein and serum amyloid A in different cell types in the lung tissue of chronic obstructive pulmonary disease patients // BMC Pulm. Med. 2014. V. 14. P.95. doi 10.1186/1471-2466-14-95
5. Sun L., Ye R.D. Serum amyloid A1: Structure, function and gene polymorphism // Gene. 2016. V. 583. № 1. P. 48–57. doi 10.1016/j.gene.2016.02.044
6. De Buck M., Gouwy M., Wang J.M. et al. Structure and expression of different serum amyloid A (SAA) variants and their concentration-dependent functions during host insults // Curr. Med. Chem. 2016. V. 23. № 17. P. 1725–1755. doi 10.2174/0929867323666160418114600
7. Buraczynska M., Zaluska W., Baranowicz-Gaszczyk I. et al. The intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene polymorphism K469E in end-stage renal disease patients with cardiovascular disease // Hum. Immunol. 2012. V. 73. № 8. P. 824–828. doi 10.1016/j.humimm.2012.05.007
8. Zhou X., Zhu L., Lizarraga R., Chen Y. Human airway epithelial cells direct significant rhinovirus replication in monocytic cells by enhancing ICAM1 expression // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2017. V. 57. № 2. P. 216–225. doi 10.1165/rcmb.2016-0271OC
9. Holder A.L., Wolf S., Walshe C. et al. Expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1 is determined by genotype: effects on efficiency of leukocyte adhesion to human endothelial cells // Hum. Immunol. 2008. V. 69. № 2. P. 71–78. doi 10.1016/j.humimm.2007.12.004
10. Privratsky J.R., Newman P.J. Pecam-1: regulator of endothelial junctional integrity // Cell Tissue Res. 2014. V. 355. P. 607–619. doi 10.1007/s00441-013-1779-3
11. Hackett T.L., Holloway R., Holgate S.T., Warner J.A. Dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine release during acute inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: an *ex vivo* study // Respir. Res. 2008. V. 29. № 9. P. 47. doi 10.1186/1465-9921-9-47
12. Sokol C.L., Luster A.D. The chemokine system in innate immunity // Cold Spring Harb. Perspect Biol. 2015. V. 7. № 5. pii: a016303. doi 10.1101/cshperspect.a016303
13. Ярилин А.А. Иммунология: Учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.
14. International statistical classification of diseases and related health problems, tenth revision (ICD-10 <http://www.who.int/classifications/icd/en/>).
15. Open database of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and multiple small-scale variations that include insertions/deletions, microsatellites, and non-polymorphic variants. Bethesda (MD): The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information (US). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.
16. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis // Am. J. Hum. Genet. 2007. V. 81. P. 559–575. doi 10.1086/519795
17. Statistica v. 6.0 program (StatSoft Inc., USA) (<http://www.statistica.com>).
18. López-Campos J.L., Calero C., Rojano B. et al. C-reactive protein and serum amyloid a overexpression in lung tissues of chronic obstructive pulmonary disease patients: a case-control study // Int. J. Med. Sci. 2013. V. 10. № 8. P. 938–947. doi 10.7150/ijms.6152
19. Urieli-Shoval S., Cohen P., Eisenberg S., Matzner Y. Widespread expression of serum amyloid A in histologically normal human tissues. Predominant localization to the epithelium // J. Histochem. Cytochem.: Official J. Histochem. Soc. 1998. V. 46. P. 1377–1384.
20. Pham M.H., Bonello G.B., Castiblanco J. et al. The rs1024611 regulatory region polymorphism is associated with CCL2 allelic expression imbalance // PLoS One. 2012. V. 7. P. e49498. doi 10.1371/journal.pone.0049498
21. Bai J., Song H., Cai C. et al. The association of monocyte chemotactic protein-1 and CC chemokine receptor 2 gene variants with chronic obstructive pulmonary disease // DNA Cell Biol. 2012. V. 31. № 6. P. 1058–1063. doi 10.1089/dna.2011.1520
22. Liu S.F., Wang C.C., Fang W.F. MCP1-2518 polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease in Taiwanese men // Exptl Lung. Res. 2010. V. 36. № 5. P. 277–283. doi 10.3109/01902140903575989
23. Chaouat A., Savale L., Chouaid C. et al. Role for interleukin-6 in COPD-related pulmonary hypertension // Chest. 2009. V. 136. № 3. P. 678–687. doi 10.1378/chest.08-2420
24. McComb J.G., Ranganathan M., Liu X.H. CX3CL1 up-regulation is associated with recruitment of CX3CR1+ mononuclear phagocytes and T lymphocytes in the lungs during cigarette smoke-induced emphysema // Am. J. Pathol. 2008. V. 173. № 4. P. 949–961. doi 10.2353/ajpath.2008.071034

Role of Serum Amyloid A1, Adhesion Molecules, Chemokines and Their Receptors Genes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Development

G. F. Korytina^{a,*}, L. Z. Akhmadishina^a, O. V. Kochetova^a,
Y. G. Aznabaeva^b, Sh. Z. Zagidullin^b, and T. V. Victorova^{a,b}

^a*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences (IBG UFRC RAS), Ufa, 450054 Russia*

^b*Bashkortostan State Medical University, Ufa, 450000 Russia*

*e-mail: guly_kory@mail.ru

Chronic obstructive pulmonary disease is a complex chronic inflammatory disease of the respiratory system affecting primarily distal respiratory pathways and lung parenchyma. A key phenomenon in the pathogenesis of COPD is inflammation, which may be induced by tobacco smoke, dust particles in the polluted air, or by viruses and bacteria. The contribution of chemokines and their receptors (*CCL11*, *CX3CR1*, *CCR5*, *CCL5*, *CXCL12*, *CCL2*, *CCL17*), adhesion molecules (*PECAM1*, *ICAM1*), and serum amyloid A1 (*SAAI*) genes polymorphisms to chronic obstructive pulmonary disease, and the relationship between the studied genes polymorphisms and smoking pack-years, and contribution of candidate gene polymorphisms to the variation of quantitative characteristics of the respiratory function has been assessed. The *SAAI* (rs1136743C>T) ($P = 0.0001$, OR = 1.58 for C allele) and ($P = 0.00001$, OR = 2.15 for TC genotype), *PECAM1* (rs281865545G>C) ($P = 0.028$, OR = 1.36 for CG genotype), and *ICAM1* (rs5498A>G) ($P = 0.005$, OR = 1.66 for GG genotype) were associated with significantly high risk of chronic obstructive pulmonary disease. However, the *PECAM1* (rs281865545G>C) and *ICAM1* (rs5498A>G) were associated with disease only in smokers. The relationship between AA genotype of the *CCL2* (rs1024611A>G) and chronic obstructive pulmonary disease was found in nonsmokers ($P = 0.037$, OR = 1.82). A significant genotype-dependent variation of vital capacity was observed for *PECAM1* (rs281865545G>C) GG genotype ($P = 0.014$), and *CX3CR1* (rs3732378A>G) AA genotype ($P = 0.017$). The *ICAM1* (rs5498A>G) GG genotype was associated with forced expiratory volume in 1s and forced vital capacity ($P = 0.025$ и $P = 0.029$).

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease (COPD), acute-phase protein, adhesion molecules, chemokines, systemic inflammation markers.