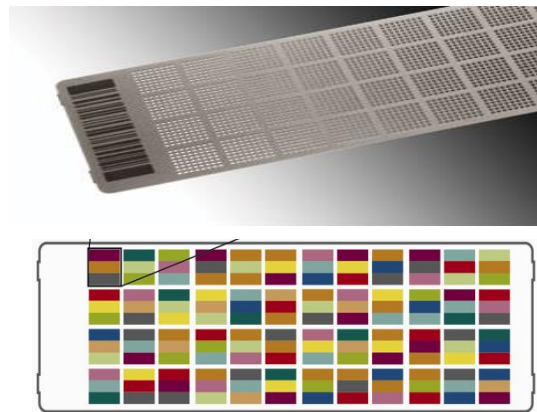


**YKSILÖLLISTEN ALTTIUSTEKIJÖIDEN MERKITYS
RAKENNUSTYÖNTEKIJÖIDEN VAIKEAN ASBESTOOSIN JA
EMFYSEEMAN SYNNYSSÄ**

Hanke nro 109374



LOPPURAPORTTI TYÖSUOJELURAHASTOLLE

**Ari Hirvonen, Mari Kukkonen, Emmi Tiili, Sirpa Hyttinen, Tapio
Vehmas, Päivi Piirilä, Panu Oksa**

Tämä raportti on julkaistu Työsuojelurahaston tuella

Tiivistelmä

Selvitimme vuosina 2005-2006 Työsuojelurahaston tuella kuuden eri vierasaineiden metaboliaan osallistuvan entsyymin geenin monimuotoisuuden (single nucleotide polymorphism; SNP) ja asbestialtistumiseen liittyvien keuhkosairauksien esiintyvyyden välistä yhteyttä asbestille altistuneilla rakennustyöntekijöillä. Hankkeen tulokset tukivat selkeästi käsitystä jonka mukaan joidenkin vierasaineiden metaboliaan osallistuvien entsyymien geenien monimuotoisuus saattaa vaikuttaa yksilölliseen riskiin sairastua asbestialtistumiseen ja tupakointiin liittyviin keuhkosairauksiin.

Nyt raportoitavassa jatkohankkeessa tutkittiin useiden tulehdukseen liittyvien proteiinien, kuten sidekudosta muokkaavien entsyymien, luonnolliseen immuunivasteeseen liittyvien proteiinien, joidenkin tulehdusvälittäjäaineiden sekä keuhkohtaumatautiin aiemmin liitettyjen proteiinien eri geenimuotojen vaikutusta tupakansavuun ja asbestialtistukseen liittyvien keuhkomuutosten synnyssä. Tutkimusaineiston kokoa ja määritettävien geenimuotojen määrää kasvatettiin selkeästi aiempaan hankkeeseen verrattuna, mikä tarjosi mahdollisuuden sekä aiempien alustavien löydösten varmistamiseen että uusien asbestialtistumiseen liittyvien keuhkosairauksien syntyyn vaikuttavien alttiustekijöiden löytämiseen.

Tutkimusaineistomme koostui 1021:sta asbestille ja tupakansavulle altistuneesta rakennustyöntekijästä, joille on tehty huolelliset kliiniset ja radiologiset tutkimukset Työterveyslaitoksella vuosina 1996-1997 (nk. ASBE-projekti) ja 2003-2004 (nk. ASSE-projekti). Työntekijöiden keuhkoista on löydetty mm. eriasteisia emfyseemaan ja fibroosiin liittyviä muutoksia, pleuran plakkeja, ja keuhkotoiminnan häiriöitä. Kaikista työntekijöistä on aiemmin kerätty verinäyte, josta on eristetty DNA geenianalyysia varten.

Kirjallisuuden perusteella tutkittavaksi valittiin 20 monimuotoisuuskohtaa 10:stä eri geenistä. Suurin osa geenianalyysistä suoritettiin TaqMan® OpenArray® Genotyping laitteistolla. Lisäksi käytimme pyrosekvensointi-menetelmää ja perinteisempää polymaraasiketjureaktioon (PCR:n) ja restriktioentsyymeihin perustuvaa PCR-RFLP menetelmää.

Keuhkoista mitattujen muuttujien ja radiologisten muutosten riippuvuutta eri geenien monimuotoisuuskohdista tarkasteltiin monimuuttuja-analyysilla (lineaarinen ja logistinen regressio). Näissä analyyseissa erityyppisten keuhkomuutosten yhteyttä tarkasteltiin yksittäisiin monimuotoisuuskohtiin, haplotyyppeihin sekä diplotyyppeihin (kahden genotyypin yhdistelmä) nähden.

Tämän hankkeen tulokset tukevat selkeästi käsitystä, jonka mukaan joidenkin sidekudosta muokkaavien entsyymien, luonnolliseen immuunivasteeseen liittyvien proteiinien, joidenkin tulehdusvälittäjäaineiden sekä keuhkohtaumatautiin aiemmin liitettyjen kandidaattigeenien monimuotoisuus voi vaikuttaa yksilölliseen riskiin sairastua asbestialtistumiseen ja tupakointiin liittyviin keuhkosairauksiin. Erityisesti sidekudoksen hajottamiseen osallistuvien proteiinien geenimuotojen yhteys emfyseeman ja sen eri alatyypin syntyyn sai vahvistusta tutkimuksistamme. Tutkimuksen tulokset tuovat siten tärkeää uutta tietoa asbestialtistumisen aiheuttamien sairauksien ja emfyseeman syntymekanismeista.

Summary

In years 2005-2006 we investigated the potential association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the xenobiotic metabolizing enzyme (XME) genes and susceptibility to asbestos exposure associated lung diseases among Finnish Caucasian construction workers. The results of this study, sponsored by the Finnish Working Environment Fund, clearly supported the suggestions that some polymorphisms in the XME genes may modify individual susceptibility to asbestos exposure and smoking associated pulmonary disorders.

Here we extended the study to investigate the genetic polymorphisms of various proteins associated with inflammation, like the connective tissue modifying enzymes, innate immunity associated proteins, some inflammation transmitters, and proteins that have previously been associated with the chronic obstructive disorder, in relation to development of asbestos and tobacco smoking associated pulmonary changes. The study size and number of studied gene polymorphisms was considerably bigger than in the previous study enabling verification of the previous findings as well as the discovery of novel susceptibility factors for asbestos exposure associated lung diseases.

Our study population consisted of 1021 asbestos and tobacco-smoke exposed construction workers, who were thoroughly clinically examined for pulmonary disorders in the Finnish Institute of Occupational Health. The examinations were carried out solely in Helsinki in 1996-1997 (ASBE-study) and both in Helsinki, Turku, and Tampere in 2003-2004 (ASSE-study). The workers had various emphysematous and fibrotic pulmonary changes, pleural plaques, and disturbances in the pulmonary function. DNA extracted from the blood samples was available for all of the workers.

Based on the literature, 20 SNPs from 10 genes were selected to be studied. Most of the genotyping analyses were performed using TaqMan® OpenArray® Genotyping instrument. In addition, we employed the pyrosequencing method and the more conventional polymerase chain reaction (PCR) and restriction enzymes based PCR-RFLP method.

The associations between genotypes and lung function parameters and radiological parameters were evaluated using linear and logistic regression analysis. In these analyses, the associations between different pulmonary changes and both single SNPs and diplotypes (combination of two genotypes) were evaluated.

The results of this study clearly indicate that genetic polymorphisms of various proteins associated with inflammation, like the connective tissue modifying enzymes, innate immunity associated proteins, some inflammation transmitters, and proteins that have previously been associated with the chronic obstructive disorder, may modify individual susceptibility to asbestos and tobacco smoking associated pulmonary changes. Especially our findings support the role of the genotypes of the proteins associated with the degradation of connective tissue in development of emphysema and emphysema sub-types. This study therefore provided important new information on the mechanisms of emphysema and asbestos associated pulmonary diseases.

SISÄLLYSLUETTELO

1. TAUSTA	2
2. TAVOITTEET	2
3. AINEISTO JA MENETELMÄT	3
3.1. Tutkimusaineisto	3
3.2. Tutkittavat geenit ja niiden monimuotoisuuskohdat	4
3.3. Geenianalyysit	5
3.4. Tilastomenetelmät	6
4. TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	6
4.1. Fibroottiset muutokset	8
4.2. Pleuran plakit	8
4.3. Emfyseemamuutokset	9
4.3.1. <i>TIMP2</i> -genotyyppi	9
4.3.2. <i>TNFα</i> -genotyyppi	9
4.3.3. <i>TGFβ1</i> ja <i>MMP9</i> -genotyyppi	10
4.3.4. <i>SERPINE2</i> -genotyyppi	10
4.4. Keuhkotoiminnan muutokset	13
5. TIEDOTUS JA MUU HYÖDYNTÄMINEN	13
6. HANKKEEN TOTEUTTAMISEEN OSALLISTUNEET HENKILÖT JA HEIDÄN TOTEUTUNEET TYÖPANOKSENSA	14
7. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	14
8. KIRJALLISUUSVIITTEET	14

1. TAUSTA

Asbestialtistumisen tiedetään aiheuttavan useita keuhkosairauksia, kuten pahanlaatuista mesoteliomaa ja keuhkofibroosia. Tarkkaa mekanismia, jolla asbestikuidut vaurioittavat keuhkoja, ei tunneta, mutta siihen uskotaan liittyvän reaktiivisten happiyhdisteiden, sytokiinien, ja muiden tekijöiden välittämä jatkuva tulehdustila [1, 2]. Reaktiivisia happiyhdisteitä syntyy asbestikuitujen ja happimolekyylien sekä fagosyyttisten solujen välisessä vuorovaikutuksessa [3]. Myös tupakansavu sisältää näitä yhdisteitä ja se lisää hapettavia aineita vapauttavien tulehdussolujen määrää keuhkoputkissa [4].

Emfyseema on pitkäaikaisiin keuhkosairauksiin luettava tila, joka usein kehittyy tupakoinnin seurauksena osana keuhkohtaumatautia (COPD). Emfyseemalle on ominaista keuhkorakkuloiden väliseinien tuhoutuminen ja elastisen rakenteen häviäminen [5]. Emfyseema jakautuu useaan alatyyppiin, jotka voidaan erottaa radiologisin menetelmin, kuten korkean resoluution tietokonetomografialla (HRCT) [6, 7].

HRCT-tekniikalla päästään hyviin tuloksiin myös asbestin aiheuttaman keuhkofibroosin eli asbestoosin tunnistamisessa ja sen vaikeusasteen määrittämisessä [8, 9]. Asbestoosi syntyy asbestikuitujen tunkeutuessa keuhkokudokseen, minkä seurauksena keuhkoihin kertyy tulehdussoluja ja ylimääräistä sidekudosta [10].

Asbestikuitujen tiedetään edistävän myös keuhkopussin plakkien syntymistä. Plakit ovat tarkkarajaisia keuhkokudoksen paksuuntumia, jotka saattavat ajan myötä kalkkeutua. Asbestialtistumisesta riippumattomat plakit ovat yleisiä normaaliväestössä [11].

Sekä emfyseema että fibroosi altistavat keuhkokudoksen toiminnalliselle häiriölle, joka kummassakin sairaudessa kehittyy omanlaisella mekanismillaan. Emfyseemassa keuhkojen ilmamäärä lisääntyy, kun taas fibroosissa keuhkotilavuus pienenee keuhkokudoksen fibroosin seurauksena [12, 13]. Yhteistä molemmille sairauksille on keuhkokudoksen toiminnan häiriön aiheuttama diffuusiokapasiteetin (DL_{CO}) pieneneminen.

2. TAVOITTEET

Selvitimme vuosina 2005-2006 Työsuojelurahaston tuella (hanke nro 105091) kuuden eri vierasaineiden metaboliaan osallistuvan entsyymin geenin monimuotoisuuden

(single nucleotide polymorphism; SNP) ja asbestialtistumiseen liittyvien keuhkosairauksien esiintyvyyden välistä yhteyttä asbestille altistuneilla työntekijöillä.

Nyt raportoitavan jatkohankkeen tavoitteena oli selvittää yksilöllisiä eroja asbestille ja tupakansavulle altistuneiden rakennustyöntekijöiden sairastumisessa. Hankkeessa tutkittiin useiden tulehdukseen liittyvien proteiinien, kuten sidekudosta muokkaavien entsyymien, luonnolliseen immuunivasteeseen liittyvien proteiinien, joidenkin tulehdusvälittäjä-aineiden sekä keuhkohtaumatautiin aiemmin liitettyjen proteiinien eri geenimuotojen vaikutusta tupakansavuun ja asbestialtistukseen liittyvien keuhkomuutosten synnyssä. Tutkimusaineiston kokoa ja määritettävien geenimuotojen määrää kasvatettiin selkeästi aiempaan hankkeeseen verrattuna, mikä tarjosi mahdollisuuden sekä aiempien alustavien löydösten varmistamiseen että uusien asbestialtistumiseen liittyvien keuhkosairauksien syntyyn vaikuttavien alttiustekijöiden löytämiseen.

3. AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1. Tutkimusaineisto

Tutkimusaineistomme koostui 1021:sta asbestille ja tupakansavulle altistuneesta rakennustyöntekijästä, joille on tehty huolelliset kliiniset ja radiologiset tutkimukset Työterveyslaitoksella vuosina 1996-1997 (nk. ASBE-projekti) ja 2003-2004 (nk. ASSE-projekti). Työntekijöiden keuhkoista on löydetty mm. eriasteisia emfyseemaan ja fibroosiin liittyviä muutoksia, pleuran plakkeja, ja keuhkotoiminnan häiriöitä. Kaikista työntekijöistä on kliinisten, radiologisten ja hengitysfysiologisten tutkimuksien yhteydessä kerätty verinäyte, josta on aiemmin eristetty DNA geenianalyysija varten.

Puutteellisten altistumistietojen johdosta analyyseistä jouduttiin jättämään pois 62 henkilöä. Tutkimusaineiston lopullinen koko vaihteli 917–944 välillä, onnistuneiden geenianalyyysien määrästä riippuen.

Alun perin tarkoituksenamme oli sisällyttää tutkimukseemme myös vertailuaineisto, jonka olisi koostunut Kansaneläkelaitoksen Tutkimus- ja kehitysyksikön keräämästä syöpävapaasta väestöverrokkiaineistosta. Päädyimme kuitenkin jättämään tämän aineiston ulos tutkimuksestamme koska siihen sisällytettyjen henkilöiden asbestialtistumisesta ja mahdollisista tupakointiin ja asbestialtistumiseen liittyvistä benigneistä keuhkosairauksista ei ollut saatavissa tarkkaa tietoa. Sen vuoksi aineiston antama lisäarvo tutkimuksellemme olisi lopulta jäänyt hyvin vähäiseksi.

3.2. Tutkittavat geenit ja niiden monimuotoisuuskohdat

Tutkittavaksi valittiin kirjallisuuden perusteella 20 monimuotoisuuskohtaa 10:stä eri geenistä (Taulukko 1).

Taulukko 1. Hankkeessa tuditut geenien monimuotoisuuskohdat

Geeni	SNP	MAF	Open array #
NALP3	rs35829419 (Lys705Gln)	0,06	C_25648615_10
	rs10925027 (C/T)	0,4	C_30713882_10
TUCAN	rs2043211 (Ter*3Cys)	0,3	C_11708080_1
	rs1062808 (T/C)	0,3	C_3218826_10
	rs2288876 (C/T)	0,3	C_15879957_10
TNF α	rs1799724 (C/T)	0,07	C_11918223_10
	rs1800629 (G/A)	0,2	C_7514879_10
TGF β 1	rs1800470 (Leu10Pro)	0,4	
	rs1800469 (C/T)	0,4	C_8708473_10
	rs2241718 (G/A)	0,1	C_7818377_1
VDBP/	rs7041 (Glu432Asp)	0,4	C_3133594_30
Gc-Globulin	rs4588 (Thr436Lys)	0,2	C_8278879_10
MMP12	rs652438 (Asn357Ser)	0,07	C_785907_10
MMP9	rs3918242 (C/T)	0,2	
MMP1	rs1799750 (-/G)	0,4	
TIMP2	rs2277698 (G/A)	0,1	C_15885241_10
SERPINE2	rs729631 (G/C)	0,2	C_803914_10
	rs975278 (C/T)	0,1	C_7614671_10
	rs6748795 (C/G)	0,2	C_1677432_10
	rs840088 (C/T)	0,4	C_7614655_10

*Minor allele frequency (harvinaisen alleelin esiintyvyys)

Asbestille altistettujen, keuhkorakkuloissa sijaitsevien alveolaaristen makrofaagien tiedetään erittävän tulehdukselle ominaisia välittäjäaineita, kuten interleukiini 1 beta (IL1 β) ja tuumorinekroositekijä alfa (TNF α). Näiden sytokiinien uskotaan olevan keskeisessä asemassa välittömän tulehdusvasteen kehittämisessä asbestialtistuksen seurauksena [14]. Alveolaaristen makrofaagien erittämä TNF α lisää transformoivan kasvutekijä beta 1:n (TGF β 1) tuotantoa. Nämä yhdessä edistävät fibroottisen kudoksen kertymistä keuhkoihin, mikä lopulta johtaa keuhkofibroosin syntyyn [15, 16]. Sekä TNF α että TGF β 1 -geenimuotojen ja keuhkohtaumataudin välillä on havaittu yhteys useissa tutkimuksissa [17-20].

Asbestin on osoitettu toimivan immunologisena vaarasignaalin ja laukaisevan luonnolliseen immuunivasteeseen liittyvän inflammasomi-kompleksin aktivaation, mikä johtaa IL1 β :n erittymiseen alveolaarisista makrofaageista [21]. Inflammasomi-kompleksiin kuuluvien NALP3- ja TUCAN-proteiinien erilaisten geenimuotojen vaikutusta puolestaan on tutkittu mm. astmassa ja Chronin taudissa [22, 23].

Matriksin metalloproteinaasit (MMP:t) puolestaan muodostavat entsyymiperheen, joiden jäsenillä on kyky muokata sidekudosta yksilönkehityksen ja tulehduksen aikana. Proteaasi-antiproteaasi-teorian mukaan keuhkohtaumataudin ja emfyseeman taustalla on epätasapaino keuhkon sidekudosta hajottavien entsyymien ja näiden inhibiittorien välillä. Useiden MMP:en eri geenimuotoja ja ilmentymistasoja on tutkittu keuhkohtaumataudin synnyssä, ja ainakin MMP1:n, MMP9:n ja MMP12:n on havaittu olevan yhteydessä ilmasteiden tulehdukseen ja emfyseeman kehittymiseen [24-26]. MMP:en inhibiittoreista keuhkohtaumataudin suhteen on tutkittu ainakin TIMP2:sta (tissue inhibitor of metalloproteinase 2) [27, 28].

D-vitamiinia sitova proteiini (DBP/Gc-globuliini) on hyvin monimuotoinen seerumin proteiini, joka sterolien sitomisen lisäksi osallistuu useisiin biologisesti tärkeisiin toimintoihin kuten rasvahappojen kuljetukseen ja makrofaagien aktivaatioon. DBP:n on arveltu toimintansa vuoksi liittyvän keuhkojen krooniseen tulehdusvasteeseen, ja sen tiettyjen geenimuotojen on osoitettu olevan yhteydessä keuhkohtaumataudin syntyyn ja vaikeusasteeseen [29, 30].

Edellä mainittujen tulehdukseen liittyvien geenien lisäksi kiinnostuksen kohteena on *SERPINE2* (serpine peptidase inhibitor, clade E, member 2), joka tunnistettiin keuhkohtaumataudin kandidaattigeeniksi vuonna 2006 genomisen sijaintinsa vuoksi [31, 32]. Myöhemmin *SERPINE2*-geeni on liitetty erityisesti keuhkoemfyseeman kehittymiseen [33, 34].

3.3. Geenianalyysit

Suurin osa geenianalyyseistä suoritettiin TaqMan® OpenArray® Genotyping laitteistolla (BioTrove Inc., Woburn, MA), joka tarjoaa moninkertaisen suorituskyvyn perinteisiin menetelmiin verrattuna ja selkeästi pienemmin kustannuksin (Taulukko 1). Tarjolla olevista vaihtoehdoista hyödynsimme levyformaattia, joka mahdollistaa kuudentoista monimuotoisuuskohdan tutkimisen yhtäaikaaisesti 144 näytteestä.

SERPINE2-geenin rs840088 SNP analysoitiin TaqMan® SNP Genotyping Assay:lla (Taulukko 1) käyttäen Applied Biosystems:in (Foster City, CA, USA) 7500 Real-Time PCR laitetta.

MMP1-geenin rs1799750 SNP:n tutkimisessa käytimme pyrosekvensointimenetelmää, ja *MMP9*-geenin monimuotoisuuden tutkimisessa perinteisempää polymeeraasi-ketjureaktioon (PCR:n) ja restriktioentsyymeihin perustuvaa PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) menetelmää.

3.4. Tilastomenetelmät

Otoksen edustavuutta koko väestöstä testattiin määrittämällä tutkimuspopulaation genotyypijakaumien poikkeamaa Hardy-Weinberg tasapainosta χ^2 -testiä käyttäen.

Keuhkoista mitattujen muuttujien ja radiologisten muutosten riippuvuutta eri geenien monimuotoisuuskohdista tarkasteltiin monimuuttuja-analyyseilla (lineaarinen ja logistinen regressio).

Eryttypisten keuhkomuutosten yhteyttä tarkasteltiin yksittäisiin monimuotoisuuskohtiin, haplotyyppeihin sekä diplotyyppeihin (kahden genotyypin yhdistelmä) nähden. Analyysit vakioitiin iän, sukupuolen, askivuosien, sekä asbestille altistumisvuosien suhteen. Keuhkotoimintamuuttujien osalta vakioitiin myös pituus (FEV_1 , FVC ja FEV_1/FVC) tai FEV_1 (DL_{CO} ja DL_{CO}/VA).

Lähekkäin esiintyvien SNP:n esiintymistä haplotyyppimäisinä blokkeina tutkittiin Haploview-ohjelmalla (versio 4.2) ja analyyseissä käytetyt haplotyytit määriteltiin PHASE-ohjelmalla (versio 2.1).

Jatkoanalyyseissa radiologiset muutokset luokiteltiin kolmella tavalla: 1) radiologisia muutoksia on tai ei ole; 2) radiologiset muutokset ovat lieviä (muuttujan arvo on alle 1, paitsi emfyseeman summamuuttuja alle 2) tai niitä ei ole; 3) radiologiset muutokset ovat vakavia (muuttujan arvo on yli 1, paitsi emfyseeman summamuuttuja yli 2) tai niitä ei ole.

Tulosten tilastollisessa tarkastelussa käytettiin SPSS for Windows -ohjelmaa (versio 15.0).

4. TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

Onnistuneiden genotyypianalyysien lukumäärät eri geenimuotojen osalta sekä eri monimuotoisuuskohtien genotyypijakaumien eroavuus Hardy-Weinberg tasapainosta on esitetty Taulukossa 2.

Koska kahden *TUCAN*-geenin monimuotoisuuskohdan (rs1062808 ja rs2288876) genotyypijakaumat eivät noudattaneet Hardy-Weinberg -jakaumaa, ne jätettiin pois jatkoanalyyseista. Lisäksi kolmannen *TUCAN*-geenin SNP:n (rs2043211) havaittiin olevan vahvasti kytkeytynyt toiseen kahdesta muusta SNP:stä (rs2288876), joten myös se jätettiin jatko-analyysien ulkopuolelle.

Taulukko 2. Onnistuneiden genotyyppianalyysien lukumäärät ja Hardy-Weinberg -tasapainolaskelmien tulokset

Geeni	SNP	Onnistuneita analyyseja (N)	HWE# (p-arvo)
NALP3	rs35829419 (Lys705Gln)	941	0.852
	rs10925027 (C/T)	926	0.603
TUCAN	rs2043211 (Ter*3Cys)	933	0.061
	rs1062808 (T/C)	941	0.009*
TNF α	rs2288876 (C/T)	938	0.000*
	rs1799724 (C/T)	939	0.604
TGF β 1	rs1800629 (G/A)	941	0.503
	rs1800470 (Leu10Pro)	944	0.816
VDBP/ Gc-Globulin	rs1800469 (C/T)	917	0.096
	rs2241718 (G/A)	935	0.201
	rs7041 (Glu432Asp)	941	0.494
MMP12	rs4588 (Thr436Lys)	940	0.443
MMP9	rs652438 (Asn357Ser)	941	0.250
MMP1	rs3918242 (C/T)	942	0.414
TIMP2	rs1799750 (-/G)	944	0.199
SERPINE2	rs2277698 (G/A)	940	0.274
	rs729631 (G/C)	940	0.769
	rs975278 (C/T)	939	0.762
	rs6748795 (C/G)	940	0.390
	rs840088 (C/T)	944	0.592

#Hardy-Weinberg tasapaino; * $p < 0.05$

Keuhkoista mitattujen muuttujien ja radiologisten muutosten riippuvuutta eri geenien monimuotoisuuskohdista tarkasteltiin ensin lineaarisella regressioanalyysillä. Havaitut yhteydet on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Eri genotyyppien yhteys keuhkomuuttujiin

Keuhkomuuttuja	Geeni	SNP	β	p-arvo
Fibroosi	NALP3	rs35829419 (Lys705Gln)	0.078	0.013
Paraseptaalinen emfyseema	TNF α	rs1800629 (G/A)	0.075	0.017
Sentrilobulaarinen emfyseema	TGF β 1	rs2241718 (G/A)	-0.071	0.022
Sentrilobulaarinen emfyseema	MMP9	rs3918242 (C/T)	-0.082	0.008
Pleuran plakit/kalkkeutumisaste	TIMP2	rs2277698 (G/A)	0.063	0.037
Emfyseema, summa	TIMP2	rs2277698 (G/A)	0.071	0.022
Paraseptaalinen emfyseema	TIMP2	rs2277698 (G/A)	0.081	0.010
FEV ₁	TIMP2	rs2277698 (G/A)	-0.066	0.035
FEV ₁ /FVC	TIMP2	rs2277698 (G/A)	-0.067	0.029
Panlobulaarinen emfyseema	SERPINE2	rs729631 (G/C)	0.094	0.003
Panlobulaarinen emfyseema	SERPINE2	rs975278 (C/T)	0.094	0.004
Panlobulaarinen emfyseema	SERPINE2	rs6748795 (C/G)	0.084	0.009

Lineaarisella regressioanalyysillä havaittuja yhteyksiä tarkasteltiin seuraavaksi lähemmin logistisella regressioanalyysillä. Näiden analyysien tulokset on esitelty alla keuhkomuutosten suhteen eriteltyinä.

4.1. Fibroottiset muutokset

NALP3 rs35829419 SNP:n harvinaisemman alleelin kantajilla todettiin n. 2,5-kertainen riski saada vakavia fibroottisia keuhkomuutoksia (OR 2.44, 95% CI 0.97-6.14), joskaan tämä yhteys ei aivan yltänyt tilastolliseen merkitsevyyteen (Taulukko 4).

Taulukko 4. *NALP3*-geenin monimuotoisuuden yhteys vakaviin fibroottisiin keuhkomuutoksiin

<i>NALP3</i> genotyyppi (rs35829419)	Ei muutoksia N (%)	Vakavia muutoksia N (%)	OR (95% CI)¹
Gln705Gln	182 (92.4)	72 (87.8)	1.0
Gln705Lys/Lys705Lys	15 (7.6)	10 (12.2)	2.44 (0.97-6.14)

¹Vakioitu iän, sukupuolen, askivuosien ja asbestille altistumisvuosien suhteen

Luonnolliseen immuunivasteeseen liittyvien proteiinien eri geenimuotoja on tutkittu keuhkosairauksien osalta hyvin vähän, eikä *NALP3*-geenin ja keuhkofibroosin välistä yhteyttä ole raportoitu aikaisemmin. Asbestin on kuitenkin osoitettu toimivan laukaisevana tekijänä inflammasomi-kompleksin aktivaatiossa, mikä johtaa IL1 β :n erittymiseen ja tulehdusvasteeseen [21]. Tätä kautta inflammasomi-kompleksiin kuuluvien proteiinien, kuten *NALP3*:n, erilaiseen toimintakykyyn johtavat geenimuutokset voivat vaikuttaa asbestialtistuksesta aiheutuvien keuhkomuutosten, kuten keuhkofibroosin, syntyyn.

4.2. Pleuran plakit

Pleuran plakkien kalkkeutumisasteen ja *TIMP2* rs2277698 SNP:n välillä lineaarisella regressioanalyysillä havaittua tilastollisesti merkitsevää yhteyttä (Taulukko 3) ei havaittu logistisella regressioanalyysillä.

TIMP2 toimii MMP-inhibiittorina estäen näitä hajottamasta sidekudosta yksilönkehityksen ja tulehduksen aikana. Toistaiseksi tutkimuksia *TIMP2*-geenin eri muotojen yhteydestä keuhkopussin plakkien muodostumiseen ja kalkkeutumiseen ei ole raportoitu. *TIMP2*-proteiinin yliekspression on kuitenkin aikaisemmin havaittu rajoittavan verisuonten plakkien muodostumista ja kasvua [35]. Siksi on hyvin mahdollista, että tutkimamme *TIMP2*-geenin monimuotoisuus vaikuttaa proteiinin ilmenemiseen, ja sitä kautta keuhkopussin plakkien muodostumisen ja hajoamisen tasapainoon.

4.3. Emfyseemamuutokset

4.3.1. *TIMP2*-genotyyppi

Tarkemmat analyysit eivät paljastaneet uusia merkitseviä yhteyksiä *TIMP2* rs2277698 SNP:n ja emfyseeman kokonaissumman välillä. Harvinaisemman alleelin kantajilla todettiin kuitenkin lähes kaksinkertainen riski (OR 1.94, 95% CI 1.14-3.30) paraseptaalisille emfyseemamuutoksille (Taulukko 5).

Taulukko 5. *TIMP2* geenin monimuotoisuuden yhteys vakaviin paraseptaalisiin emfyseemamuutoksiin

<i>TIMP2</i> genotyyppi (rs2277698)	Ei muutoksia N (%)	Vakavia muutoksia N (%)	OR (95% CI)¹
G853G	609 (78.9)	51 (67.1)	1.0
G853A/A853A	163 (21.1)	25 (32.9)	1.94 (1.14-3.30)

¹Vakioitu iän, sukupuolen, askivuosien ja asbestille altistumisvuosien suhteen

Epätasapainon keuhkojen sidekudosta hajottavien entsyymien (MMP:t) ja näiden estäjien (TIMP:it) välillä uskotaan johtavan keuhkohtaumataudin syntyyn, ja tutkimamme *TIMP2* SNP:n harvinaisempi alleeli on aikaisemmissa tutkimuksissa yhdistetty lisääntyneeseen keuhkohtaumataudin riskiin [27, 28]. Emfyseema on yksi keuhkohtaumataudin ilmenemismuodoista, joten tuloksemme tukevat tätä näkemystä. Lisäksi ne yhdistävät tutkimamme *TIMP2*-geenin muuntuneen geenimuodon erityisesti vakavien paraseptaalisten emfyseemamuutosten kehittymiseen.

4.3.2. *TNF α* -genotyyppi

TNF α rs1800629 SNP:n harvinaisemman alleelin kantajilla todettiin noin kaksinkertainen riski paraseptaalisille emfyseemamuutoksille (Taulukko 6).

Taulukko 6. *TNF α* -geenin monimuotoisuuden yhteys eriasteisiin paraseptaalisiin emfyseemamuutoksiin

<i>TNFα</i> rs1800629	Ei muutoksia, N (%)	Muutoksia, N (%)	OR (95% CI)¹
G853G	643 (77.5)	118 (65.6)	1.0
G853A/A853A	187 (22.5)	62 (34.4)	2.03 (1.38-2.98)
	Ei muutoksia, N (%)	Lieviä, N (%)	OR (95% CI)
G853G	643 (77.5)	64 (66.0)	1.0
G853A/A853A	187 (22.5)	33 (34.0)	2.12 (1.30-3.48)
	Ei muutoksia, N (%)	Vakavia, N (%)	OR (95% CI)
G853G	643 (77.5)	54 (65.1)	1.0
G853A/A853A	187 (22.5)	29 (34.9)	2.10 (1.24-3.56)

¹Vakioitu iän, sukupuolen, askivuosien ja asbestille altistumisvuosien suhteen

TNF α -geenin monimuotoisuuden, keuhkohtaumataudin ja emfyseeman suhteen on julkaistu useita tutkimuksia, joissa osassa niiden välille on löytynyt merkitsevä yhteys. Erään meta-analyysin mukaan geenin monimuotoisuuden vaikutus on kuitenkin vähäinen [19], ja toisen meta-analyysin mukaan yhteys on merkitsevä vain aasialaisissa populaatioissa [20]. Meidän tuloksemme tukevat ajatusta geenin monimuotoisuuden yhteydestä emfyseemariiskiin kaukasialaisissa populaatioissa, erityisesti paraseptaalisten emfyseemamuutosten suhteen.

4.3.3. *TGF β 1* ja *MMP9* -genotyyppi

TGF β 1 rs2241718 ja *MMP9* rs3918242 SNP:en harvinaisemman alleelin havaittiin puolittavan riskin saada vakavia sentrilobulaarisia emfyseemamuutoksia (Taulukko 7).

Taulukko 7. *TGF β 1*- ja *MMP9* -geenien monimuotoisuuksien yhteys sentrilobulaarisiin emfyseemamuutoksiin

Geeni (SNP)	Genotyyppi	Ei muutoksia N (%)	Vakavia muutoksia N (%)	OR (95% CI) ¹
<i>TGFβ1</i> (rs2241718)	G-10807G	421 (72.0)	97 (82.9)	1.0
	G-10807A/ A-10807A	164 (28.0)	20 (17.1)	0.53 (0.30-0.91)
<i>MMP9</i> (rs3918242)	C-1562C	419 (71.3)	95 (80.5)	1.0
	C-1562T/ T-1562T	169 (28.7)	23 (19.5)	0.51 (0.30-0.86)

¹Vakioitu iän, sukupuolen, askivuosien ja asbestille altistumisvuosien suhteen

Tuloksemme tukevat havaintoja joiden mukaan *TGF β 1*:n, joka on tärkeä tulehdusvälittäjäaine, eri geenimuodot vaikuttavat keuhkohtaumatauti-riskiin ja keuhkotoiminnan muutoksiin [17, 18]. Ne myös viittaavat siihen että *TGF β 1* rs2241718 SNP:n harvinaisempi alleeli suojaa sentrilobulaaristen emfyseemamuutosten kehittymiseltä.

MMP:ita on tutkittu paljon keuhkohtaumataudin suhteen, ja tutkimamme *MMP9*-geenin monimuotoisuuskohta on keuhkohtaumataudin lisäksi yhdistetty aiemmin myös yläkeuhkojen emfyseemaan [25, 26]. Tuloksemme tukevat aikaisempia havaintoja, ja viittaavat *MMP9*-geenin liittyvän erityisesti yläkeuhkoissa vallitsevien sentrilobulaaristen emfyseemamuutosten syntymiseen.

4.3.4. *SERPINE2*-genotyyppi

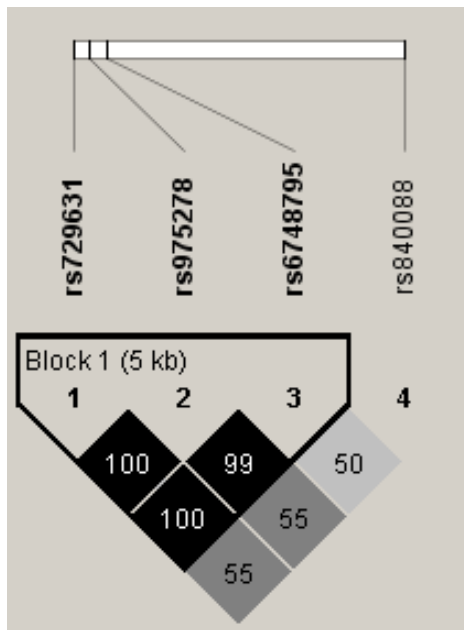
Kolmen tutkitun *SERPINE2*-geenin SNP:n (rs729631, rs975278 ja rs6748795) suhteen harvinaisemman alleelin kantajilla havaittiin lisääntynyt riski kehittää panlobulaarisia emfyseemamuutoksia, erityisesti vakavia muutoksia (Taulukko 8).

Taulukko 8. *SERPINE2*-geenin monimuotoisuuksien yhteys eriasteisiin panlobulaarisiin emfyseemamuutoksiin

SERPINE2 genotyyppi	Ei muutoksia N (%)	Muutoksia N (%)	OR (95% CI)¹
rs729631			
GG	548 (65.4)	88 (51.5)	1.0
GC	256 (30.5)	72 (42.1)	1.66 (1.53-2.38)
CC	34 (4.1)	11 (6.4)	2.22 (1.05-4.72)
rs975278			
CC	546 (65.3)	89 (51.7)	1.0
CT	256 (30.6)	72 (41.9)	1.64 (1.14-2.35)
TT	34 (4.1)	11 (6.4)	2.19 (1.03-4.66)
rs6748795			
CC	532 (63.6)	88 (51.2)	1.0
CG	271 (32.4)	73 (42.4)	1.52 (1.06-2.18)
GG	34 (4.1)	11 (6.4)	2.15 (1.01-4.57)
	Ei muutoksia N (%)	Lieviä muutoksia N (%)	OR (95% CI)
rs729631			
GG	548 (65.4)	60 (55.6)	1.0
GC	256 (30.5)	43 (39.8)	1.43 (0.93-2.20)
CC	34 (4.1)	5 (4.6)	1.43 (0.52-3.92)
rs975278			
CC	546 (65.3)	61 (56.0)	1.0
CT	256 (30.6)	43 (39.4)	1.41 (0.92-2.16)
TT	34 (4.1)	5 (4.6)	1.40 (0.51-3.86)
rs6748795			
CC	532 (63.6)	60 (55.0)	1.0
CG	271 (32.4)	44 (40.4)	1.34 (0.87-2.05)
GG	34 (4.1)	5 (4.6)	1.34 (0.51-3.82)
	Ei muutoksia N (%)	Vakavia muutoksia N (%)	OR (95% CI)
rs729631			
GG	548 (65.4)	28 (44.4)	1.0
GC	256 (30.5)	29 (46.0)	2.19 (1.23-3.91)
CC	34 (4.1)	6 (9.5)	4.37 (1.61-11.86)
rs975278			
CC	546 (65.3)	28 (44.4)	1.0
CT	256 (30.6)	29 (46.0)	2.22 (1.24-3.95)
TT	34 (4.1)	6 (9.5)	4.36 (1.61-11.85)
rs6748795			
CC	532 (63.6)	28 (44.4)	1.0
CG	271 (32.4)	29 (46.0)	2.01 (1.13-3.57)
GG	34 (4.1)	6 (9.5)	4.24 (1.56-11.51)

¹Vakioitu iän, sukupuolen, askivuosien ja asbestille altistumisvuosien suhteen

Haplotyyppianalyysissä kolmen panlobulaariseen emfyseemaan yhdistetyn *SERPINE2*-geenin monimuotoisuuden (rs729631, rs975278 ja rs6748795) havaittiin olevan toisiinsa kytkeytyneitä eli periytyvän yhdessä 99-100% todennäköisyydellä (Kuva 1). Tästä johtuen monimuotoisuuksien yhteys panlobulaariseen emfyseemaan tutkittiin myös estimoituja haplotyyppijä käyttäen.



Kuva 1. Kytkeäepätasapaino (LD) ja haplotyyppirakenne tutkittujen *SERPINE2*-geenin monimuotoisuuskohtien välillä. Luvut vinoneliöiden sisällä kertovat geenimuotojen todennäköisyyden periytyä yhdessä ($r^2 \times 100$).

Haplotyyppiin, joka koostui kolmen kytkeytyneen *SERPINE2*-geenin SNP:n harvinaisemmista geenimuodoista (GCC), havaittiin aiheuttavan 1.5-kertaisen riskin panlobulaaristen emfyseemamuutosten kehittymiselle (OR 1.54, 95% CI 1.17-2.04) (Taulukko 9). Vakavia emfyseemamuotoja tarkasteltaessa riskin todettiin kohoavan kaksinkertaiseksi (OR 2.09, 95% CI 1.38-3.16). Lievien emfyseemamuutosten suhteen riski ei ollut tilastollisesti merkitsevä (Taulukko 9).

Taulukko 9. *SERPINE2*-geenin haplotyyppien yhteys eriasteisiin panlobulaarisiin emfyseemamuutoksiin

<i>SERPINE2</i> haplotyyppi¹	Ei muutoksia N (%)²	Muutoksia N (%)²	OR (95% CI)³
GCC	1249 (79.8)	243 (72.3)	1.0
CTG	303 (19.3)	92 (27.4)	1.54 (1.17-2.04)
muut	14 (0.9)	1 (0.3)	0.29 (0.04-2.28)
	Ei muutoksia N (%)	Lieviä muutoksia N (%)	OR (95% CI)
GCC	1249 (79.8)	165 (75.7)	1.0
CTG	303 (19.3)	52 (23.9)	1.30 (0.92-1.83)
muu	14 (0.9)	1 (0.5)	0.46 (0.06-3.63)
	Ei muutoksia N (%)	Vakavia muutoksia N (%)	OR (95% CI)
GCC	1249 (79.8)	78 (66.1)	1.0
CTG	303 (19.3)	40 (33.9)	2.09 (1.38-3.16)
muut	14 (0.9)	0 (0.0)	0.00

¹Koostuu kolmesta SNP:istä: rs729631, rs975278 ja rs6748795

²Luvut on esitetty kromosomien lukumäärinä (%)

³Vakioitu iän, sukupuolen, askivuosien ja asbestille altistumisvuosien suhteen

Kuten aiemmin mainittiin, *SERPINE2*-geeni on yhdistetty keuhkohtaumataudin syntyyn [31, 32]. Tuoreimmat tutkimukset ovat vahvistaneet sen monimuotoisuuksien liittyvän erityisesti emfyseeman kehittymiseen [33, 34]. Hankkeemme tulokset tukevat tätä havaintoa, ja viittaavat *SERPINE2*-geenin monimuotoisuuden vaikuttavan erityisesti panlobulaarisiin emfyseemamuutoksiin.

SERPINE2-geenin proteiinituote, neksiini, kuuluu samaan serpiini-proteiiniperheeseen *SERPINA1*-geenin tuotteen, alfa-1-antitrypsiinin (AAT), kanssa. AAT:n vialliseen toimintaan johtava geenimuutos on ainoa varmistettu geneettinen tekijä keuhkohtaumataudin taustalla, ja sen tiedetään johtavan erityisesti panlobulaaristen emfyseemamuutosten kehittymiseen. *SERPINA1* ja *SERPINE2* sijaitsevat eri kromosomeissa, ja niiden toiminnan kohteet eroavat toisistaan. *SERPINE2*:n on arveltu johtavan keuhkomuutoksiin vuorovaikutuksessa muiden sidekudosta muokkaavien entsyymien, kuten MMP:iden kanssa [31]. Tarkka mekanismi *SERPINE2*-geenin ja panlobulaarisen emfyseeman välillä on kuitenkin vielä selvittämättä.

4.4. Keuhkotoiminnan muutokset

TIMP2 rs2277698 SNP:n ja kahden keuhkotoimintaa kuvaavan muuttujan, FEV₁:n ja FEV₁/FVC:n, välillä havaittu tilastollisesti merkitsevä yhteys ($p=0.035$ ja $p=0.029$) ei tullut esiin jatkoanalyseissa.

Keuhkotoiminnan muutosten lisäksi *TIMP2*-geeni yhdistettiin tutkimuksissamme paraseptaalisten emfyseemamuutosten kehittymiseen. Emfyseemaan liittyy usein keuhkotoiminnan aleneminen, joten nämä kaksi havaintoa tukevat toisiaan. Ne tukevat myös *TIMP2*:n monimuotoisuuden yhteyttä keuhkohtaumataudin eri ilmenemismuotoihin.

5. TIEDOTUS JA MUU HYÖDYNTÄMINEN

Tähän menessä hankkeesta on tiedotettu seuraavasti:

- Tiedote hankkeesta on laitettu TSR:n internetsivuille.
- Hankkeen tuloksista on valmisteltu käsikirjoitus koskien *SERPINE2*-geenin genotyyppien ja haplotyyppien osuutta eri emfyseematyypin synnyssä, sekä käsikirjoitus koskien tutkittujen geneettisten tekijöiden yhteyttä fibroottisiin muutoksiin ja pleuran plakkeihin. Molemmat Käsikirjoitukset on lähetetty julkaistavaksi alan arvostettuihin kansainvälisiin tieteellisiin vertaisarvioituihin lehtiin.

6. HANKKEEN TOTEUTTAMISEEN OSALLISTUNEET HENKILÖT JA HEIDÄN TOTEUTUNEET TYÖPANOKSENSA

Vanhempi tutkija, dos. Ari Hirvonen, TTL, 7 kk

Ylilääkäri, dos. Panu Oksa, TTL, 0,1 kk

Osastonylilääkäri, dos. Päivi Piirilä, HUSLAB, 0,5 kk

Osastonylilääkäri, dos. Tapio Vehmas, TTL, 0,1 kk

Tutkija Mari Kukkonen, TTL, 14 kk

Asiantuntija Sirpa Hyttinen, TTL, 1,5 kk

Apulaistutkija Emmi Tiili, TTL, 6 kk

7. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän hankkeen tulokset tukevat selkeästi käsitystä, jonka mukaan joidenkin sidekudosta muokkaavien entsyymien, luonnolliseen immuunivasteeseen liittyvien proteiinien, ja joidenkin tulehdusvälittäjäaineiden geenien sekä keuhkoahaumatautiin aiemmin liitettyjen kandidaattigeenien monimuotoisuus voi vaikuttaa yksilölliseen riskiin sairastua asbestialtistumiseen ja tupakointiin liittyviin keuhkosairauksiin. Erityisesti sidekudoksen hajottamiseen liittyvään tasapainoon osallistuvien proteiinien yhteys emfyseeman ja sen eri alatyyppeiden syntyyn sai vahvistusta tutkimuksistamme. Tutkimuksen tulokset tuovat siten tärkeää uutta tietoa asbestialtistumisen aiheuttamien sairauksien ja emfyseeman syntymekanismeista.

8. KIRJALLISUUSVIITTEET

- 1 Manning CB, Vallyathan V and Mossman BT. Diseases caused by asbestos: mechanisms of injury and disease development. *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 191-200.
- 2 Mossman BT and Gee JB. Asbestos-related diseases. *N Engl J Med* 1989; 320: 1721-30.
- 3 Kamp DW, Graceffa P, Pryor WA, *et al.* The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 293-315.
- 4 Heffner JE and Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 531-54.
- 5 Taraseviciene-Stewart L and Voelkel NF. Molecular pathogenesis of emphysema. *J Clin Invest* 2008; 118: 394-402.
- 6 Snider GL, Kleinerman J, Thurlbeck WM, *et al.* The Definition of Emphysema: Report of a National-Heart-lung-And-Blood-Institute, Division of Lung-Diseases Workshop. *Am J Respir Dis* 1985; 132: 182-85.
- 7 Stern EJ and Frank MS. CT of the lung in patients with pulmonary emphysema: diagnosis, quantification, and correlation with pathologic and physiologic findings. *Am J Roentgenol* 1994; 162: 791-8.
- 8 Begin R, Ostiguy G, Filion R, *et al.* Computed tomography in the early detection of asbestosis. *Br J Ind Med* 1993; 50: 689-98.
- 9 Aberle DR, Gamsu G, Ray CS, *et al.* Asbestos-related pleural and parenchymal fibrosis: detection with high-resolution CT. *Radiology* 1988; 166: 729-34.
- 10 American Thoracic Society. Diagnosis and initial management of nonmalignant diseases related to asbestos, *Am J Respir Crit Care Med*, 2004; 691-715.
- 11 Cugell DW and Kamp DW. Asbestos and the pleura: a review. *Chest* 2004; 125: 1103-17.

- 12 Miller A, Lilis R, Godbold J, *et al.* Relationship of pulmonary function to radiographic interstitial fibrosis in 2,611 long-term asbestos insulators. An assessment of the International Labour Office profusion score. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 263-70.
- 13 American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: S77-121.
- 14 Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, *et al.* The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 9035-40.
- 15 Nishimura Y, Nishiike-Wada T, Wada Y, *et al.* Long-lasting production of TGF-beta1 by alveolar macrophages exposed to low doses of asbestos without apoptosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007; 20: 661-71.
- 16 Tephly LA and Carter AB. Asbestos-induced MKP-3 expression augments TNF-alpha gene expression in human monocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39: 113-23.
- 17 Ito M, Hanaoka M, Droma Y, *et al.* The association of transforming growth factor beta 1 gene polymorphisms with the emphysema phenotype of COPD in Japanese. *Intern Med* 2008; 47: 1387-94.
- 18 Celedon JC, Lange C, Raby BA, *et al.* The transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1649-56.
- 19 Castaldi PJ, Cho MH, Cohn M, *et al.* The COPD genetic association compendium: a comprehensive online database of COPD genetic associations. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 526-34.
- 20 Zhang S, Wang C, Xi B, *et al.* Association between the tumour necrosis factor-alpha -308G/A polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease: An update. *Respirology* 2010; doi: 10.1111/j.1440-1843.2010.01879.x.
- 21 Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, *et al.* Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008; 320: 674-7.
- 22 Verma D, Lerm M, Blomgran Julinder R, *et al.* Gene polymorphisms in the NALP3 inflammasome are associated with interleukin-1 production and severe inflammation: relation to common inflammatory diseases? *Arthritis Rheum* 2008; 58: 888-94.
- 23 McGovern DP, Butler H, Ahmad T, *et al.* TUCAN (CARD8) genetic variants and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006; 131: 1190-6.
- 24 Joos L, He JQ, Shepherdson MB, *et al.* The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 569-76.
- 25 Ito I, Nagai S, Handa T, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1378-82.
- 26 Lee SY, Kim MJ, Kang HG, *et al.* Polymorphisms in matrix metalloproteinase-1, -9 and -12 genes and the risk of chronic obstructive pulmonary disease in a Korean population. *Respiration* 2010; 80: 133-8.
- 27 Hirano K, Sakamoto T, Uchida Y, *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001; 18: 748-52.
- 28 Hegab AE, Sakamoto T, Uchida Y, *et al.* Association analysis of tissue inhibitor of metalloproteinase2 gene polymorphisms with COPD in Egyptians. *Respir Med* 2005; 99: 107-10.
- 29 Sandford AJ, Weir TD and Pare PD. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1997; 10: 1380-91.
- 30 Janssens W, Bouillon R, Claes B, *et al.* Vitamin D deficiency is highly prevalent in COPD and correlates with variants in the vitamin D-binding gene. *Thorax*; 65: 215-20.
- 31 DeMeo D, Mariani T, Lange C, *et al.* The SERPINE2 gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 502.
- 32 Zhu G, Warren L, Aponte J, *et al.* The SERPINE2 gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease in two large populations. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 167-73.
- 33 Kim WJ, Hoffman E, Reilly J, *et al.* Association of COPD candidate genes with CT emphysema and airway phenotypes in severe COPD. *Eur Respir J* 2010; doi:10.1183/09031936.00173009.
- 34 Fujimoto K, Ikeda S, Arai T, *et al.* Polymorphism of SERPINE2 gene is associated with pulmonary emphysema in consecutive autopsy cases. *BMC Med Genet* 2010; 11: 159.
- 35 Johnson JL, Baker AH, Oka K, *et al.* Suppression of atherosclerotic plaque progression and instability by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: involvement of macrophage migration and apoptosis. *Circulation* 2006; 113: 2435-44.