

## Роль полиморфизма в промоторной области гена *TNF* в развитии хронической обструктивной болезни легких

Сеитова Г.Н.<sup>1</sup>, Букреева Е.Б.<sup>1</sup>, Буйкин С.В.<sup>1</sup>, Бычкова О.Ю.<sup>2</sup>, Дементьева Е.А.<sup>1</sup>, Нестерович С.В.<sup>1</sup>, Пузырев В.П.<sup>1,2</sup>

### The role of polymorphism in *TNF* gene promotive area in the development of chronic obstructive pulmonary disease

Seitova G.N., Bukreeva Ye.B., Buykin S.V., Bychkova O.Yu., Dementyeva Ye.A., Nesterovich S.V., Puzyrev V.P.

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

<sup>2</sup> НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, г. Томск

© Сеитова Г.Н., Букреева Е.Б., Буйкин С.В. и др.

Исследована ассоциация полиморфизма –308G/A гена фактора некроза опухолей- $\alpha$  (*TNF*) с развитием хронической обструктивной болезни легких в двух популяциях г. Томска (сибирские татары и русские). В результате, как в группах больных, так и в группах контроля, не отмечено отклонения распределений генотипов от ожидаемых при равновесии Харди—Вайнберга. Статистически значимых различий в распределении частот аллелей среди больных с ХОБЛ и в контрольных группах получено не было ( $p > 0,5$ ), в том числе и между этническими группами (русские и татары). Для татар были установлены различия в распределении генотипов между больными и контрольной группой за счет преобладания гетерозитных носителей (AG) у больных ( $p < 0,05$ ). Полученные данные позволяют сделать заключение о наличии ассоциации полиморфизма –308G/A гена *TNF* с развитием ХОБЛ у сибирских татар.

**Ключевые слова:** хроническая обструктивная болезнь легких, ген *TNF*, фактор некроза опухолей- $\alpha$ , полиморфизм –308G/A.

Association of –308G/A-polymorphism of  $\alpha$ -tumor necrosis factor (*TNF*) gene with the development of chronic obstructive pulmonary disease has been investigated in two populations of Tomsk city (Siberian Tatars and Russians). As a result, it has not been marked any genotype distribution deviation of expected in patient groups as well as in control groups at Hardy-Vainberg equilibrium. Statistically significant difference in allele distribution rate at patients with COPD and in control groups has not been found ( $p > 0,5$ ) including ethnic groups (Russians and Tatars). Differences in genotype distribution at patients and control group have been found for Tatars due to heterosive carrier (AG) prevalence at patients ( $p < 0,05$ ). The obtained data allow to conclude the presence of association of –308G/A-polymorphism of *TNF* gene with the COPD development at Siberian Tatars.

**Key words:** chronic obstructive pulmonary disease, *TNF* gene,  $\alpha$ -tumor necrosis factor, –308G/A-polymorphism.

УДК 616.24–002:575:572.9

#### Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) — широко распространенное мультифакториальное заболевание бронхолегочной системы. По распространенности, тяжести течения, сложности

диагностики и терапии, затратам на лечение данная нозология занимает ведущее место среди других хронических неинфекционных заболеваний [2, 7—9, 15].

Роль наследственных факторов в предрасположенности к ХОБЛ бесспорна, однако реализа-

ция этой предрасположенности в фенотип болезни является следствием развертывания генетической программы при определенных внешне-средовых условиях. В настоящее время хорошо известны и изучены многие экзогенные факторы, определяющие клинические проявления ХОБЛ, действие которых реализуется на фоне генетической предрасположенности [6, 8, 9, 26]. Эти факторы во многом являются управляемыми, т.е. их влияние на организм можно предотвратить. Роль генетических факторов в этиологии и патогенезе заболеваний бронхолегочной системы не вызывает сомнения, но на сегодняшний момент лишь для немногих нозологических форм установлены конкретные гены, лежащие в основе возникновения и механизма развития заболевания [5]. Основываясь на анализе генетических факторов, возможен прогноз вероятности развития ХОБЛ и особенностей клинического течения заболевания, что даст возможность клиническим врачам проводить необходимые профилактические мероприятия и максимально отдалить сроки манифестации болезни или развития тяжелых осложнений у больных ХОБЛ.

В последние годы приоритетным направлением изучения наследственной компоненты ХОБЛ является подход с использованием *генов-кандидатов*. Гены-кандидаты — это гены, для которых установлена роль их белковых продуктов в патогенезе изучаемого заболевания. На сегодняшний день единственным доказанным генетическим фактором риска развития болезни является тяжелая врожденная  $\alpha_1$ -антитрипсиновая недостаточность (ААТН) — аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутацией в гене *Pi*. Но распространенность ААТН среди больных ХОБЛ крайне невелика и составляет не более 1—2% от общего числа больных [1, 18, 22, 26].

Наибольший интерес для исследователей представляет ген, кодирующий фактор некроза опухолей- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), имеющий широкий спектр биологического действия. Основной считается роль в развитии острого воспалительного процесса. ФНО- $\alpha$  принимает участие в воспалении как прямым, стимулируя хемотаксис нейтрофилов в очаг воспаления, так и косвенным способом

— за счет индукции синтеза других провоспалительных медиаторов. ФНО- $\alpha$  стимулирует экспрессию молекул адгезии на поверхности эндотелиальных клеток и нейтрофилов, увеличивая таким образом тропность данных клеток друг к другу. Кроме того, ФНО- $\alpha$  стимулирует миграцию нейтрофилов через сосудистую стенку в очаг повреждения. В очаге воспаления ФНО- $\alpha$  играет значительную роль в разрушении патологических агентов: стимулируя фагоцитоз и за счет индукции «оксидативного стресса». «Кислородный взрыв» происходит путем стимуляции образования в нейтрофилах активных форм кислорода, окиси азота и гипохлорной кислоты [4, 27]. Помимо участия в остром воспалении ФНО- $\alpha$  играет роль в хронизации воспалительного процесса как за счет повышения адгезии макрофагов, которые, как известно, являются основными клетками-эффекторами хронического воспаления, так и опосредованно, индуцируя синтез NO.

Ген *TNF* картирован на хромосоме 6p21.3 и имеет размер 2762 п.о. Синтезируемый белок состоит из 233 аминокислотных остатков с молекулярной массой 25644 Da [20]. Известны более 30 полиморфных вариантов гена (SNP-полиморфизмы, микросателлиты), но только около половины из них влияют на экспрессию ФНО- $\alpha$  *in vitro* [19, 20].

На протяжении последних лет проведен целый ряд исследований ассоциации полиморфизмов гена *TNF* с развитием ХОБЛ в различных популяциях. Наибольший интерес исследователей вызывает полиморфизм -308G/A, локализованный в промоторной области гена. Замена гуанидина на аденин в данном случае приводит к повышению экспрессии гена *in vitro* [19]. Полученные результаты оказались противоречивыми: часть исследователей показала ассоциацию полиморфизма -308G/A с ХОБЛ [10, 12, 16, 17, 21, 25, 28, 30, 31], другие такой ассоциации не нашли [23, 24, 28, 29, 32, 33]. Даже исследования, проведенные в одной популяции, имеют противоположные значения. Так, например, в одних исследованиях ассоциация была найдена [16, 17], в других — нет [23, 24]. Кроме полиморфизма -308G/A была изучена ассоциация с ХОБЛ полиморфизмов -238G/A, —

## Экспериментальные и клинические исследования

376G/A и 489G/A гена *TNF* [28]. В данном исследовании было продемонстрировано наличие связи только полиморфизма 489G/A с развитием ХОБЛ.

Таким образом, полученные на сегодня результаты противоречивы и не позволяют однозначно утверждать о наличии или отсутствии патогенетически значимых полиморфных вариантов гена *TNF* при ХОБЛ.

Цель настоящего исследования заключается в изучении ассоциации полиморфизма –308G/A, локализованного в промоторной области гена *TNF* с развитием ХОБЛ в популяциях сибирских татар и русских, проживающих на территории Томска и Томской области.

### Материал и методы

Всего было обследовано 445 человек — сибирские татары и русские — жители г. Томска и Томской области. По результатам обследования были сформированы группы больных ХОБЛ и контрольные группы, дифференцированные по этнической принадлежности.

Группа больных ( $n = 122$ ) включала в себя 72 русских и 50 татар. Клиническое обследование и диагностика проводились на базе пульмонологического отделения МЛПУ «Городская больница < 3». Диагноз пациентам был поставлен на основании наличия общепринятых критериев ХОБЛ [2]. Длительность анамнеза у пациентов составила от 3 до 47 лет у русских и от 3 до 45 лет у татар. Более половины больных — настоящие или бывшие курильщики, средний показатель стажа курения составил 37,2 пачка/лет. Контакт с профессиональными вредностями, воздействующими на органы дыхания, в анамнезе отмечался более чем в половине случаев (табл. 1).

Таблица 1

Данные анамнеза	Характеристика исследуемых групп			
	Больные ХОБЛ		Контрольная группа	
	Русские ( $n = 72$ )	Татары ( $n = 50$ )	Русские ( $n = 189$ )	Татары ( $n = 134$ )
Средний возраст	56,4 ± 12,0	56,3 ± 16,0	60,0 ± 17,0	55,3 ± 17,5
Длительность	17,2 ± 12,4	23,7 ± 13,7	—	—

анамнеза ХОБЛ	Курильщики	Некурящие	Профессиональные вредности в анамнезе
47 (65,3%)	31 (62%)	112 (59,2%)	76 (56,7%)
25 (34,7%)	19 (38%)	77 (40,8%)	58 (43,3%)
52 (72,2%)	34 (68,0%)	123 (65,0%)	92 (68,7%)

Контрольную группу составили 323 человека: русские — 189, татары — 134. Условия для включения в контрольную группу: отсутствие кашлевого анамнеза, отсутствие в течение предшествующих трех месяцев острых респираторных заболеваний, нормальные показатели функции внешнего дыхания по данным спирометрии.

В данной группе более 50% исследуемых являлись настоящими или бывшими курильщиками; средний показатель стажа курения составил 26,8 пачка/лет. Контакт с профессиональными вредностями в анамнезе имели более 60% исследуемых (табл. 1).

Кроме того, обязательным условием включения в группы было информированное согласие исследуемого.

**Молекулярно-генетическое исследование.** ДНК выделяли по стандартной неэнзиматической методике из лимфоцитов периферической крови, взятой из кубитальной вены [3, 11]. Выделенную ДНК замораживали и хранили при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Изучение полиморфных вариантов исследуемых генов проводили с помощью амплификации соответствующих участков генома методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров, описанную в литературе [34].

Продукты амплификации обрабатывали специфической рестриктазой. Продукты рестрикции фракционировали в 8—10%-м полиакриламидном геле при напряжении 340 В в течение 80—100 мин. Фрагменты ДНК окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете с применением компьютерной видеосъемки на приборе UV-VIS Imager-II (США).

**Статистические методы.** Соответствие наблюдаемых распределений частот генотипов теоретически ожидаемым по уравнению Харди—Вайнберга оценивали с использованием критерия  $\chi^2$ . При попарном сравнении частот генотипов и

аллелей между собой использовали точный критерий Фишера. Для оценки ассоциаций рассчитывали относительный риск OR по формуле

$$OR = ad/bc,$$

где *a* — число лиц с наличием анализируемого маркера среди больных; *b* — его отсутствие; *c* и *d* — число лиц соответственно с наличием и отсутствием маркера в контрольной группе. Величина  $OR = 1$  указывает на отсутствие ассоциации,  $OR > 1$  — имеет место при положительной ассоциации (фактор риска) и  $OR < 1$  — отрицательная ассоциация аллеля с заболеванием.

## Результаты и обсуждение

На первом этапе было проведено обследование больных на наличие тяжелой врожденной  $\alpha_1$ -антитрипсиновой недостаточности — генетиче-

ской патологии, которая часто проявляется клинической картиной ХОБЛ, но, являясь моногенным заболеванием, требует совершенно иного подхода к диагностике и лечению [13, 18]. Обследование проводилось с целью исключения больных ААТН из выборки пациентов с ХОБЛ для корректной интерпретации полученных данных. Было проведено генотипирование двух наиболее распространенных дефицитных аллелей гена *Pi* (S и Z) в группах больных. В результате исследования было выявлено 2 гетерозиготных носителя по аллелю S, что позволило оставить выборки больных без изменений, поскольку при данном генотипе количество синтезируемого  $\alpha_1$ -протеазного ингибитора достаточно для защиты легочной ткани от воздействия эндогенных эластаз [14].

Таблица 2

Распределение генотипов и частот аллелей полиморфизма –308A/G гена *TNF* у больных ХОБЛ и в группах контроля

–308A/G ( <i>TNF</i> - $\alpha$ )	Русские			<i>P</i>	Татары			<i>P</i>
	Больные ХОБЛ, %	Контрольная группа, %	$\chi^2$		Больные ХОБЛ, %	Контрольная группа, %	$\chi^2$	
AA	2,8	3,8	2,42	0,3	0	1,5	6,64	<b>0,04</b>
AG	34,7	25,1			36,0	18,7		
GG	62,5	71,1			64,0	79,8		
A	0,20	0,16	0,30	0,6	0,18	0,11	1,45	0,2
G	0,80	0,84			0,82	0,89		
OR		1,3				1,8		

Анализ полиморфизма –308G/A гена *TNF* среди русских не выявил отклонения распределений генотипов от ожидаемых при равновесии Харди—Вайнберга ( $\chi^2 = 0,49$  и  $1,17$  у больных и в контрольной группе соответственно; *d.f.* = 1). При оценке распределения генотипов и частот аллелей среди больных, страдающих ХОБЛ, и в группе контроля (табл. 2) статистически значимых различий показано не было ( $p > 0,5$ ).

В популяции сибирских татар также не было выявлено отклонения распределений генотипов от ожидаемых при равновесии Харди—Вайнберга ( $\chi^2 = 2,41$  и  $1,15$  у больных и в контрольной группе соответственно; *d.f.* = 1). В то же время анализ распределения генотипов выявил статистически значимые различия между больными и контрольной группой (табл. 2) за счет преобладания гете-

розиготных носителей (AG) у больных ( $p < 0,05$ ). Отклонений в распределении частот аллелей в татарской популяции обнаружено не было. Полученные данные позволяют сделать заключение о наличии связи полиморфизма –308G/A гена *TNF* с развитием ХОБЛ у сибирских татар.

Отсутствие у русских статистически значимой ассоциации исследуемого полиморфного варианта гена *TNF* с ХОБЛ тем не менее не исключает возможного вклада данного полиморфизма в особенности течения заболевания, а также его связь с наличием и сроками появления осложнений. Результаты проведенных исследований на других популяциях подтвердили это предположение [13].

## Выводы

Полученные данные указывают на межэтнические различия в структуре предрасположенности к ХОБЛ и позволяют сделать следующие выводы:

1. Установленные различия в распределении генотипов между больными и контрольной группой полиморфного варианта -308G/A гена *TNF* (преобладание генотипа AG) свидетельствуют о вкладе данного полиморфизма в развитие ХОБЛ у сибирских татар.

2. Не показано ассоциации полиморфизма -308G/A гена *TNF* с ХОБЛ в популяции русских.

3. Дополнительные ассоциативные исследования с фенотипическими признаками заболевания позволяют оценить роль данного полиморфизма в клинических особенностях течения патологического процесса как у сибирских татар, так и среди русских.

#### Литература

1. Гембицкая Т.Е. Генетические аспекты в проблемах пульмонологии // *Клин. медицина*. 1983. < 3. С. 9—13.
2. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких: Пер. с англ. / Под ред. А.Г. Чучалина. М.: Атмосфера, 2003. 96 с.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984. 480 с.
4. Поталнев М.П. Цитокиновая сеть нейтрофилов при воспалении // *Иммунология*. 1995. < 4. С. 34—40.
5. Пузырев В.П., Огородова Л.М. Геномная медицина в решении проблем пульмонологии // *Вестн. РАМН*. 2000. < 2. С. 45—48.
6. Факторы риска хронической обструктивной болезни легких / Т.В. Ивчик, А.Н. Кокосов, Е.Д. Янчина и др. // *Пульмонология*. 2003. < 3. С. 6—15.
7. Хронические обструктивные болезни легких. Федеральная программа. М., 1999. 40 с.
8. Хронический бронхит и обструктивная болезнь легких / Под ред. А.Н. Кокосова. СПб., 2002. 288 с.
9. Чучалин А.Г. Хронические обструктивные болезни легких. М.: БИНОМ, 2000. 510 с.
10. Янбаева Д.Г., Корытина Д.Ф., Викторова Т.В. Аллельные варианты генов суперсемейства *TNF* как маркеры тяжести течения хронической обструктивной болезни легких и бронхоэктатической болезни // *Сб. науч. тр. 13-го Нац. конгресса по болезням органов дыхания*. СПб, 2003. С. 331.
11. A non-organic and non-enzymatic method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods used / D.K. Lahiri, S. Bye, J.I. Nunberg et al. // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1992. V. 25. P. 193—205.
12. A polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may predispose to a poor prognosis in COPD / V.M. Keatings, S.J. Cave, M.J. Henry et al. // *Chest*. 2000. V. 118. < 4. P. 971—975.
13. Alpha1-Antitrypsin deficiency — a conformational disease / R.W. Carrell, D.A. Lomas, S. Sidhar, R. Foreman // *Chest*. 1996. V. 110. P. 243S—247S.
14. Alpha1-Antitrypsin deficiency: Memorandum from a WHO meeting // *Bulletin of the World Health Organization*. 1997. V. 75(5). P. 397—415.
15. Anto J.M., Vermeire P., Sunyer J. Chronic obstructive pulmonary disease // *Eur. Respir. Monograph: Respir. Epidemiology in Europe*. 2000. V. 5. < 15. P. 1—22.
16. Association of tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism with low attenuation areas on high-resolution CT in patients with COPD / S. Sakao, K. Tatsumi, H. Igari et al. // *Chest*. 2002. V. 122. < 2. P. 416—420.
17. Association of tumor necrosis factor alpha gene promoter polymorphism with the presence of chronic obstructive pulmonary disease / S. Sakao, K. Tatsumi, H. Igari et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2001. V. 163. < 2. P. 420—422.
18. Cox D.W. Alpha1-antitrypsin deficiency. In: The metabolic basis of inherited disease // Eds. C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle. 6<sup>th</sup> ed. NY: McGraw-Hill, 1989. P. 130.
19. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases / J. Bidwell, L. Keen, G. Gallagher et al. // *Genes and Immunity*. 1999. < 1. P. 3—19.
20. GeneCard for gene *TNF* [Электронный документ] // <http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?TNF>
21. Huang S.L., Su C.H., Chang S.C. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism in chronic bronchitis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1997. V. 156. < 5. P. 1436—1439.
22. Meijer G.G., Koppelman G.H., Postma D.S. Genetic factors // *Eur. Respir. Monograph: Respir. Epidemiology in Europe*. 2000. V. 5. < 15. P. 247—270.
23. Neither IL-1beta, IL-1 receptor antagonist, nor TNF-alpha polymorphisms are associated with susceptibility to COPD / T. Ishii, T. Matsuse, S. Teramoto et al. // *Respir. Med*. 2000. V. 94. < 9. P. 847—851.
24. No Association of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphism and COPD in caucasian smokers and japanese smokers / S. Teramoto, T. Ishii, M. Luisetti, P.F. Pignatti // *Chest*. 2001. V. 119. P. 315—316.
25. Promoter variation of tumour necrosis factor-alpha gene: possible high riskfor chronic bronchitis but not diffuse panbronchiolitis / N. Keicho, M. Emi, K. Nakata et al. // *Respir. Med*. 1999. V. 93. < 10. P. 752—753.
26. Sanford A.J., Silverman E.K. Chronic obstructive pulmonary disease. 1: Susceptibility factors for COPD the genotype-environment interaction // *Thorax*. 2002. V. 57. P. 736—741.
27. Sibille Y., Marchandise F-X. Pulmonary immune cells in health and disease: Polymorphonuclear neutrophils // *Eur. Respir. J*. 1993. < 6. P. 1529—1543.
28. Tumor Necrosis Factor-alpha +489G/A gene polymorphism is associated with chronic obstructive pulmonary disease / M. Kucukaycan, M. Van Krugten,

- H.J. Pennings et al. // *Respir. Res.* 2002. V. 29. < 1. P. 29.
29. *Tumor* necrosis factor gene complex in COPD and disseminated bronchiectasis / C. Patuzzo, L.S. Gile, M. Zorzetto et al. // *Chest.* 2000. V. 117. < 5. P. 1353—1358.
30. *Tumor* necrosis factor- $\alpha$  is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown / A. Churg, J. Dai, H. Tai et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002. V. 166. P. 849—854.
31. *Tumor* necrosis factor gene polymorphisms and childhood wheezing / H. Biloliar, A. Rodriguez Nam, M. Rosenthal et al. // *Thorax.* 2002. V. 57. P. 34.
32. *Tumor* necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease / M.A. Higham, N.B. Pride, A. Alikhan, N.W. Morrell // *Eur. Respir. J.* 2000. V. 15. < 2. P. 281—284.
33. *Tumor* necrosis factor family genes in a phenotype of COPD associated with emphysema / I. Ferrarotti, M. Zorzetto, M. Beccaria et al. // *Eur. Respir. J.* 2003. V. 21. < 3. P. 444—449.
34. *Variants* of trophic factors and expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy / R. Patel, D.S. Lim, D. Reddy et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000. V. 32. < 12. P. 2369—2377.

Поступила в редакцию 18.03.2004 г.