

Анализ взаимосвязи полиморфизмов генов *TNF* и *IL8* с формированием клинических особенностей хронической обструктивной болезни легких

Сеитова Г.Н.^{1,2}, Букреева Е.Б.¹, Кремис И.С.^{1,3}, Пузырёв В.П.^{1,2}

Relationship analysis of *TNF* and *IL8* gene polymorphisms with clinical features of chronic obstructive pulmonary disease

Seitova G.N., Bukreyeva Ye.B., Kremis I.S., Puzyryov V.P.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

³ МЛПУ «Городская больница № 3», г. Томск

© Сеитова Г.Н., Букреева Е.Б., Кремис И.С., Пузырёв В.П.

Изучена взаимосвязь полиморфизма –308G/A гена фактора некроза опухолей α (*TNF*) и полиморфизма –251A/T гена интерлейкина-8 (*IL8*) с клиническими особенностями течения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) у сибирских татар и русских. Проведен анализ ассоциаций данных генетических маркеров с количественными признаками, патогенетически значимыми в формировании ХОБЛ (биохимическими и иммунологическими показателями сыворотки крови и мокроты).

При анализе ассоциаций полиморфных вариантов генов *TNF* и *IL8* с биохимическими и иммунологическими показателями сыворотки крови и мокроты установлено наличие межэтнических особенностей в регуляции уровня провоспалительных и защитных механизмов, играющих роль в формировании хронического воспаления при ХОБЛ.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, ген *TNF*, фактор некроза опухолей α , интерлейкин-8, ген *IL8*, полиморфизм, генетические маркеры, наследственная предрасположенность.

The correlation of the 308G/A polymorphism of α *TNF* (tumor necrosis factor) gene and 251A/T polymorphism of 8 *IL8* (interleukin 8) gene with clinical peculiarities of the course of chronic obstructive lung disease (COLD) in Siberian Tatars and Russians has been studied. Associations of these genetic markers with quantitative indices pathogenetically significant in the COLD formation (biochemical and immunological indices of blood serum and sputum) have been analyzed.

The analysis of associations of polymorphous versions of *TNF* and *IL8* genes with biochemical and immunological indices of blood serum and sputum has revealed the presence of interethnic peculiarities in the regulation of the level of proinflammatory and protective mechanisms participating in the formation of chronic inflammation at COLD.

Key words: chronic obstructive lung disease, α *TNF* (tumor necrosis factor) gene, интерлейкин-8, *IL8* (interleukin 8) gene, polymorphism, genetic marker, hereditary predisposition.

УДК 616.23/24-002.2-07-02:575.174.015.3

Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является широко распространенным и социально значимым заболеванием. Данные Всемирной организации здравоохранения свидетельствуют о повсеместном росте заболеваемости ХОБЛ, утяжелении течения патологии. ХОБЛ существенно снижает качество жизни людей, обуславливает раннюю инвалидизацию и высокую смертность больных [10–13]. Существен-

ным недостатком в настоящее время является отсутствие четких критериев диагностики на доклиническом этапе развития болезни. Устаревшие представления о ХОБЛ как о болезни, главной причиной которой является действие факторов внешней среды, сменилось пониманием важности генетической индивидуальности человека [3, 8].

Роль наследственных факторов в предрасположенности к ХОБЛ бесспорна, однако реализация этой предрасположенности в фенотип болезни является

следствием развертывания генетической программы при определенных внешнесредовых условиях. В настоящее время хорошо известны и изучены многие средовые факторы, определяющие клинические проявления ХОБЛ, действие которых реализуется на фоне генетической предрасположенности. Они во многом являются управляемыми, т.е. их влияние на организм можно предотвратить. Сведения о влиянии генетических факторов на подверженность заболеванию, на сроки манифестации, особенности клинического течения патологии и время возникновения осложнений помогут клиническим специалистам в разработке диагностических, лечебных и профилактических программ при ХОБЛ.

В проведенном ранее исследовании роли полиморфных вариантов генов *TNF* и *IL8* в формировании ХОБЛ у сибирских татар и русских г. Томска авторами были получены данные, свидетельствующие о межэтнических различиях в структуре предрасположенности к ХОБЛ [9]. Установлена ассоциация полиморфного варианта -308G/A гена *TNF* с формированием ХОБЛ у сибирских татар, в то время как у русских такой связи не выявлено. В отношении исследованного полиморфизма гена *IL8* ни у русских, ни у татар взаимоотношения с формированием ХОБЛ не установлено. Однако отсутствие статистически значимой ассоциации изученных генетических маркеров с ХОБЛ в указанных этнических группах не исключает возможной вовлеченности данных аллельных вариантов в формирование клинических особенностей течения заболевания, а также их связи с наличием и сроками возникновения осложнений.

Известно, что ключевым моментом в развитии ХОБЛ является хроническое воспаление дыхательных путей. Воспаление — это важная восстановительно-приспособительная реакция организма, с помощью которой осуществляется локализация и элиминация повреждающего агента или поврежденной ткани [6]. Слаженная работа факторов альтерации, экссудации и пролиферации приводит к быстрой элиминации поврежденной ткани и выздоровлению. Однако при развитии дисбаланса между повреждающими и защитными факторами течение воспалительного процесса может принять затяжной характер, приводящий к хронизации процесса [2]. В формировании воспаления при ХОБЛ одну из важных ролей играет дисбаланс в системе протеазы — антипротеазы; при этом среди

протеиназ наиболее мощным повреждающим действием обладает нейтрофильная эластаза [1, 11, 12]. Кроме того, существенную роль в течении воспалительного процесса играют такие медиаторы, как интерлейкин-8 (ИЛ-8) и фактор некроза опухолей α (ФНО- α), выступающие мощными факторами адгезии и хемотаксиса нейтрофилов [5, 7, 15].

Таким образом, патогенетически обоснованным явилось изучение ассоциации включенных в исследование генов со следующими биохимическими и иммунологическими параметрами сыворотки крови и мокроты у пациентов, страдающих ХОБЛ: протеиназы — эластаза, трипсиноподобные протеиназы (ТПП); ингибиторы протеиназ — α_1 -протеазный ингибитор (α_1 -ПИ), α_2 -макроглобулин (α_2 -МГ), кислотостабильные ингибиторы (КСИ); провоспалительные цитокины — ФНО- α , ИЛ-8.

Цель настоящего исследования — изучение роли полиморфных вариантов гена *TNF* и *IL8* в формировании клинических особенностей течения ХОБЛ, а также анализ ассоциации данных генетических маркеров с количественными признаками, патогенетически значимыми в формировании рассматриваемого заболевания.

Материал и методы

Исследование проводилось в двух этнических группах, проживающих на территории Томской области, — сибирских татар и русских. Были сформированы четыре группы — две группы больных (русские — 72 человека, татары — 50 человек) и две контрольные (русские — 189, татары — 134). Диагноз у пациентов поставлен на основании наличия общепринятых критериев ХОБЛ [14].

Обследование включало сбор семейного анамнеза и использование различных клинико-лабораторных тестов. Исследование функции внешнего дыхания проводилось в период клинической ремиссии заболевания. Данные спирометрии анализировали по следующим показателям: форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ₁), отношение ОФВ₁/ФЖЕЛ (индекс Тиффно). Биохимические и иммунологические методы включали определение активности протеиназ (эластазы, трипсиноподобных протеиназ); ингибиторов протеиназ (α_1 -протеиназного ингибитора, α_2 -макроглобулина, кислотостабильных ингибиторов); количественное определение ФНО- α и ИЛ-8 в сыворотке крови и мокроте в

период обострения и клинической ремиссии ХОБЛ (мокрота исследовалась только у больных ХОБЛ).

С помощью молекулярно-генетических методов были исследованы полиморфные варианты, локализованные в промоторной области гена: полиморфизм $-308G/A$ гена *TNF* и полиморфизм $-251A/T$ гена *IL8*. Изучение полиморфных вариантов исследуемых генов проводили с помощью амплификации соответствующих участков генома методом полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом.

В работе использованы стандартные методы биометрии. При описании генетических характеристик исследованных групп применялись следующие методы: для сравнения частот аллелей между различными группами и для оценки связи качественных признаков с исследуемыми генетическими маркерами использовали критерий χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность; для оценки связи количественных признаков — непараметрические тесты Манна—Уитни и Краскала—Уоллиса.

Результаты и обсуждение

В исследование были включены следующие клинические характеристики течения ХОБЛ: возраст начала и степень тяжести заболевания на первом этапе. В результате проведенного анализа не установлено ассоциации изученных аллельных вариантов генов *TNF* и *IL8* со сроками манифестации и степенью тяжести ХОБЛ ни у русских, ни у татар.

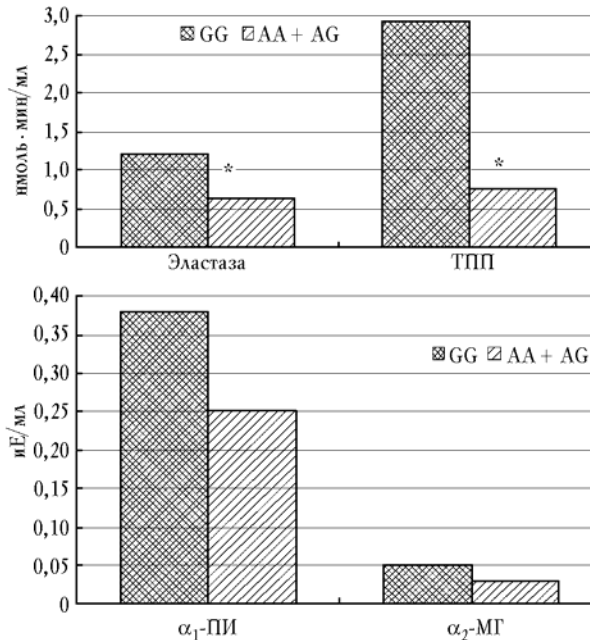
На следующем этапе был проведен ассоциативный анализ включенных в исследование генетических маркеров с количественными признаками, патогенетически значимыми в формировании ХОБЛ (биохимическими и иммунологическими показателями сыворотки крови и мокроты).

Оценка функциональной значимости полиморфных вариантов генов с количественными патогенетически значимыми признаками чаще всего проводится с помощью дисперсионного анализа, позволяющего сравнивать средние значения признаков у носителей разных генотипов соответствующих генов. При наличии статистически значимых различий значений у носителей разных генотипов принято говорить об их связи с признаком, что, вероятнее всего, основано на функциональной значимости исследованных полиморфных вариантов генов. В настоящем исследовании был проведен анализ связи генотипов генов *TNF* и *IL8*

с биохимическими и иммунологическими данными путем сравнения средних значений этих показателей у носителей разных генотипов. Учитывая статистически значимые отклонения распределений большинства исследованных признаков от закона Гаусса (по данным теста Шапиро—Уилки), сравнение проведено с помощью непараметрических критериев Манна—Уитни и Краскала—Уоллиса.

В результате проведенного анализа получено большое количество ассоциаций исследуемых генов-кандидатов ХОБЛ с различными биохимическими и иммунологическими маркерами заболевания. Однако как о функционально значимых в отношении развития ХОБЛ можно говорить лишь о некоторых из них.

Установлена связь полиморфизма $-308G/A$ гена *TNF* с активностью протеиназ, протеиназных ингибиторов и уровнем ФНО- α у больных ХОБЛ — представителей русской национальности. Аллель А в гомо- и гетерозиготном состоянии ассоциируется с более низкими средними показателями активности протеаз в период обострения ХОБЛ (ТПП в сыворотке крови и мокроте и эластаза только в мокроте) (рисунок).



Средние уровни активности протеиназ и их ингибиторов в мокроте в период обострения ХОБЛ у русских с разными генотипами по гену *TNF* (полиморфизм $-308G/A$) (*— $p < 0,05$)

Кроме того, с этим же аллелем связана более низкая активность ингибиторов протеаз α_1 -ПИ и α_2 -МИ

($p > 0,05$) в мокроте в период обострения заболевания. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии компенсаторных механизмов адекватного ответа на повреждение в дыхательных путях, приводя к затяжному течению воспалительного процесса. Повышенный уровень ФНО- α в сыворотке крови как в период обострения, так и в период ремиссии ХОБЛ ассоциируется с аллелем G в гомозиготном состоянии ($p < 0,05$) (табл. 1).

Таблица 1

Средние уровни биохимических и иммунологических показателей в сыворотке крови у русских и татар, страдающих ХОБЛ с разными генотипами по гену *TNF* (полиморфизм –308G/A)

Признак	Русские						p
	GG			AA + AG			
	n	M	m	n	M	m	
ФНО- α C1	12	193,80	50,65	6	60,17	20,68	0,041
ФНО- α C2	31	370,34	109,04	19	75,09	16,56	0,026
Признак	Татары						p
	GG			AG*			
	n	M	m	n	M	m	
ТПП C2	30	99,51	8,32	16	76,16	15,20	0,032
Эластаза C2	32	102,88	7,87	18	82,31	17,16	0,022

Примечание. Здесь и в табл. 2: n — число обследованных; M — среднее значение показателя; m — стандартное отклонение; p — достигнутый уровень значимости для теста Манна—Уитни; C1 — сывороточный показатель в период обострения; C2 — сывороточный показатель вне обострения; M1 — мокрота в период обострения; M2 — мокрота вне обострения; * — гомозигот AA не выявлено.

Таким образом, суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что полиморфизм –308G/A гена *TNF* играет значимую роль в формировании ХОБЛ у представителей русской национальности.

У татар — носителей GG-генотипа аллельного варианта гена *TNF* установлена статистически значимая ($p < 0,05$) более высокая активность протеаз (ТПП и эластазы) в сыворотке крови в период ремиссии заболевания, что свидетельствует о сохраняющейся системной воспалительной реакции организма. Однако однозначно утверждать о функциональной значимости GG-генотипа полиморфного варианта –308G/A гена *TNF* в отношении ХОБЛ в данной ситуации нельзя, так как показатели мокроты (эластаза и ТПП) в период клинической ремиссии болезни, более достоверно отражающие течение воспалительного процесса в бронхиальном дереве [4], находятся в пределах нормальных значений.

Сходная картина наблюдалась у татар и для полиморфизма –251A/T гена *IL8*: генотип TT полиморфного варианта –251A/T гена *IL8* ассоциируется с повышенной активностью ТПП в сыворотке крови в период ремиссии ($p < 0,05$), что свидетельствует о сохраняющейся системной воспалительной реакции организма в период клинической ремиссии ХОБЛ (табл. 2). Однако тот факт, что активность ТПП в мокроте в период ремиссии у носителей TT-генотипа данного полиморфизма гена *IL8* находилась в пределах нормы, дает возможность предположить, что функциональная значимость –251A/T полиморфного варианта в патогенезе ХОБЛ невысока.

Таблица 2

Средние уровни активности протеазы ТПП в сыворотке крови и мокроте в период обострения ХОБЛ у татар с разными генотипами по гену *IL8* (полиморфизм –251A/T)

Признак	AA + AT			TT			p
	n	M	m	n	M	m	
ТПП C2	33	85,66	9,79	10	108,11	11,41	0,038
ТПП M2	5	0,33	0,06	2	0,68	0,41	0,381

Заключение

При анализе ассоциаций полиморфных вариантов генов-кандидатов с биохимическими и иммунологическими показателями сыворотки крови и мокроты установлено наличие межэтнических особенностей в регуляции уровня провоспалительных и защитных механизмов, патогенетически значимых в формировании хронического воспаления при ХОБЛ. Полученные данные позволяют сделать первые выводы о генетических основах регуляции активности протеиназной и антипротеиназной систем организма, а также эндогенных регуляторов уровня провоспалительных цитокинов. Можно предположить, что изначальный (врожденный?) дисбаланс в системе «протеиназы — антипротеиназы» у русских связан с аллельным вариантом –308G/A гена *TNF*. Также с данным полиморфизмом взаимосвязан уровень ФНО- α .

Результаты настоящей работы, проведенной на ранее не исследованных в отношении ХОБЛ этнических группах (сибирские татары), вносят определенный вклад в общую картину понимания наследственной компоненты ХОБЛ и предопределяют направления будущих исследований, которые позволят полностью понять эндогенные механизмы формирования данного заболевания.

Литература

1. *Болезни органов дыхания* / под ред. Н.Р. Палеева. М.: Медицина, 2000. 728 с.
2. *Воспаление: руководство для врачей* / под ред. В.В. Серова, В.С. Паукова. М.: Медицина, 1995. 640 с.
3. Гинтер Е.К. Эволюция представлений о генетической природе мультифакториальных заболеваний // *Мед. генетика*. 2003. Т. 2, № 4. С. 146—156.
4. Деметьева Е.А. Цитобиохимические маркеры воспаления при обострении хронической обструктивной болезни легких на фоне противовоспалительной терапии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. 2004. 17 с.
5. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции реакции воспаления и иммунитета // *Иммунология*. 1995. № 3. С. 30—44.
6. *Патологическая физиология: учебник для мед. вузов* / под ред. А.Д. Адо, М.А. Адо, В.И. Пыцкого и др. М.: Триада-Х, 2001. 574 с.
7. Потаннев М.П. Цитокиновая сеть нейтрофилов при воспалении // *Иммунология*. 1995. № 4. С. 34—40.
8. Пузырёв В.П., Огородова Л.М. Геномная медицина в решении проблем пульмонологии // *Вестн. РАМН*. 2000. № 2. С. 45—48.
9. Сеитова Г.Н., Букреева Е.Б., Кремис И.С., Пузырёв В.П. Ассоциация полиморфных вариантов генов цитокинов (*TNF* и *IL8*) с развитием хронической обструктивной болезни легких // *Бюл. сиб. медицины*. 2010. Т. 9, № 3. С. 91—97.
10. *Стандарты диагностики и лечения больных ХОБЛ*. М.: Атмосфера, 2005. 96 с.
11. *Хроническая обструктивная патология легких у взрослых и детей: руководство* / под ред. А.Н. Кокосова. СПб.: СпецЛит, 2004. 304 с.
12. Чучалин А.Г. Хронические обструктивные болезни легких. М.: Бином, 2000. 510 с.
13. 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.
14. GOLD 2006 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.goldcopd.org>
15. Sibille Y., Marchandise F.-X. Pulmonary immune cells in health and disease: Polymorphonuclear neutrophils // *Eur. Respir. J*. 1993. № 6. P. 1529—1543.

Поступила в редакцию 17.03.2010 г.

Утверждена к печати 13.05.2010 г.

Сведения об авторах

Г.Н. Сеитова — канд. мед. наук, ассистент кафедры медицинской генетики СибГМУ, врач поликлинического отделения генетической клиники НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск).

Е.Б. Букреева — д-р мед. наук, профессор кафедры внутренних болезней педиатрического факультета СибГМУ (г. Томск).

И.С. Кремис — заочный аспирант кафедры внутренних болезней педиатрического факультета СибГМУ, врач пульмонологического отделения МЛПУ «Городская больница № 3» (г. Томск).

В.П. Пузырёв — д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой медицинской генетики СибГМУ, директор НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск).

Для корреспонденции

Сеитова Гульнара Наримановна, тел.: (382-2) 42-09-56; 44-64-38; 8-913-824-1791, e-mail: seitova_g@mail.ru, seitova@medlib.tomsk.ru