

А.В. Басанець, Л.В. Долінчук, Т.А. Андрущенко

Зв'язок поліморфізму С⁻¹⁵⁶²→Т промотору гена матриксної металопротеїнази-9 з ризиком розвитку хронічного обструктивного захворювання легень у шахтарів

ДУ «Ін-т медицини праці НАМН України», Київ; E-mail: DolinchukL@gmail.com

Проаналізовано генетичні маркери спадкової схильності, які зумовлюють розвиток хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) професійної етіології. За допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) визначали поліморфізм С⁻¹⁵⁶²→Т (rs3918242) промотору гена матриксної металопротеїнази-9 (ММР-9) з наступним аналізом рестрикційних фрагментів. До дослідної групи ввійшли шахтарі, хворі на ХОЗЛ, до контрольної – без патології органів дихання. Частота розподілу генотипів за поліморфізмом С⁻¹⁵⁶²→Т промотору гена ММР-9 була близькою до європеїдів. За допомогою методу відношення шансів (ВШ) встановлений зв'язок між мінорним Т-алелем (ВШ=1,89; 95 % довірчий інтервал – ДІ: 0,98–3,66) і генотипами ТТ (ВШ=2,18; 95 % ДІ: 1,83–2,60) та СТ (ВШ=1,21; 95 % ДІ: 0,56–2,66) гена ММР-9 з ризиком розвитку ХОЗЛ у шахтарів основних підземних професій. Наявність у геномі домінантного С-алеля (ВШ=0,53; 95 % ДІ: 0,27–1,02) та генотипу СС (ВШ=0,60; 95 % ДІ: 0,28–1,28) цього гена зумовлюють відносну протекторну роль щодо ризику розвитку ХОЗЛ серед груп дослідження. Отримані результати відкривають перспективи для удосконалення заходів первинної профілактики ХОЗЛ з урахуванням визначення генетичної схильності його розвитку.

Ключові слова: хронічне обструктивне захворювання легень, генетична схильність, шахтарі основних підземних професій.

ВСТУП

Хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) характеризується не повністю зворотним обмеженням прохідності дихальних шляхів. Зазвичай прогресує і асоціюється з незвичною запальною відповіддю легень на шкідливі частки або гази. Сьогодні ХОЗЛ розглядають як одну з найпоширеніших і обтяжливих патологій, що призводить до непрацездатності, інвалідності, смертності та значних соціально-економічних витрат як в Україні, так і у світі [1–5]. За прогнозами експертів ВООЗ до 2030 р. ХОЗЛ стане третьою провідною причиною смерті в усьому світі [2]. ХОЗЛ відноситься до мультифакторних

захворювань з полігенним типом успадкування, що виникають у результаті комплексної дії генетичних та екзогенних чинників. Нині існують суперечливі дані щодо генетичної схильності та ризику його розвитку.

Відомо, що білковий продукт гена матриксної металопротеїнази (ММР-9) належить до родини ферментів, які відіграють важливу роль у процесах ремоделювання та репарації легеневої тканини при запальних реакціях [6]. Підвищена експресія цього гена спостерігається у курців та осіб, хворих на ХОЗЛ [7], у зв'язку з чим можна зробити припущення, що надлишкова секреція протеолітичного ферменту ММР-9 призводить до розвитку обструктивних змін у легенях.

© А.В. Басанець, Л.В. Долінчук, Т.А. Андрущенко

Ген, що кодує профермент ММР-9 з молекулярною масою 92 кДа, локалізується на довгому плечі хромосоми у позиції 20q11.1-13.1. Аналіз послідовності промотору та 13 екзонів (сумарно – 3,3 Кб) гена ММР-9 встановив 10 варіабельних сайтів, 4 з яких знаходяться в ділянці промотору, 5 у кодуючому регіоні (3 з яких змінюють кодування амінокислот), і 1 в 3' – регіоні, що не транскрибується. Встановлено, що деякі поліморфні варіанти гена ММР-9 можуть викликати функціональний вплив на рівень його експресії або ферментативну активність білкового продукту [8].

У зв'язку з наведеним вище, пріоритетним завданням щодо збереження здоров'я працездатного населення є вдосконалення ранньої діагностики захворювання, а саме визначення генетичних маркерів ризику розвитку ХОЗЛ, для своєчасного формування реабілітаційних програм, трудових рекомендацій та запобігання прогресування патології, розвитку ускладнень, інвалідизації та передчасної смерті.

Мета нашої роботи – встановити зв'язок поліморфізму С⁻¹⁵⁶²→Т промотору гена ММР-9 з ризиком розвитку ХОЗЛ у шахтарів.

МЕТОДИКА

Обстежено 151 шахтаря чоловічої статі основних підземних професій, які знаходилися на стаціонарному лікуванні в клініці професійних захворювань ДУ «Інститут медицини праці НАМН України». Дослідну групу склали гірники з діагнозом ХОЗЛ (згідно з критеріями GOLD [9]), – 72 особи віком $53,7 \pm 4,7$ роки, середній стаж роботи в підземних умовах $21,8 \pm 6,2$ роки; до контрольної групи ввійшли 79 шахтарів, які не мають патології бронхолегеневої системи, віком $48,2 \pm 9,3$ роки, підземний стаж $20,2 \pm 6,1$ роки.

ДНК для молекулярно-генетичних досліджень виділяли з лейкоцитів периферичної крові стандартним методом за допомогою

комерційної тест-системи «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс», Росія).

Визначення поліморфізму С⁻¹⁵⁶²→Т (rs 3918242) промотору гена ММР-9 проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним аналізом рестрикційних фрагментів [10]. Для цього ампліфікували промотор вказаного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямий (sense) – (5'-СААСGТАGТGAAАССССАТСТСТ-3') і зворотний (antisense) – (5'-ТССАGСССAAТТАТСАСАСТТАТ-3'). ПЛР проводили з використанням реагентів фірми «Fermentas» (Латвія). Для ампліфікації використовували 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 2,5 мкл 10-кратного Tag-буфера з (NH₄)₂SO₄, 2,5 мкл 25 · 10⁻³ моль/л розчину MgCl₂, 2,5 мкл 2 · 10⁻³ моль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 пмоль/л прямого та зворотного праймерів і 0,5 МО Таq ДНК-полімерази, об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в багатоканальному ампліфікаторі «Parker Elmer 2700» (США). Ампліфікація гена ММР-9 складалася з 30 циклів: денатурація – 94 °С (1 хв), гібридизація праймерів – 59 °С (45 с) та елонгація – 72 °С (1 хв).

На наступному етапі 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°С протягом 18 год із 1,5 МО рестриктази PaeI («Fermentas», Латвія). Ампліфікати фрагменту промотору гена ММР-9 після рестрикції розділяли в 2,5%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидид. Наявність в -1562 положенні промотору гена ММР-9 цитозину перешкоджає рестрикції (фрагмент 379 пар основ), а при заміні його на тимідин ендонуклеаза PaeI розщеплює ампліфіковану ділянку промотору (розмір фрагмента 320 пар основ). Візуалізацію ДНК після горизонтального електрофорезу (180 В протягом 20 хв) проводили за допомогою транслюмінатора («Біоком», Росія) та відео-системи ViTran (рис. 1).

При статистичному аналізі отриманих результатів використовували стандартний метод χ^2 і відношення шансів (ВШ). Відпо-

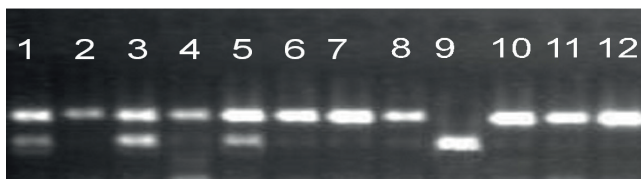


Рис. 1. Результати електрофорезу фрагмента поліморфізму C⁻¹⁵⁶²→Т промотору гена MMP-9 після рестрикції з використанням ферменту PaeI: смужки 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12 відповідають генотипу CC; 1, 3, 5 – генотипу CT; 9 –генотипу TT

відність розподілу генотипів оцінювали згідно з законом Харді–Вайнберга. Визначення достовірності відмінностей у розподілі генотипів проводили за допомогою статистичної програми Statistica 8.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз розповсюдженості алельних варіантів поліморфізму C⁻¹⁵⁶²→Т гена MMP-9 показав, що частота розподілення Т-алеля у шахтарів дослідної групи становила – 21,5 %, контрольної – 12,7 % (табл. 1). При статистичній обробці отриманих результатів було визначено значення ВШ мінорного Т-алеля для шахтарів дослідної групи відносно контролю (ВШ=1,89; 95 % довірчий інтервал – ДІ: 0,98–3,66), що вказує на його зв'язок з ризиком розвитку ХОЗЛ.

С-алель поліморфізму C⁻¹⁵⁶²→Т гена MMP-9 був виявлений у 78,5 % шахтарів дослідної групи і 87,3 % – контрольної. Було встановлено значення ВШ для С-алеля (ВШ=0,53; 95% ДІ: 0,27–1,02), що свідчить про його протекторну роль щодо ризику розвитку ХОЗЛ.

При обчисленні результатів за допомогою методу χ^2 було знайдено статистично досто-

вірну різницю частот доміантного С- та мінорного Т-алелів поліморфізму C⁻¹⁵⁶²→Т гена MMP-9 між обстеженими дослідної та контрольної груп ($\chi^2=3,61$; $P<0,05$).

Частотний розподіл генотипів за геном MMP-9 в дослідній і контрольній групах представлений на рис. 2. Для встановлення зв'язку генотипів за поліморфізмом C⁻¹⁵⁶²→Т гена MMP-9 з ризиком розвитку ХОЗЛ були визначені їх частоти у шахтарів обох груп. Слід відзначити, що отримані значення частот генотипів та алелів гена MMP-9 за цим поліморфізмом були близькими до популяційних частот європеїдів, що за даними літератури сягає: доміантні гомозиготи CC – 64,7 %; гетерозиготи CT – 32,4 %, мінорні гомозиготи TT – 2,9 % [11].

За результатами проведеного дослідження частота розповсюдженості TT-генотипу в групі хворих становила 6,9 %. У контрольній групі респонденти з таким генотипом відсутні (табл. 2). Відповідність розподілу генотипів до закону Харді–Вайнберга у контрольній групі була перевірена за допомогою тесту χ^2 із 1 ступенем свободи, з використанням корекції Йетса. Розподіл генотипів у контрольній групі відповідає закону Харді–Вайнберга ($P>0,05$).

Таблиця 1. Розповсюдженість (%) алелів С і Т поліморфізму C⁻¹⁵⁶²→Т гена MMP-9 у популяції шахтарів

| Групи обстежених | С | Т |
|--------------------|-----------------|-----------------|
| Контрольна (n=158) | 87,3 (n=138) | 12,7 (n=20) |
| Дослідна (n=144) | 78,5 (n=113)* | 21,5 (n=31)* |
| ВШ; 95% ДІ | 0,53; 0,27-1,02 | 1,89; 0,98-3,66 |

Примітка. Тут і в табл. 2 ВШ – відношення шансів, ДІ – довірчий інтервал. * $P<0,05$ –статистична вірогідність у розподілі алелей у порівнянні з контрольною групою.

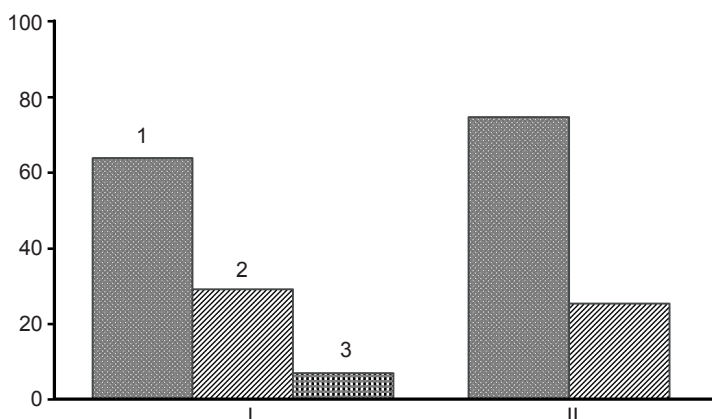


Рис. 2. Розподіл частот генотипів поліморфізму C⁻¹⁵⁶²→T промотору гена MMP-9 у популяції шахтарів: I – контрольна група, II – дослідна група; 1 – CC-генотип, 2 – CT-генотип, 3 – TT-генотип

При аналізі результатів дослідження за допомогою методу χ^2 вдалося знайти статистично значущі відмінності у розподілі генотипів в групі хворих на ХОЗЛ та в контролі ($P < 0,05$).

Встановлено статистично достовірну різницю частот TT-генотипу поліморфізму C⁻¹⁵⁶²→T гена MMP-9 між шахтарями дослідної і контрольної груп ($\chi^2=5,64$; $P < 0,01$). Крім того, було визначено асоціацію між генотипами TT і CT і підвищеним ризиком розвитку ХОЗЛ у дослідній групі відносно контролю (ВШ=2,18; 95 % ДІ: 1,83–2,60; ВШ=1,21; 95 % ДІ: 0,56–2,66). Отже, була знайдена асоціація між мінорним Т-алелем і генотипами TT та CT поліморфізму C⁻¹⁵⁶²→T промотору гена MMP-9 з ризиком розвитку ХОЗЛ у шахтарів основних підземних професій.

За даними наукових досліджень внаслідок точкової мутації гена MMP-9 у позиції 1562 замінюється цитозин на тимідин. У результаті чого значно знижується рівень зв'язування Т-алеля з супресором, який контролює рівень швидкості транскрипції [12]. Таким чином,

збільшується секреція білкового продукту гена, що може бути причиною розвитку патологічного процесу в легенях. Підтвердження цього припущення є відомості, у яких показано зв'язок ХОЗЛ з наявністю в генотипі мінорного Т-алеля або TT-генотипу гена MMP-9 [13]. Проте відомі і протилежні дані, що вказують на відсутність кореляції цього поліморфізму з розвитком ХОЗЛ [14]. Можливою причиною таких суперечливих результатів є різні популяційні вибірки досліджень. Слід зазначити, що вивчення поліморфізму C⁻¹⁵⁶²→T промотору гена MMP-9 у популяції шахтарів України раніше не проводилося.

Також під час дослідження було визначене значення ВШ для носіїв генотипу CC гена MMP-9 (ВШ=0,60; 95 % ДІ: 0,28–1,28), що свідчить про протекторну роль такого генотипу відносно ризику розвитку ХОЗЛ у зазначеній групі обстежених. Це пояснюється менш інтенсивним синтезом протеолітичного ферменту, матриксної металопротеїнази-9, у осіб, в генотипі яких наявний домінуючий алель С, що має важливе значення у патогенезі ХОЗЛ.

Таблиця 2. Розповсюдженість генотипів (%) поліморфізму C⁻¹⁵⁶²→T гена MMP-9 у популяції шахтарів

| Групи обстежених | CC | CT | TT | P, χ^2 |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|
| Контрольна (n=79) | 74,7 (n=59) | 25,3 (n=20) | 0 (n=0) | P≤0,04 |
| Дослідна (n=72) | 63,9 (n=46) | 29,2 (n=21) | 6,9 (n=5)* | |
| ВШ; 95% ДІ | 0,60; 0,28-1,28 | 1,21; 0,56-2,65 | 2,18; 1,83-2,60 | |

ВИСНОВКИ

1. У результаті проведеного дослідження була встановлена асоціація між мінорним Т-алелем ($\chi^2=3,61$; $P<0,05$) і генотипом ТТ ($\chi^2=5,64$, $P<0,01$) поліморфізму C⁻¹⁵⁶²→Т промотору гена MMP-9 з ризиком розвитку ХОЗЛ у шахтарів України.

2. При розрахунку співвідношення шансів показано протекторне значення С-алеля та СС-генотипу поліморфізму C⁻¹⁵⁶²→Т промотору гена MMP-9 відносно до ризику розвитку ХОЗЛ у шахтарів дослідної та контрольної груп.

3. Отримані результати досліджень дають змогу удосконалити заходи первинної профілактики за допомогою включення визначення поліморфізму C⁻¹⁵⁶²→Т промотору гена MMP-9 як біомаркера схильності до розвитку ХОЗЛ.

А.В. Басанец, Л.В. Долинчук, Т.А. Андрущенко

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА C⁻¹⁵⁶²→Т ПРОМОТОРА ГЕНА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛОПРОТЕИНАЗЫ-9 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ У ШАХТЕРОВ

Проанализированы генетические маркеры наследственной предрасположенности, которые обуславливают развитие хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) профессиональной этиологии. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) определяли полиморфизм C⁻¹⁵⁶²→Т (rs3918242) промотора гена матричной металлопротеиназы-9 (MMP-9) с последующим анализом рестрикционных фрагментов. Группу исследования составили шахтеры, больные ХОБЛ, контрольную – без патологии органов дыхания. Частота распределения генотипов за полиморфизмом C⁻¹⁵⁶²→Т гена MMP-9 была близкой к европеоидной популяции. С помощью метода отношения шансов (ОШ) установлена связь между мінорным Т-алелем (ОШ = 1,89, 95 % доверительный интервал – ДИ: 0,98–3,66) и генотипами ТТ (ОШ = 2,18, 95% ДИ : 1,83–2,60) и СТ (ОШ = 1,21, 95 % ДИ: 0,56–2,66) гена MMP-9 с риском развития ХОБЛ у шахтеров основных подземных профессий. Наличие в геноме доминантного С-аллеля (ОШ = 0,53, 95 % ДИ: 0,27–1,02) и генотипа СС (ОШ = 0,60, 95 % ДИ: 0,28–1,28) данного гена обуславливают относительную протективную роль по отношению к риску развития ХОБЛ среди групп исследования. Полученные результаты открывают перспективы для усовершенствования мероприятий пер-

вичной профилактики ХОБЛ на основании определения генетической предрасположенности к ее развитию.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, генетическая предрасположенность, шахтеры основных подземных профессий.

A.V. Basanets, L.V. Dolinchuk,

T.A. Andrushchenko

THE ASSOCIATION OF PROMOTER GENE MATRIX METALLOPROTEINASE-9 POLYMORPHISM C⁻¹⁵⁶²→Т WITH THE RISK OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE IN MINERS

We analyzed genetic markers of genetic susceptibility that lead to development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) of occupational etiology. Polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism analysis were performed to detect a point mutation at the promoter of C⁻¹⁵⁶²→Т (rs3918242) of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene. The study comprised 72 miners with COPD, and 79 miners without respiratory system pathology. The frequency of allocation for genotypes MMP-9 gene polymorphism C⁻¹⁵⁶²→Т was similar to Caucasian population. The study established the association between the minor T-allele (Odds Ratio (OR) = 1.89; 95% confidence interval (CI): 0.98-3.66) and TT (OR = 2.18; 95% CI: 1.83-2.60) and CT (OR = 1.21; 95% CI: 0.56-2.66) genotypes with the risk of COPD in miners of main underground occupations. Presence in the genome dominant C-allele (OR = 0.53; 95% CI: 1.02-0.27) and CC genotype (OR = 0.60; 95% CI: 0.28 - 1.28) determine the relative protective role in risk to COPD among respondents of the studied group. The results of research opens new perspectives for improving measures of primary prevention of COPD based on determining genetic predisposition to COPD development.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, genetic predisposition, miners of major underground occupations.

SI "Institute of Occupational Health of NAMS of Ukraine", Kyiv

REFERENCES

1. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J.* 2006;27:397-412.
2. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3(11):e442.
3. Trupin L, Earnest G, San Pedro M, Balmes JR, Eisner MD, Yelin E, et al. The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2003. 22(3).462–69.
4. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Bur-

- ney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a populationbased prevalence study. *Lancet*. 2007;370:74150.
5. Kundiev YI, Nahorna AM, Basanets AV. Occupational diseases that arise due to dust. In: Kundiev YI, editors. *Professional health in Ukraine*. Kyiv: Avicena;2006. p. 99-124.
 6. Elkington PTG, Friedland JS. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax*. 2006.61.259–66.
 7. Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Konttinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest*. 1998.78.1077–87.
 8. Zhang B, Henney A, Eriksson P, Hamsten A, Watkins H, Ye S. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. *Hum Genet*. 1999a.105.418–23.
 9. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. *Global Strategy or the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic ObstructiveLung Disease*. NHLBI/WHO workshop report. Last update 2011. Available from: <http://www.goldcopd.com>.
 10. Jones GT, Phillips VL, Harris EL, Rossaak JI, van Rij AM. Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C-1562T) associated with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2003. 38(6):1363-7.
 11. National Center for Biotechnology Information Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.
 12. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1999b.99.1788–94.
 13. Minematsu N, Nakamura H, Tateno H, Nakajima T, Yamaguchi K. Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001.289(1).116-9.
 14. Joos L, He JQ, Shepherdson MB, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, et al. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet*. 2003.12.803–4.

*Матеріал надійшов
до редакції 01.07.2014*