

© А. М. Шамсиев, Ш. А. Юсупов, Л. А. Мухаммадиева, Б. А. Юлдашев  
Самаркандский государственный медицинский институт, Республика Узбекистан

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ И ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОГО БРОНХИТА У ДЕТЕЙ

**Резюме.** В последние годы пристальное внимание уделяется изучению генетических механизмов формирования хронических заболеваний органов дыхания, особенно роли провоспалительных клеточных протеиназ.

**Цель исследования** – изучить полиморфизм гена матричных протеиназ (MMP) среди детей с хроническим бронхитом.

**Материалы и методы.** В исследование были включены образцы ДНК 30 больных детей с хроническим бронхитом и 100 здоровых детей группы контроля. Материалом для молекулярно-генетического исследования мутаций служила геномная ДНК.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Установлено, что процент гетерозиготного генотипа для MMP9 (82A>G) был выше среди здоровых детей (46,6 % против 23,3% у пациентов с хроническим бронхитом). Отмечено увеличение части гомозиготных носителей А аллеля гена MMP12 (82A4G) у детей с хроническим бронхитом. Сравнительные исследования полиморфизма гена MMP12 в группе больных хроническим бронхитом и здоровых детей показали увеличение гомозиготных АА генотипов полиморфизма А82G гена матричных металлопротеиназ MMP12 среди первых.

**Выводы.** Воспалительный процесс играет центральную роль в патогенезе хронических заболеваний органов дыхания. Данные исследования свидетельствуют, что MMP12 семейства матричных металлопротеиназ активно вовлечён в патогенез детского хронического бронхита. Полученные результаты генотипирования и анализа генетической ассоциации позволят разработать доступный для практического врача алгоритм выявления группы риска, у которой высока вероятность возникновения хронического бронхита.

**Ключевые слова:** хронический бронхит; дети; генетические факторы риска; матричные металлопротеиназы.

**ВСТУПЛЕНИЕ** В связи со значительной распространённостью хронических неспецифических заболеваний лёгких (ХНЗЛ) и высоким уровнем инвалидности, одной из важнейших задач здравоохранения является профилактика и эффективная диагностика и лечение детей с хроническим бронхитом (ХБ).

Генетические механизмы формирования острых и хронических болезней органов дыхания в последние годы стали объектом широкомасштабных исследований во всем мире.

Неотъемлемой частью профилактических программ сегодня является генетический скрининг. Проведение молекулярно-генетического исследования позволяет снизить уровень заболеваемости ХБ у детей путём выявления предрасположенности к его развитию. В тоже время выявление генного полиморфизма с проявлением ХБ у детей может способствовать решению задач формирования групп риска и осуществлению среди указанных групп превентивных мероприятий, а также лучшему пониманию патогенеза данного состояния. В связи с этим весьма актуальным является вопрос о том, каков количественный вклад генетических механизмов в развитие ведущих симптомов ХБ у детей.

Результаты проведённого полногеномного анализа сцепления при хронических болезнях органов дыхания показали высокую степень сцепления локусов на хромосоме 19q – TFG-beta1 (transforming growth factor beta 1, трансформирующий фактор роста бета1) и хромосоме 2q – SERPINE2 (serpin peptidase inhibitor, clade E, серпиновый ингибитор пептидаз тип E) [1]. При полногеномных исследованиях генетических ассоциаций (GWAS) выявлено несколько локусов, связанных с развитием хронических болезней органов дыхания: на 4-й и 15-й хромосомах в области 15q25.1 – CHRNA3, CHRNA5 (cholinergic receptor nicotinic alpha 3 and 5, холинергические никотиновые рецепторы альфа-3 и -5), IREB2 (iron-responsive element binding protein 2, белок железосвязывающего элемента 2), PSMA4 (proteasome subunit alpha type 4, субъединица альфа-4-го типа протеосомного комплекса), 4q31.21 – HHIP (hedgehog interacting protein, взаимодействующий

протеин hedgehog сигнального пути), 4q22.1 – F AMI 3A (family with sequence similarity 13 member A, член А семейства со схожей последовательностью 13) и новый маркер rs7937 на хромосоме 19qL3 [2].

До “эры GWAS” генетическая составляющая хронических obstructивных болезней лёгких достаточно активно изучалась с использованием анализа генов-кандидатов [3, 4]. Данный метод до сих пор наиболее широко используется при проведении исследований по генетике хронических болезней лёгких, поскольку позволяет сосредоточиться на одном или нескольких функционально значимых аллельных вариантах гена, кодирующих соответственно варианты белка, различающиеся по структуре и функциям, некоторые из которых могут быть вовлечены в развитие патогенетических изменений.

Однако несмотря на значительное число исследований, выполненных с использованием разных подходов, молекулярно-генетические основы хронических болезней органов дыхания до сих пор остаются во многом не ясными.

На сегодняшний день перспективным является изучение не только генетических и молекулярных, но и эпигенетических факторов, таких, как метилирование ключевых генов, анализ активности гистонов, роли микро-РНК и т.д. Работа в различных направлениях позволит приблизиться к пониманию сложных процессов, приводящих к развитию болезни.

Резюмируя, можно констатировать, что недостаточная диспансерная работа и низкий уровень выявляемости того или иного лёгочного заболевания приводят к тому, что детей лечат с другими диагнозами, неадекватно. В результате, большинство детей поступает с запущенным патологическим процессом, который уже практически мало поддаётся консервативной терапии и требует хирургических вмешательств, например бронхоэктатическая болезнь. Наиболее значимыми является разработка новых методологических подходов к ранней диагностике, лечению и профилактике ХНЗЛ у детей.

Известно, что наверно наибольшая роль в процессе деструкции альвеолярной матрицы принадлежит провоспалительным клеточным протеинам [5]. Протеолитические ферменты являются основными регуляторами воспалительных и иммунных реакций, связанных не только с деградацией белков экстрацеллюлярного матрикса и высвобождение связанных интерлейкинов, но и расщеплением цитокинов и хемокинов, и, как следствие модуляции биологической активности медиаторов воспаления. Среди них – матричные металлопротеиназы (MMPs, Matrix Metalloproteinases) – семейство из 26 ферментов неотъемлемая часть процессов развития, тканевого ремоделирования и восстановления. Патологическая экспрессия MMP ассоциируется с многими деструктивными процессами, включая пролиферацию опухолевой ткани, артриты, артериальные аневризмы и легочная эмфизема [5].

**Целью исследования** было изучить полиморфизм гена матричных протеиназ среди детей с хроническим бронхитом.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ** В исследование были включены образцы ДНК 30 больных детей с хроническим бронхитом и 100 здоровых детей группы контроля.

Материалом для молекулярно-генетического исследования мутаций служила геномная ДНК, которая хранилась при температуре -20 °С. Мутации определялись методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием праймеров и зондов. В работе использовано ниже перечисленное оборудование:

1. GeneAmp® ПЦР – амплификатор Applied Biosystems 9700.
2. Генетический анализатор ABI PRISM 310.
3. Дозаторы Pipetman.
4. Центрифуга Eppendorf 5417C.
5. Вортекс Genie Scientific Industries, INC.
6. Аппарат для проведения горизонтального электрофореза (Helicon, Россия).
7. Гель-документирующая система “WiseDoc WGD-30”(DAIHAN, Корея).
8. Термостат (Bio-Rad, Китай).

**Выделение ДНК.** Материалом для ДНК служила венозная кровь из локтевой вены объемом 1 мл. Для сбора, хранения и транспортировки крови использовались одноразовые пластиковые пробирки объемом 2,5 мл с антикоагулянтом (консерватором) объемом 0,5 мл. Кровь для дальнейшей обработки хранилась при температуре не менее +4 °С.

Выделение ДНК из цельной крови осуществлялось набором реагентов Diatom™DNA Prep200 по стандартному протоколу (производство ООО “Лаборатория ИзоГен”, Москва). Данный набор реагентов основан на использовании лизирующего реагента с гуанидинтиоцианатом, который предназначен для лизиса клеток, солубилизации клеточного дербиса, а также для денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии лизирующего реагента ДНК активно сорбируется на NucleoS™ – сорбенте. ДНК, элюированная из сорбента ЭкстраГеном Е™, напрямую использовалась для дальнейшего проведения анализа.

#### **Расчет рабочих концентраций праймеров**

Поставка ПЦР- праймеров производителем осуществляется в количествах, измеряющихся в оптических единицах (ОЕ) в лиофилизированном виде. Для расчёта рабочих

концентраций праймеров ОЕ перевели в мкмоль. Определяли концентрацию праймера, исходя из того, что 1 ОЕ олигонуклеотида соответствует концентрации 33 мкг/мл.

Для праймера, имеющего длину n пар нуклеотидов (п.н.), поставляемого в количестве (ОЕ), пересчет осуществлялся по этой формуле:

$$X = MW/10/(ОЕ) \times 33;$$

#### **Приготовление рабочего раствора праймеров**

Рабочий раствор (10 мкмоль) праймеров из лиофильного стока-праймера приготавливали по следующему расчёту:

$$50 \text{ мкл сток} + 450 \text{ мкл ddH}_2\text{O}$$

#### **Постановка ПЦР для амплификации генов**

ПЦР проводили с помощью набора PCR Core.

Dilent – 10 µl

Праймер – F1 – 2,5 µl

Праймер – R4 – 2,5 µl

ДНК – 5 µl

ДНК выделяли из 1 мл венозной крови методом нуклеосорбции и анализировали методами агарозного гель-электрофореза, концентрации ДНК проверяли спектрофотометрически по отношению поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (260 нм/280 нм), среднее отношение значений 260 нм/280 нм было равно 1.6–1.8.

Аллельные варианты полиморфных генов подвергались классическому молекулярно-эпидемиологическому анализу – сопоставлению встречаемости аллелей и генотипов у больных хроническим бронхитом и контролей. Тест на соответствие контрольной выборки равновесию Харди – Вайнберга проводили с использованием метода  $\chi^2$  ( $\alpha = 0,05$ ,  $df = 1$ ). Для выявления ассоциации между заболеванием и генотипом использовались мультипликативная и аддитивная модели наследования.

Ассоциацию между заболеванием и генотипом определяли с помощью критерия  $\chi^2$  (с коррекцией Йейтса на непрерывность выборки), либо точным двусторонним критерием Фишера, сравнивая распределение генотипов и аллелей по каждому полиморфизму между группами пациентов и контролей.

Показатели “отношения шансов” (OR-odds ratio) с 95 % доверительным интервалом (95 % CI) рассчитывались для “редкого” аллеля, носителей “редкого” аллеля (гетерозигот + гомозигот по “редкому” аллелю) относительно “частых” аллелей и гомозигот по “частому” аллелю соответственно. Аналогичный расчёт проводился для гомозигот по “редкому” аллелю относительно гетерозигот и гомозигот по “частому” аллелю.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ** Процент гетерозиготного генотипа для MMP9 (82A>G) был выше среди здоровых детей (46,6 % против 23,3 % у пациентов с хроническим бронхитом,  $P_{adj}=0,0033$ ,  $P_{cor}=0,033$ , отношение шансов (OR)=0,51 locus был связан с хроническим бронхитом в аддитивной модели ( $P_{adj}=0,0091$ ,  $P_{cor}=0,09$ , OR=0,45,  $\beta=-0,798$ ). Locus A гена MMP12 встречался в группе больных в 88,33 % по сравнению с 76,66 % в группе здоровых, что может говорить о возможном риск-факторе этого аллеля в развитии бронхита.

Отмечено увеличение части гомозиготных носителей A аллеля гена MMP12 (82A4G) у детей с хроническим бронхитом. Проводя параллели с данными других исследований, обнаружено, что аллель MMP12 (82A4G) имеет более высокую аффинность к фактору транскрипции AP-1, что приводит к более высокому уровню экс-

прессии гена [6]. AA генотип MMP12 (82A4G) был связан со снижением дыхательной функции (объем форсированного выдоха за 1 с) у взрослых курильщиков [7]. Другой функциональный MMP12 полиморфизм, 1082A4G (rs652438) были связаны с тяжестью астмы и COPD [8]. MMP12 действует в качестве важного регулятора воспаления и ремоделирования дыхательных путей в развитии аллергического воспаления, способствуя более тяжелым клиническим проявлениям астмы с частыми приступами [9]. Мы полагаем, что лечение MMP12 ингибирующими препаратами может быть перспективным подходом в терапии бронхиальной астмы. Наши данные свидетельствуют о том, что MMP12 более сильно вовлечен в патогенез не только бронхиальной астмы, но и детского хронического бронхита неаллергической природы. Тем не менее, более всесторонние исследования на больших количествах образцов позволят сделать более точные выводы.

Сравнительные исследования полиморфизма гена MMP12 в группе больных хроническим бронхитом и здоровых детей показали увеличение гомозиготных AA генотипов полиморфизма A82G гена матричных металлопротеиназ MMP12, что свидетельствует о том, что MMP12 вовлечён в патогенез не только бронхиальной астмы, но и детского хронического бронхита.

**ВЫВОДЫ** Воспалительный процесс играет центральную роль в патогенезе хронических заболеваний органов дыхания, так как является основной причиной всех функциональных и морфологических изменений. Нарушение регуляции воспалительного процесса явля-

ется причиной патологического повреждения тканей лёгких. Повышенная активность MMP12 семейства матричных металлопротеиназ играет важную роль в различных заболеваниях дыхательных путей, поражающую лёгочную ткань и альвеолярные структуры. Дисрегуляции могут способствовать патология хронических заболеваний бронхолегочной системы, такие, как астма, эмфизема легких, ХОБЛ, бронхолегочная дисплазия и кистозный фиброз, острый респираторный дистресс-синдром и респираторный дистресс-синдром новорожденных.

**Перспективность дальнейших исследований** Полученные результаты генотипирования и анализа генетической ассоциации позволят разработать доступный для практического врача алгоритм выявления группы риска, у которой высока вероятность возникновения хронического бронхита. Кроме того, будет разработан комплекс мероприятий целенаправленной профилактики хронического бронхита.

Определение генетических факторов риска развития ХБ позволит обоснованно планировать и внедрять лечебно-профилактические мероприятия. Внедрение комплекса организационных, медикосоциальных, профилактических мероприятий с учётом генетических факторов позволит управлять риском развития ХБ у детей. Реализация "стратегии генетического риска" на основе разработанных генетических критериев формирования групп повышенного риска развития хронического бронхита будет способствовать раннему выявлению и лечению заболевания, что значительно улучшит его прогноз.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Genomewide linkage analysis of quantitative spirometric phenotypes in severe early-onset chronic obstructive pulmonary disease / E. K. Silverman, L. J. Palmer, J. D. Mosley [et al.] // *American Journal of Human Genetics*. – 2002. – No. 70(5). – P. 1229–1239.
2. BOOST: a fast approach to detecting gene-gene interactions in genome-wide case-control studies / P. Wang, M. Dai, W. Xuan, [et al.] // *American Journal of Human Genetics*. – 2010. – No. 87(3). – P. 325–340
3. SNP Function Portal: a web database for exploring the function implication of SNP alleles / P. Wang, M. Dai, W. Xuan [et al.] // *Bioinformatics*. – 2006. No. 22(14). – P. e523-e529
4. Opportunities and Challenges in the Genetics of COPD 2010 / E. K. Silverman, J. Vestbo, A. Agusti [et al.] // *An International COPD Genetics Conference Report*. COPD. – 2011 – No. 8(2). – P. 121–135.
5. Genomics of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD); Exploring the SNPs of Protease-Antiprotease Pathway / M. Kumar,

N. Phougat, S. Ruhil [et al.] // *Current Genomics*. – 2013. – Vol. 14(3). – P. 204–213.

6. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling / V. Lagente, B. Manoury, S. Nenan [et al.] // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. – 2005. – No. 38(10). – P. 1521–1530.

7. MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations / G. M. Hunninghake, M. H. Cho, Y. Tesfayigzi [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2009. – No. 361(27). – P. 2599–2608.

8. Matrix metalloproteinase-12 is a therapeutic target for asthma in children and young adults / S. Mukhopadhyay, J. Sypek, R. Tavendale [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2010. – No. 126(1). – P. 70–76.

9. Moccchegiani E. Metalloproteases / anti-metalloproteases imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: genetic factors and treatment implications / E. Moccchegiani, R. Giacconi, L. Costarelli // *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. – 2011. – No. 17. – P. S11–S19.

Получено 06.02.17

©A. M. Shamsiev, Sh. A. Yusupov, L. A. Muhammadieva, B. A. Yuldashev  
Samarkand State Medical Institute, Samarkand, Uzbekistan

#### GENETIC DIAGNOSIS AND MECHANISMS OF CHRONIC BRONCHITIS IN CHILDREN

**Summary.** Recent studies pay a lot of attention to genetic mechanisms of formation of chronic pulmonary diseases, especially, the role of matrix metalloproteinases (MMPs).

**The aim of the study** – an investigation of matrix metalloproteinases' gene polymorphism among children with chronic bronchitis.

**Materials and Methods.** DNA samples of 30 children with chronic bronchitis and 100 healthy children were included into investigation. **Results and Discussion.** It was found that percentage of heterozygous genotype for MMP9 (82A>G) was higher among healthy children group (46.6 and 23.3 % among patients with chronic bronchitis). Homozygous carriers of the A allele for MMP12 gene (82A4G) were prevailed among children with chronic bronchitis. Comparative study of MMP12 gene polymorphism among two groups showed increasing quantity of homozygous AA genotypes A82G of MMP12 among children with chronic bronchitis.

**Conclusions.** Inflammation has a crucial role in pathogenesis of chronic pulmonary diseases. The results of our investigation showed that active part of it the MMP12 are from family of matrix metalloproteinases. Genotyping and analysis are the essential part of algorithm for physicians to find out the risk groups among children with pulmonary diseases.

**Key words:** chronic bronchitis; children; genetic risk factors; matrix metalloproteinases.

©А. М. Шамсієв, Ш. А. Юсупов, Л. А. Мухаммадієва, Б. А. Юлдашев  
Самаркандський державний медичний інститут, Республіка Узбекистан

#### ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ ТА ДІАГНОСТИКИ ХРОНІЧНОГО БРОНХІТУ В ДІТЕЙ

**Резюме.** Останнім часом багато уваги приділяється вивченню генетичних механізмів формування хронічних захворювань органів дихання, особливо ролі прозапальних клітинних протеїназ.

**Мета дослідження** – вивчити поліморфізм гена матричних протеїназ (ММР) серед дітей із хронічним бронхітом.

**Матеріали і методи.** У дослідження були включені зразки ДНК 30 дітей, хворих на хронічний бронхіт, та 100 здорових дітей групи контролю. Матеріалом для молекулярно-генетичного дослідження слугувала геномна ДНК.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Встановлено, що відсоток гетерозиготного генотипу для MMP9 (82A>G) був вищим серед здорових дітей (46,6 % порівняно з 23,3 % серед пацієнтів із хронічним бронхітом). Відзначено зростання питомої ваги гомозиготних носіїв А алеля гена MMP12 (82A4G) серед дітей із хронічним бронхітом. Порівняльне дослідження поліморфізму гена MMP12 показало зростання гомозиготних АА генотипів поліморфізму А82G гена матричних металопротеїназ MMP12.

**Висновки.** Запальний процес відіграє ключову роль у патогенезі хронічних захворювань органів дихання. Дані, отримані нами, свідчать, що MMP12 сімейства матричних металопротеїназ, активно залучений у патогенез хронічного бронхіту. Отримані результати генотипування та аналізу генетичної асоціації дозволяють розробити доступний для практичного лікаря алгоритм виявлення груп ризику з високою ймовірністю розвитку хронічного бронхіту.

**Ключові слова:** хронічний бронхіт; діти; генетичні фактори ризику; матричні металопротеїнази.