



Мухамадиева Л.А. ✉, Кудратова З.Э.

Самаркандский государственный медицинский университет, Самарканд, Узбекистан

Распределение и влияние генотипов полиморфного маркера генов на развитие хронического бронхита у детей

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: обзор литературы, подбор и анализ данных – Кудратова З.Э.; концепция, дизайн исследования и научное руководство – Мухамадиева Л.А.

Подана: 16.03.2023

Принята: 11.09.2023

Контакты: rusti-1811@mail.ru

Резюме

Цель. Изучить полиморфизм генотипов генов матриксных металлопротеиназ 12 (MMP12) и interferon regulatory factor-4 (IRF-4) с целью выявления предрасположенности к хроническому бронхиту (ХБ) у детей.

Материалы и методы. Материалом для молекулярно-генетического исследования мутаций служила геномная ДНК. Мутации определялись методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для изучения распространенности полиморфизмов генов MMP12, IRF-4 была исследована кровь детей с хроническим бронхитом (основная группа; 98 из 100 образцов) и здоровых детей (контрольная группа; 100 образцов). Генотипирование проводилось в лаборатории геномики Института биоорганической химии Академии наук Республики Узбекистан (АН РУз).

Результаты. Генетический анализ 98 образцов ДНК пациентов с ХБ выявил следующее распределение генотипов в гене MMP12: гомозиготными носителями генотипа AA оказались 66 (67,3%) обследованных, гетерозиготами (AG) – 31 (31,6%), в то время как количество носительство генотипа GG составило 1 (1%). В нашем исследовании у детей с хроническим бронхитом доля гомозиготных носителей AA генотипа гена MMP12 (82A4G) встречалась чаще, чем у здоровых детей. Частота распределения аллелей A и C гена IRF-4 у детей с ХБ составила 43,3 и 56,7%, в контрольной группе – 35,0 и 65,4%.

Заключение. Необходимо дальнейшее изучение генетической предрасположенности к развитию хронического бронхита с целью прогнозирования течения болезни, а также проведения профилактических мероприятий по предупреждению хронизации воспалительного процесса.

Ключевые слова: хронический бронхит, генетические маркеры, гомозиготные носители, гетерозиготы, генотипы

Lola A. Muxamadiyeva ✉, Zebo E. Kudratova
Samarkand State Medical University, Samarkand, Uzbekistan

Allocation and Influence of Polymorphic Gene Marker Genotypes on the Development of Chronic Bronchitis in Children

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: literature review, data analysis – Zebo E. Kudratova; concept, design of the study and scientific management – Lola A. Muxamadiyeva.

Submitted: 16.03.2023

Accepted: 11.09.2023

Contacts: rusti-1811@mail.ru

Abstract

Purpose. To study the genotype polymorphism of the matrix metalloproteinase 12 (MMP12) and interferon regulatory factor-4 (IRF-4) genes in order to identify a predisposition to chronic bronchitis (CB) in children.

Materials and methods. The material for molecular genetic studies of mutations was genomic DNA. Mutations were determined by polymerase chain reaction (PCR). To study the prevalence of MMP12, IRF-4 gene polymorphisms blood of children with chronic bronchitis (study group) (98 of 100 samples) and healthy children (control group) (100 samples) were examined. Genotyping was performed in the Genomics Laboratory of the Institute of Bioorganic Chemistry of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan (Uzbek Academy of Sciences).

Results. Genetic analysis of 98 DNA samples of patients with chronic bronchitis revealed the following genotype distribution in the MMP12 gene: 66 (67.3%) examined were homozygous carriers of AA genotype and 31 (31.6%) were heterozygous (AG), while the number of carriers of unfavorable GG genotype was 1 (1%). In our study in children with chronic bronchitis, the proportion of homozygous carriers of AA genotype of MMP12 gene (82A4G) increases. Adverse allele and genotype polymorphism rs652438 of MMP12 gene is not a marker predisposing to development of chronic bronchitis in Uzbekistan. The frequency of distribution of alleles A and C of IRF-4 gene in CB was 43.3% and 56.7%, in the control group – 35.0 and 65.4%.

Conclusion. It is necessary to further study genetic predisposition to the development of chronic bronchitis in order to predict the course of the disease, as well as to carry out prophylactic measures to prevent chronicisation of the inflammatory process.

Keywords: chronic bronchitis, genetic markers, homozygous carriers, heterozygotes, genotypes

■ ВВЕДЕНИЕ

Проблемы профилактики развития хронического бронхита (ХБ) являются крайне актуальными. Большое значение в диагностике хронического бронхита имеет выявление степени участия генетических факторов. Результаты исследования и данные

литературы показали, что на возникновение свойственных хроническому бронхиту нарушений существенное влияние оказывает наследственная предрасположенность в сочетании со средовыми факторами [3, 4].

Генетические механизмы формирования острых и хронических болезней органов дыхания в последние годы стали объектом широкомасштабных исследований во всем мире [1, 2, 6, 9]. Неотъемлемой частью профилактических программ сегодня является генетический скрининг.

Реализация наследственной предрасположенности к ХБ связана с генетически обусловленными структурными и функциональными особенностями обмена, нейрогуморальной регуляции, местными факторами. В своих эпидемиологических и клинических исследованиях зарубежные ученые отмечают участие генетических факторов в возникновении ХБ, что позволяет предположить существование конкретных генов, ответственных за возникновение данного заболевания [5, 7, 8, 13].

Молекулярно-генетический способ прогнозирования формирования ХБ позволяет выявлять предрасположенность к заболеванию в любом возрасте, практически с рождения человека, так как генотип конкретного индивида не меняется в течение жизни. Кроме того, предрасположенность к заболеванию может быть установлена с помощью указанного способа при отсутствии каких-либо клинических, биохимических или иммунологических проявлений, т. е. на самом раннем доклиническом этапе развития патологии. Чем раньше будет выявлено наличие генетического маркера, тем надежнее и своевременнее окажутся мероприятия по предупреждению заболевания.

Снижение заболеваемости ХБ за счет раннего эффективного выявления предрасположенности к нему, а также более эффективной профилактики ХБ приведет к значительному сокращению материальных затрат на организацию и проведение лечебных мероприятий.

Известно, ведущая роль в процессе деструкции альвеолярной матрицы принадлежит провоспалительным клеточным протеиназам [9–12]. Протеолитические ферменты являются основными регуляторами воспалительных и иммунных реакций, связанных не только с деградацией белков экстрацеллюлярного матрикса и высвобождением связанных интерлейкинов, но и с расщеплением цитокинов и хемокинов и, как следствие, модуляцией биологической активности медиаторов воспаления. Среди них матриксные металлопротеиназы (MMPs, Matrix Metalloproteinases) – семейство из 26 ферментов – неотъемлемая часть процессов развития, тканевого ремоделирования и восстановления. Патологическая экспрессия MMP ассоциируется с деструктивными процессами, включая пролиферацию опухолевой ткани, артриты, артериальные аневризмы и легочную эмфизему [6, 14–16]. По данным Корытиной Г.Ф. (2012), развитие хронических бронхолегочных заболеваний у детей ассоциировано с полиморфными вариантами генов CYP2F1 (c.1415insC), CYP1A1 (2454A>G, 3798>C), NQO1 (4650T), GSTT1 (del), GSTP1 (313A>G), CAT (–2620T), IL6 (–174G>C), IL1RN (VNTR), VDBP (1296T>G и 13070A), MMP1 (–1607 G>GG), MMP12 (–2A>G), MMP3 (–11715A>6A), MMP9 (2660A>G) [20].

Проведение молекулярно-генетического исследования позволяет снизить уровень заболеваемости ХБ у детей путем выявления предрасположенности к его развитию [9, 12, 13]. В то же 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.

До эры GWAS (whole-genome associated study) генетическая составляющая хронических обструктивных болезней легких достаточно активно изучалась с использованием анализа генов-кандидатов [14, 15, 17]. Данный метод до сих пор наиболее широко используется при проведении исследований по генетике хронических болезней легких, 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 [2, 5, 9, 10]. Несмотря на значительное число исследований, выполненных с использованием разных подходов, молекулярно-генетические основы хронических болезней органов дыхания до сих пор остаются во многом неясными [5, 7, 8, 17, 18].

Выбранные для настоящего исследования хронические бронхолегочные заболевания у детей занимают лидирующие позиции по распространенности, тяжести течения, серьезности осложнений и являются основными причинами высоких темпов роста заболеваемости, инвалидизации и смертности населения, что свидетельствует об актуальности изучения генетических основ данных заболеваний и выяснении основных причин их возникновения [3, 4, 7, 8, 19].

В этой связи назрела необходимость определения и углубленного изучения клинико-патогенетических механизмов хронического бронхита у детей, изучения генетических полиморфизмов, разработки критериев их диагностики, что имеет существенное значение для раннего распознавания заболевания и выбора адекватных терапевтических мероприятий, направленных на предотвращение прогрессирования процесса.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить полиморфизм генотипов генов матриксных металлопротеиназ 12 (MMP12) и interferon regulatory factor-4 (IRF-4) с целью выявления предрасположенности к хроническому бронхиту у детей.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для молекулярно-генетического исследования мутаций служила геномная дезоксирибонуклеаза (ДНК). Мутации определялись методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров и зондов. Для изучения распространенности полиморфизмов генов MMP12, IRF-4 были обследованы дети с хроническим бронхитом (из 100 образцов взяты для исследования 98) и контрольная группа здоровых детей (100 образцов) из данных инновационного проекта, выполненного в Самаркандском государственном медицинском университете. Генотипирование проводилось в лаборатории геномики Института биоорганической химии АН РУз.

Этапы генетических исследований:

1. Выделение ДНК.
2. ПЦР-амплификация.
3. Электрофорез.

4. Проведение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ).
5. Электрофорез продуктов ПДРФ.
6. Анализ полученных результатов.

Выделение ДНК

Материалом для ДНК служила венозная кровь из локтевой вены объемом 1 мл. Выделение ДНК из образцов осуществлялось набором реагентов. Концентрацию выделенной ДНК измеряли с помощью спектрофотометра.

Определение полиморфизма гена MMP12-82A>G

Проведение ПЦР-амплификации

ПЦР-анализ проводили с использованием набора реагентов для ПЦР-амплификации ДНК. Программа амплификации. Использовалась следующая пара праймеров:

MMP12_FGAGATAGTCAAGGGATGATATCAGC

MMP12_RAAGAGCTCCAGAAGCAGTGG

Для верификации продуктов амплификации применяют метод электрофореза.

Визуализация и фотодокументация результатов ПЦР-амплификации (электрофорез)

ПЦР-продукты амплификации фракционировали в 3% агарозном геле (в течение 60–90 мин при напряжении 120 В, окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете.

Проведение ПДРФ-анализа

После проведения стандартной ПЦР-амплификации гена MMP12 полученные ПЦР-продукты подвергались ПДРФ – полиморфизму длин рестрикционных фрагментов (рестрикции) с использованием эндонуклеазы рестрикции PvuII (фермент).

Визуализация и фотодокументация результатов ПДРФ (электрофорез)

Продукты рестрикции фракционировали в 8% полиакриламидном геле в течение 2–3 ч при 200 В, окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете.

Интерпретация результатов

После проведения фотодокументации полученные рестрицированные фрагментативные продукты генотипировали путем присутствия тех или иных фрагментов. Наличие 2 бэндов (размером 199/175 п. н.) на геле свидетельствует о генотипе AG. Присутствие только 1 бэнда размером 199 п. н. говорит о генотипе AA. Присутствие только 1 бэнда размером 175 п. н. свидетельствует о генотипе GG.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

К кандидатным генам, вовлеченным в развитие ХБ у детей, относятся следующие: MMP12, IRF-4. Ген MMP12 отвечает за работу матриксных металлопротеиназ, которые обуславливают нормальный синтез коллагена и эластина. Мутации приводят к нарушению активности ферментов и снижению эластичности ткани бронхов и легких (рис. 1).



В исследованиях других ученых было показано, что аллель MMP12 (82A4G) имеет более высокую аффинность к фактору транскрипции AP-1, что приводит к более высокому уровню экспрессии гена [10]. AA генотип MMP12(82A4G) был связан со снижением дыхательной функции (объем форсированного выдоха за 1 с) у взрослых курильщиков. Другой функциональный MMP12 полиморфизм – 1082A4G (rs652438) – был связан с тяжестью астмы и COPD. MMP12 действует в качестве важного регулятора воспаления и ремоделирования дыхательных путей в развитии аллергического воспаления, способствуя более тяжелым клиническим проявлениям астмы с частыми приступами.



Таблица 1
Распределение генотипов полиморфного варианта rs652438 гена MMP12 в исследуемых группах
Table 1
Distribution of genotypes of the rs652438 polymorphic variant of the MMP12 gene in the study groups

Аллели и генотипы	ХБ (n=98)		Контрольная группа (n=100)	
	n	%	n	%
A	98	83,3	100	55,5
G	33	16,8	89	44,5
AA	66	67,3	40	40
AG	31	31,6	31	31
GG	1	1,0	29	29
Всего	98	100	100	100

Таким образом, неблагоприятный аллель и генотип полиморфизма rs652438 гена MMP12 не является маркером, предрасполагающим к развитию ХБ в Узбекистане.

Далее необходимо рассмотреть ген IRF-4 (Interferon regulatory factor 4), регуляторный фактор интерферона 4, также известный как MUM1-белок, который у человека кодируется геном IRF4, расположенным на 6p25-p23.

На рис. 3 показана локализация гена IRF-4 rs9378805.

При сравнении частот генотипов и аллелей полиморфизма rs9378805 гена IRF-4 в исследованных группах пациентов и контроле нами были получены следующие результаты (табл. 2). Частота распределения аллелей А и С гена IRF-4 в ХБ составила 43,3 и 56,7%, в контрольной группе – 35,0 и 65,4% (табл. 2).

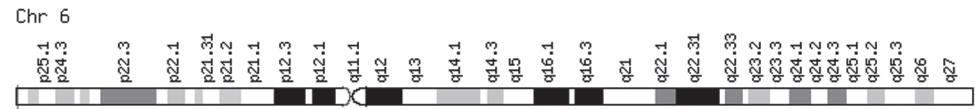


Рис. 3. Локализация гена IRF-4 rs9378805
Fig. 3. Localisation of the IRF-4 gene rs9378805

Таблица 2
Распределение генотипов полиморфного варианта rs9378805 гена IRF в исследуемых группах
Table 2
Distribution of genotypes for the rs9378805 polymorphic variant of the IRF gene in the study groups

Аллели и генотипы	ХБ, n=98		Контрольная группа, n=100	
	n	%	n	%
A	52	43,3	42	35,0
C	68	56,7	78	65,0
AA	16	26,7	21	35,0
AC	20	33,3	0	0
CC	24	40,0	39	65,0
Всего	98	100	100	100

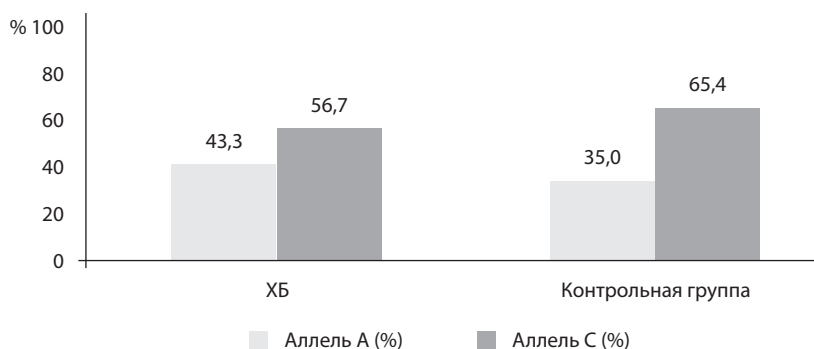


Рис. 4. Частоты аллелей полиморфного варианта rs9378805 гена IRF-4 в обследованных группах
Fig. 4. Allele frequencies of polymorphic rs9378805 of the IRF-4 gene in the studied groups

В обеих исследованных группах генотип А/А оказался преобладающим, его частота колебалась от 26,7% в группе с ХБ до 35,0% в группе контроля. Функционально неблагоприятный гетерозиготный генотип А/С преобладает в группе с ХБ по сравнению с контролем: 33,0 и 0,0% соответственно. Частота гомозиготного генотипа С/С в изучаемых группах значительно различается: 65,0% – в контроле и 40% – в основной группе (рис. 4). Сравнительный анализ распределения частот генотипов полиморфизма rs9378805 гена IRF-4 выявил статистически незначимую ассоциацию ($p > 0,05$) аллеля А по доминантной модели наследования (суммарно генотипы АА+АС) в группе пациентов с ХБ по сравнению с соответствующим показателем в группе контроля.

Таким образом, полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют о том, что генетический вариант гена IRF-4 частично ассоциируется с формированием ХБ.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Раннее выявление генетических маркеров предрасположенности к различным заболеваниям позволяет прогнозировать течение болезни, а также провести адекватную профилактику заболевания.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Shcherbakova N.Y. Chronic deforming endobronchitis as a variant of chronic pneumonia in children (PhD Thesis). 2009. 116 p. (in Russian)
2. Ashour M. Al-Kattan K., Rafay M.A., et al. Current surgical therapy for bronchiectasis. *World J Surg.* 1999 Nov;23(11):1096–1104.
3. Asilsoy Suna, Erhan Bayram, Hasan Agin, et al. Evaluation of chronic cough in children. *Chest.* 2008;134(issue 6):1120–1128.
4. Bakirtas Arzu, Turkasipek. Which children with persistent cough should be regarded as persistent bacterial bronchitis? *Thorax.* 2007;62(issue 10):921.
5. Cartier Y., Kavanagh P.V., et al. Bronchoectasis: accuracy of high-resolution CT in the differentiation specific diseases. *AJR Am J. Rentgenol.* 1999;173(1):47–52.
6. Demeo, Dawn L., Robert A. Sandhaus et al. Determinants of airflow obstruction in severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Thorax.* 2007;62(issue 9):806–813.
7. Ghosh R, Topinka J, Joad JP, Dostal M, Sram RJ, Hertz-Picciotto I. Air pollutants, genes and early childhood acute bronchitis. *Mutation Research.* 2013 Sep;749(1–2):80–86.
8. Hancox R.J., Poulton R., Greene J.M., et al. Systemic inflammation and lung function in young adults. *Thorax.* 2007;62(12):1064–1068.
9. Holloway J.W., Yang I.A., Holgate S.T. Genetics of pulmonary disease. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2012;(125):81–94.

10. Lagente O, Manoury B., Nenán S., et al. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Brazilian Journal of medical and biological research*. 2005;38(10):1521–1530.
11. Miravittles M., Anzueto A., Ewig S., et al. Characterisation of exacerbations of chronic bronchitis and COPD in Europe: the GIAN study. *Therap. Advanc. Respir. Dis.* 2009;3(6):267–277.
12. Siempos I.I., Dimopoulos G., Korbila L.P. Macrolides, quinolones and "amoxicillin/clavulanate for chronic bronchitis: a meta-analysis. *Eur. Resp. J.* 2007;29(6):1127–1137.
13. Siempos I.I., Michalopoulos A., Falagas M.E. Treatment of acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis. *Expert Opinion On Pharmacotherapy*. 2009;10(7):1173–1182.
14. Silverman E.K., Palmer L.J., Mosley D., et al. Genomewide Linkage analysis of quantitative spirometric phenotypes in severe early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of human genetics*. 2012;(70):1229–1239.
15. Silverman E.K., Palmer L.J. Case-control association studies for the genetics of complex respiratory diseases. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2000;22:645–648.
16. Silverman E.K., Vestbo J., Agustí A., Anderson W., Bakke P.S., Barnes K.C., et al. Opportunities and challenges in the genetics of COPD 2010: an International COPD Genetics Conference report. *COPD*. 2011;8(2):121–35.
17. Kudratova Z.E., Muhamadiyeva L.A. The Role of Cytokine Regulation in Obstructive Syndrome of Atypical Genesis in Children. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021:6279–6291.
18. Kudratova Z.E., Muhamadiyeva L.A. Bronchial obstruction syndrome in young children with respiratory infections of different etiology: features of clinical manifestations and immune response. *Problems of science*. 2021;1(60):60–62.
19. Kudratova Z. E., Muhamadiyeva L.A. Chlamydial Infections (Intracellular Infection) in the Development of Bronchitis. *TJE*. 2021:2249–9822.
20. Korytina G.F. *Molecular genetic analysis of hereditary predisposition to chronic respiratory diseases* (PhD Thesis). 2012. 49 p.