

УДК [616.24-057:575.1]:622.2-057.2

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА *MMP-2* У РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ОБСТРУКТИВНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ У ШАХТАРІВ

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

ДУ «Інститут медицини праці НАМН України», Київ

Вступ. В останні роки відмічається збільшення випадків хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) серед працівників вугільної, гірничодобувної та металургійної галузей промисловості. Сьогодні пріоритетним завданням залишається пошук більш ефективних методів профілактики, які б дали змогу попередити розвиток захворювання. У цій площині визначення генетичних маркерів схильності до ХОЗЛ відкриває нові можливості для запобігання розвитку патології в групах ризику.

Мета дослідження. Удосконалення ранньої діагностики та первинної профілактики захворювання шляхом визначення ролі поліморфізму $C^{-1306} \rightarrow T$ гена матричної металопротеїнази-2 (*MMP-2*) у розвитку ХОЗЛ.

Матеріали та методи дослідження. За допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з флуоресцентно-гібридизаційною детекцією специфічних продуктів ампліфікації в режимі реального часу визначали поліморфізм $C^{-1306} \rightarrow T$ гена *MMP-2*. До дослідної групи ввійшли 72 шахтаря, хворих на ХОЗЛ, до контрольної – 79 шахтарів без патології органів дихання.

Результати. Частота розподілу генотипів за поліморфізмом $C^{-1306} \rightarrow T$ гена *MMP-2* була близькою до європеоїдів. За допомогою методу відношення шансів (ВШ) встановлений зв'язок між домінантним С-алелем (ВШ = 0,58; 95 % довірчий інтервал: 0,33–1,04; $p < 0,05$; $\chi^2 = 3,78$) і генотипом СС (ВШ = 0,55; 95 % ДІ: 0,27–1,12; $p = 0,07$) гена *MMP-2* з резистентністю до розвитку ХОЗЛ у шахтарів. Наявність у геномі мінорного Т-алеля (ВШ = 1,71; 95 % ДІ: 0,96–3,05; $p < 0,05$; $\chi^2 = 3,78$) даного гена може зумовлювати схильність до ризику розвитку ХОЗЛ у шахтарів.

Висновки. Отримані результати досліджень відкривають нові можливості для удосконалення заходів первинної профілактики ХОЗЛ з урахуванням визначення генетичної резистентності та схильності до даного захворювання.

Ключові слова: хронічне обструктивне захворювання легень, генетичні маркери, *MMP-2*, шахтарі

Вступ

Хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) має тенденцію до швидкого поширення серед професійних захворювань у вугільній, гірничодобувній та металургійній галузях промисловості, які характеризуються несприятливими умовами праці, що комплексно впливають на організм працюючого [1, 2]. Сьогодні ХОЗЛ розглядають як одне з найпоширеніших і обтяжливих захворювань, що призводить до непрацездатності, інвалідності, смертності та значних соціально-економічних витрат як в Україні, так і у світі [1, 3, 4].

Сьогодні пріоритетним завданням залишається пошук більш ефективних методів профілактики, які б дали змогу попередити розвиток захворювання. У цій площині визначення генетичних маркерів схильності до ХОЗЛ відкриває нові можливості для запобігання розвитку патології в групах ризику. Перспективним напрямом дослідження є визначення ролі генетичних помолірфізмів генів, що кодують основні патологічні ланки захворювання. Відомо, що порушення системи протеоліз-антипротеоліз є однією

з причин хронізації бронхолегеневої патології. Одним із кандидатів на роль біомаркера спадкової схильності та резистентності до ХОЗЛ є ген *MMP-2*, що кодує матриксну металопротеїназу-2. Відомо, що даний фермент має протеолітичну активність щодо колагену IV типу і постійно експресується більшістю клітин сполучної тканини, у тому числі й у легенях [5]. *Мета дослідження* – удосконалення ранньої діагностики та первинної профілактики захворювання шляхом визначення ролі поліморфізму $C^{-1306} \rightarrow T$ гена *MMP-2* у розвитку ХОЗЛ.

Матеріали та методи дослідження

Обстежено 151 шахтаря основних підземних професій на вугільних шахтах Донецької, Луганської, Львівської та Волинської областей України. Дослідну групу склали 72 гірника з діагнозом ХОЗЛ професійної етіології, віком ($53,7 \pm 5,8$) років, середній стаж роботи в підземних умовах – ($21,8 \pm 4,8$) року. Діагноз ХОЗЛ встановлювали на основі клініко-функціонального обстеження фахівцями клініки професійних захворювань ДУ «Інститут медицини

праці НАМН України». До контрольної групи включено 79 шахтарів, які не мали патології бронхолегеневої системи, середній вік яких – $(48,2 \pm 5,6)$ років, підземний стаж – $(20,2 \pm 4,5)$ року. ДНК для молекулярно-генетичних досліджень виділяли з лейкоцитів периферичної крові стандартним методом за допомогою комерційної тест-системи «ДНК-сорб-В» («АмпліСенс», РФ).

Визначення алельного поліморфізму гена *MMP-2* ($C^{1306} \rightarrow T$, *rs243865*), що кодує матриксну металопротеїназу-2, проводили із застосуванням TaqMan® SNP Assay C_3225943_10 і 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Програма ампліфікації була схожою для даних генів і складалася із 50 циклів (денатурація – 92°C , 15 с, гібридизація та елонгація – 60°C , 1 хв), після чого проводили аналіз дискримінації алелів.

При статистичному аналізі отриманих результатів використовували стандартний метод хі-квадрату (χ^2) та відношення шансів (ВШ). Відповідність розподілу генотипів оцінювали згідно з законом Харді-Вайнберга. Визначення достовірності відмінностей у розподілі генотипів проводили за допомогою статистичної програми Statistica 6.0.

Результати дослідження та їх обговорення

Для визначення ролі гена *MMP-2* у патогенезі ХОЗЛ у шахтарів були вивчені частоти розповсюдження його поліморфних варіантів у групі хворих та в контрольній. Серед шахтарів дослідної групи мінорний алель *MMP-2*T* був визначений у 27,8 % осіб, у контрольній групі – у 18,4 % (табл. 1). Слід

Таблиця 1

Розповсюдженість алелів С і Т поліморфізму $C^{1306} \rightarrow T$ гена *MMP-2* у популяції шахтарів, %

Група обстежених	С	Т
Дослідна (n = 144)	72,2 (n = 104)*	27,8 (n = 40)*
Контроль (n = 158)	81,6 (n = 129)	18,4 (n = 29)
ВШ, 95 % ДІ	0,58; 0,33–1,04	1,71; 0,96–3,05

Примітка. *Статистична вірогідність у розподілі алелів порівняно з контрольною групою, $P < 0,05$.

відзначити, що отримані значення частот були близькими до популяційних: розповсюдженість алеля *MMP-2*С* у європеїдів становить – 75,7 %, алеля *MMP-2*T* – 24,3 % [6].

Встановлено статистично достовірну різницю в частоті алелів між групами хворих та контрольною групою ($p < 0,05$). Було визначено асоціацію між мінорним алелем *MMP-2*T* і підвищеним ризиком розвитку ХОЗЛ у дослідній групі відносно контролю (ВШ = 1,71; 95 % СІ: 0,96–3,05), що свідчить про підвищений ризик розвитку ХОЗЛ у носіїв алеля *MMP-2*T*.

Алель *MMP-2*С* був виявлений у 72,2 % хворих дослідної групи і в 81,6 % контрольної. Встановлено протективну роль алеля *MMP-2*С* для його носіїв відносно ризику розвитку ХОЗЛ (ВШ = 0,58; 95 % ДІ: 0,33–1,04).

Розподіл генотипів *MMP-2*CC*, *MMP-2*CT*, *MMP-2*TT* за геном *MMP-2* серед хворих шахтарів був наступним: гомозиготи *MMP-2*CC* – 38 (52,8 %), гетерозиготи *MMP-2*CT* – 28 (38,9 %), гомозиготи *MMP-2*TT* – 6 (8,3 %) (рисунок). У групі контролю виявлено 53 (67,1 %) домінант-

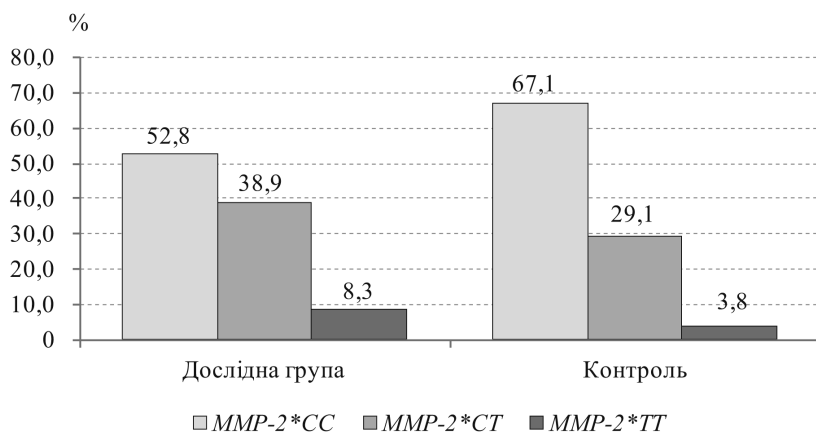


Рисунок. Розподіл частот генотипів гена *MMP-2* у популяції шахтарів

Таблиця 2

Розповсюдженість генотипів поліморфізму $C^{-1306} \rightarrow T$ гена *MMP-2* у популяції шахтарів, %

Група обстежених	СС	СТ	ТТ	P**
Дослідна (n = 72)	52,8 (n = 38)	38,9 (n = 28)	8,3 (n = 6)	P = 0,1
Контрольна (n = 79)	67,1 (n = 53)	29,1 (n = 23)	3,8 (n = 3)	
P*	P = 0,07	P = 0,2	P = 0,2	
ВШ, 95 % ДІ	0,55; 0,27–1,12	1,55; 0,74–3,23	2,30; 0,49–12,17	

Примітка. *Статистична вірогідність у розподілі окремих генотипів порівняно з контрольною групою; **статистична вірогідність у розподілі генотипів порівняно з контрольною групою.

них гомозигот *MMP-2*CC*, 23 (29,1 %) гетерозигот *MMP-2*CT*, 3 (3,8 %) мінорних гомозигот *MMP-2*TT* (рисунок, 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 ($p > 0,05$). Статистично достовірної різниці частот генотипів гена *MMP-2* між шахтарями дослідної групи та контролю не виявлено.

При аналізі співвідношення шансів була визначена асоціація між генотипами *MMP-2*CT* (ВШ = 1,55; 95 % ДІ: 0,74–3,23) і *MMP-2*TT* (ВШ = 2,30; 95 % ДІ: 0,49–12,17) та підвищеним ризиком розвитку ХОЗЛ у дослідній групі. Також було показано протективне значення домінантного генотипу *MMP-2*CC* (ВШ = 0,55; 95 % ДІ: 0,27–1,12) відносно розвитку ХОЗЛ.

Відомо, що в позиції -1306 промоторної області гена *MMP-2* описана однонуклеотидна заміна С на Т (*rs243865*). Така заміна призводить до руйнування транскрипційного фактора Sp1-типу, що відповідно знижує активність гена [5]. Таким чином, у носів патологічної алелі Т відбувається зниження експресії протеолітичного ферменту (*MMP-2*, або желатиназа А), який відіграє важливу роль при патологічних станах у легенях. Так, наприклад, підвищений

рівень даного ферменту спостерігали в осіб з емфіземою легень [7]. Також високий рівень желатинази А виявляли в бронхоальвеолярному лаважі мишей, яких піддавали тривалій дії сигаретного диму [8]. Очевидно, що в носіїв нормального генотипу *MMP-2*CC* відбувається коректна активація гена, що дає змогу вважати даний генотип протективним.

Висновки

1. У результаті проведеного дослідження для носіїв домінантного алеля *MMP-2*C* (ВШ = 0,58; 95 % ДІ: 0,33–1,04; $p < 0,05$; $\chi^2 = 3,78$) та генотипу *MMP-2*CC* (ВШ = 0,55; 95 % ДІ: 0,27–1,12; $p = 0,07$) було визначено протективну роль відносно ризику розвитку ХОЗЛ. Отже, дані поліморфні варіанти гена *MMP-2* можуть бути включені до переліку біомаркерів резистентності ризику розвитку ХОЗЛ.
2. Визначено асоціацію між генотипами *MMP-2*CT* (ВШ = 1,55; 95 % ДІ: 0,74–3,23) і *MMP-2*TT* (ВШ = 2,30; 95 % ДІ: 0,49–12,17) та підвищеним ризиком розвитку ХОЗЛ у дослідній групі.
3. Отримані результати досліджень відкривають нові можливості для вдосконалення заходів первинної профілактики ХОЗЛ з урахуванням визначення генетичної резистентності та схильності до даного захворювання.

Література

1. Динаміка професійної захворюваності в Україні та досвід Інституту медицини праці НАМН України / Ю. І. Кундієв, А. М. Нагорна, М. П. Соколова, І. Г. Кононова // Укр. журн. з проблем медицини праці. – 2013. – № 4 (37). – С. 11–22.

2. Results from a Ukrainian-US collaborative study: prevalence and predictors of respiratory symptoms

among Ukrainian coal miners / J. M. Graber, R. A. Cohen, A. Basanets [et al.] // Am J. Ind Med. – 2012 – V. 55 (12). – P. 1099–109.

3. Burden of illness for an employed population with chronic obstructive pulmonary disease / K. Nair, V. Ghushchyan, J. Van Den Bos [et al.] // Popul Health Manag. – 2012 – V. 15 (5). – P. 267–75.

4. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy or the Diagnosis, Management

and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease. NHLBI/ WHO workshop report. Last update 2011. Электронный ресурс. — Режим доступа: <http://www.goldcopd.com>.

5. Price S. J. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation / S. J. Price, D. R. Greaves, H. Watkins // J. Biol. Chem. — 2001. — V. 276. (10) — P. 7549–7558.

6. National Center for Biotechnology Information.

Электронный ресурс. — Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.

7. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema / K. Ohnishi, M. Takagi, Y. Kurokawa [et al.] // Lab. Invest. — 1998. — V. 78 — P. 1077–1087.

8. Seagrave J. Effects of cigarette smoke exposure and cessation on inflammatory cells and matrix metalloproteinase activity in mice / J. Seagrave, E. B. Barr, T. H. March // Exp. Lung Res. — 2004. — V. 30. — P. 1–15.

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

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *MMP-2* В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ У ШАХТЕРОВ

ГУ «Институт медицины труда НАМН Украины», г. Киев

Введение. В последние годы отмечается увеличение случаев хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) среди работников угольной, горнодобывающей и металлургической отраслей промышленности. На сегодня приоритетной задачей остается поиск более эффективных методов профилактики, которые позволили бы предупредить развитие заболевания. В этой ситуации определение генетических маркеров предрасположенности к ХОБЛ открывает новые возможности для предотвращения развития патологии в группах риска.

Цель исследования. Совершенствование ранней диагностики и первичной профилактики заболевания путем определения роли полиморфизма $C^{1306} \rightarrow T$ гена матричной металлопротеиназы-2 (*MMP-2*) в развитии ХОБЛ.

Материалы и методы исследования. С помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной-гибридизационной детекцией специфических продуктов амплификации в режиме реального времени определяли полиморфизм $C^{1306} \rightarrow T$ гена *MMP-2*. Группу исследования составили 72 шахтера, больных ХОБЛ, контрольную — 79 шахтеров без патологии органов дыхания.

Результаты. Частота распределения генотипов за полиморфизмом $C^{1306} \rightarrow T$ гена *MMP-2* была близкой к кавказской популяции. С помощью метода отношения шансов (ОШ) установлена связь между доминантным С-аллелем (ОШ = 0,58; 95 % доверительный интервал: 0,33–1,04; $p < 0,05$; $\chi^2 = 3,78$) и генотипом СС (ОШ = 0,55; 95% ДИ: 0,27–1,12; $p = 0,07$) гена *MMP-2* с резистентностью к развитию ХОБЛ у шахтеров. Наличие в геноме минорного Т-аллеля (ОШ = 1,71; 95% ДИ: 0,96–3,05; $p < 0,05$; $\chi^2 = 3,19$) данного гена может обуславливать генетическую предрасположенность к риску развития ХОБЛ у шахтеров.

Выводы. Полученные результаты исследований открывают новые возможности для совершенствования мер первичной профилактики ХОБЛ с учетом определения генетической резистентности и предрасположенности к данному заболеванию.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, генетические маркеры, *MMP-2*, шахтеры

Dolinchuk L.V., Basanets A.V., Andrushchenko T. A.

ROLE OF *MMP-2* GENE POLYMORPHISM IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE IN MINERS

SI «Institute for Occupational Health of NAMS of Ukraine», Kyiv

Introduction. In recent years an increased incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is observed in workers of coal, metallurgical and mining industries. Nowadays, a priority task is the search for more effective methods of prevention, which would be able to prevent the development of the disease. With this in view, the determination of susceptibility of genetic markers to COPD allows to open new possibilities for prevention of this disease in risk groups.

Objective of research. To define a role of *MMP-2* gene polymorphism ($C^{1306} \rightarrow T$) in the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in order to improve early detection and primary prevention of the disease.

Materials and methods. A real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect a polymorphism $C^{1306} \rightarrow T$ of the matrix metalloproteinase-2 (*MMP-2*) gene. The study covered 72 miners with COPD, and 79 miners without the respiratory system pathology.

Results. The frequency of prevalence of *MMP-2* gene polymorphism $C^{1306} \rightarrow T$ is similar to Caucasian population. This study made it possible to establish the association between the major C-allele (OR = 0,58; 95 % CI: 0,33–1,04; $p < 0,05$; $\chi^2 = 3,78$)

and CC genotype (OR = 0,55; 95 % CI: 0,27–1,12; $p = 0,07$) of *MMP-2* gene with the resistance to development of COPD in miners. The presence in the genome minor T allele (OR = 1,71; 95 % CI: 0,96–3,05; $p < 0,05$; $\chi^2 = 3,78$) allows to determine a predisposition to risk of COPD in miners.

Conclusion. The results of the research make it possible to open new perspectives for improving measures of primary prevention of COPD, based on determining the genetic predisposition to COPD development.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, genetic markers, *MMP-2*, miners

References

1. Kundiev, Y. I., Nagornaya, A. M., Sokolova, M. P., Kononova, I. G. 2013, «Dynamics of occupational morbidity in Ukraine and experience of the Institute for Occupational Health of NAMS of Ukraine», Ukr. J. Occup. Health, no. 4 (37), pp. 11–22 (in Ukrainian).
2. Graber, J. M. et. al. 2012, «Results from a Ukrainian-US collaborative study: prevalence and predictors of respiratory symptoms among Ukrainian coal miners», Am J. Ind Med., no. 55 (12), pp. 1099–109.
3. Nair, K., Ghushchyan, V., Van Den Bos, J. et. al. 2012, «Burden of illness for an employed population with chronic obstructive pulmonary disease», Popul Health Manag., no.15 (5), pp. 267–75.
4. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy or the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease. NHLBI/ WHO workshop report. Last update 2011. Available in: <http://www.goldcopd.com>.
5. Price, S. J., Greaves, D. R., Watkins, H. 2001, «Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation», J. Biol. Chem., no. 276. (10), pp. 7549–7558.
6. National Center for Biotechnology Information Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.
7. Ohnishi, K., Takagi, M., Kurokawa, Y., et al. 1998, «Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema», Lab. Invest., no. 78, pp. 1077–1087.
8. Seagrave, J., Barr, E. B., March, T. H. 2004, «Effects of cigarette smoke exposure and cessation of inflammatory cells and matrix metalloproteinase activity in mice», Exp. Lung Res., no. 30, pp. 1–15.

Надійшла: 24.12.2014 р.

Контактна особа: Долінчук Людмила Василівна, аспірант, відділ професійної патології, ДУ «Інститут медицини праці НАМН України», буд. 75, вул. Саксаганського, м. Київ, 01033. Тел.: + 38 0 44 284 34 37. Електронна пошта: DolinchukL@gmail.com