

*И.И.Черкашина<sup>1</sup>, С.Ю.Никулина<sup>1</sup>, Н.И.Логвиненко<sup>2</sup>, В.А.Шульман<sup>1</sup>, В.А.Шестовицкий<sup>1</sup>, М.И.Воевода<sup>3</sup>, В.Н.Максимов<sup>3</sup>, А.А.Чернова<sup>1</sup>*

## Анализ полиморфизма гена хемокинового рецептора CCR2 у больных бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких

1 – ГОУ ВПО "Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого", кафедра внутренних болезней № 1: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1;

2 – ГОУ ВПО "Новосибирский государственный медицинский университет", кафедра терапии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки врачей: 630091, Новосибирск, Красный пр-т, 52;

3 – У РАМН "НИИ терапии СО РАМН": 630089, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175 / 1

*I.I.Cherkashina, S.Yu.Nikulina, N.I.Logvinenko, V.A.Shulman, V.A.Shestovitsky, M.I.Voevoda, V.N.Maximov, A.A.Chernova*

## Analysis of CCR2 chemokine receptor gene polymorphism in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease

### Summary

The aim of this study was to investigate prevalence of genotypes and CCR2 gene alleles in patients with bronchial asthma (BA) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We examined 90 BA patients, 72 COPD patients and healthy subjects as controls using standard diagnostic tools for these diseases and molecular analysis. CCR2 chemokine receptor gene polymorphism was investigated in patients with BA and COPD in comparison with healthy subjects. There was not any significant difference in prevalence of genotypes and CCR2 gene alleles in patients with BA or COPD, or in controls. The results have shown an association between rare allele 64I in the CCR2 gene and COPD and a protective role for homozygous genotype 64V/64V of this gene in COPD development. The comparative analysis allowed extension our knowledge about some genetic features of these diseases. The CCR2 chemokine receptor gene polymorphism was associated with COPD but not with BA.

**Key words:** gene polymorphism, CCR2 chemokine receptor gene, bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease.

### Резюме

Целью исследования было изучение частоты встречаемости генотипов и аллелей гена CCR2 среди больных бронхиальной астмой (БА) и хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). Проведено обследование 90 пациентов с БА и 72 – с ХОБЛ. В контрольную группу были включены практически здоровые люди. Использовался общепринятый комплекс обследования лиц, страдающих БА и ХОБЛ, молекулярно-генетические методы исследования, методы статистической обработки данных. Был изучен полиморфизм гена хемокинового рецептора CCR2 у больных БА и ХОБЛ в сравнении с группой контроля. Статистически достоверных различий в распределении генотипов и аллелей гена CCR2 между больными БА и лицами контрольной группы выявлено не было. Наряду с этим получены данные, свидетельствующие об ассоциации между наличием редкого аллеля 64I в гене CCR2 и ХОБЛ, а также о том, что носительство гомозиготного генотипа 64V/64V данного гена является протективным фактором в отношении развития ХОБЛ. На примере выборки сравнительный анализ участия гена CCR2 в развитии БА и ХОБЛ позволил раскрыть некоторые генетические аспекты этих заболеваний. В данном исследовании полиморфизм гена хемокинового рецептора CCR2 был связан с развитием ХОБЛ и не связан с развитием БА.

**Ключевые слова:** полиморфизм генов, ген хемокинового рецептора CCR2, бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких.

Бронхиальная астма (БА) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) по-прежнему остаются актуальными проблемами медицины и продолжают привлекать внимание многих исследователей. В настоящее время мало информативных диагностических маркеров, надежно дифференцирующих БА и ХОБЛ, поэтому их поиск продолжается [1]. Перспективными являются исследования, посвященные изучению генетических основ БА и ХОБЛ [2–5]. Среди большого числа генов, которые могут принимать участие в формировании предрасположенности к развитию БА и ХОБЛ, внимание привлекает ген хемокиновых рецепторов CCR2. Белок, кодируемый геном хемокинового рецептора CCR2,

принадлежит к семейству трансмембранных G-белок-сцепленных рецепторов. Ген рецептора CCR2 картирован на хромосоме 3p21.3 в составе кластера с геном хемокинового рецептора CCR5, занимает около 8 тыс. пар нуклеотидов [6]. В клетках синтезируются 2 изоформы рецептора – CCR2A и CCR2B. Обе изоформы рецептора связываются с моноцит-хемотаксическими белками (MCP) 1, 2, 3 и 4. CCR2 экспрессируется в моноцитах, макрофагах и Т-лимфоцитах и регулирует привлечение воспалительных клеток и их функцию на участках воспалительного ответа [7, 8]. Для рецептора CCR2 наиболее распространенным вариантом является нуклеотидная замена G на A в позиции 190, что приводит к замене

аминокислоты валина на изолейцин в 64-й позиции (CCR2-64I) в первичной последовательности белка-рецептора.

Среди европеоидов аллельная частота CCR2-64I составляет 9,8 %, среди афроамериканцев – 17,2 %, монголоидов – 25 % [9]. В группе этнических шорцев Таштагола частота нуклеотидной замены в гене CCR2 встречается в 14,29 %, у якутов – в 40,1 %, а у русских – в 15,2 % случаев [6].

Исследования последних лет выявили ассоциацию этой мутации с атеросклерозом коронарных сосудов, сахарным диабетом, инфарктом миокарда, продолжительностью жизни [10], неспецифическими заболеваниями легких [6] и саркоидозом [7]. Наличие в генотипе аллеля 64I на 2–4 года замедляет развитие симптомов СПИДа [8].

В литературе имеются лишь единичные указания на вовлечение CCR2 и их рецепторов в развитие иммунологической аллергической астмы, а данные о полиморфизме V64I гена хемокинового рецептора CCR2 у больных ХОБЛ полностью отсутствуют.

Целью настоящей работы было изучение частоты распределения генотипов и аллелей полиморфизма гена хемокинового рецептора CCR2 у больных БА и ХОБЛ.

## Материалы и методы

Исследование было проведено на материале 90 больных БА (19 (21,1 %) мужчин и 71 (78,9 %) женщин) и 72 больных ХОБЛ. Медиана возраста больных БА составила 51,0 год (43,0; 60,0): у мужчин – 50,5 лет (25,3; 65,0), у женщин – 51,0 год (43,5; 57,0). Среди больных ХОБЛ мужчин было 94,79 %. Медиана возраста больных ХОБЛ составила 68,5 лет (59,8; 74,0).

Все обследованные являлись европеоидами, постоянно проживающими в г. Красноярске. Набор больных БА и ХОБЛ производился во время их лечения в пульмонологическом отделении МУЗ "ГКБ № 20". Диагноз БА устанавливался в соответствии с Глобальной стратегией лечения и профилактики БА (GINA, 2002 и 2007) [12, 13] на основании жалоб на приступы затрудненного дыхания или приступообразный кашель, купирующиеся ингаляцией  $\beta_2$ -агонистов, наличия обратимой бронхиальной обструкции, подтвержденной объективными методами обследования (суточный разброс пиковой скорости выдоха (ПСВ) > 20 %, прирост объема форсированного выдоха за 1-ю с (ОФВ<sub>1</sub>) > 12 %). Степень тяжести и обострения БА определяли по общепринятым критериям (GINA, 2002 и 2007) [12, 13].

У наблюдавшихся больных были диагностированы следующие формы БА (в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра – МКБ-10): аллергическая – у 74 (82,2 %), неаллергическая – у 16 (17,8 %). Степень тяжести БА у 40 (44,4 %) больных была легкой, у 34 (37,8 %) – среднетяжелой и у 16 (17,8 %) – тяжелой. Среди обследованных пациентов легкое обострением БА отмечено у 12 (13,3 %), среднетяжелое – у 49 (54,4 %), тяжелое – у 9 (10,0 %). У 20 (22,2 %) пациен-

тов обострения не было. Средний стаж БА составил  $12,3 \pm 6,1$  года.

Диагноз ХОБЛ устанавливался согласно рекомендациям GOLD (2007) [14], на основании жалоб на хронический кашель, выделение мокроты и нарастающую по своей интенсивности одышку, наличия факторов риска в анамнезе и результатов исследования функции внешнего дыхания (ФВД): отношения ОФВ<sub>1</sub> к форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) < 70 %. ХОБЛ I стадии была диагностирована у 2 (2,78 %) пациентов, II стадии – у 23 (31,94 %), III стадии – у 38 (52,77 %) и IV стадии – у 9 (12,5 %). Длительность заболевания составила  $13,66 \pm 0,84$  года.

Всем пациентам с БА и ХОБЛ было проведено клиничко-инструментальное исследование по следующей программе: клинический осмотр, оценка параметров ФВД посредством компьютерной спирометрии и молекулярно-генетические исследования. При оценке полиморфизма гена хемокинового рецептора CCR2 у больных БА и ХОБЛ в качестве контроля использовалась популяционная выборка здоровых лиц – жителей г. Новосибирска ( $n = 464$ ); медиана возраста – 35,0 лет (29,0; 45,0). Молекулярно-генетические исследования проведены на базе У РАМН "НИИ терапии СО РАМН" (г. Новосибирск). Для проведения молекулярно-генетического анализа были взяты образцы венозной крови (5–10 мл). Выделение ДНК осуществлялось стандартным методом с фенол-хлороформной экстракцией. Генотипирование проводилось с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) по опубликованной методике [10].

Статистическая обработка материала осуществлялась с использованием пакета прикладных программ SPSS-13. Различия в распределении частот аллелей и генотипов гена CCR2 между группами оценивались посредством критерия  $\chi^2$  и точного 2-стороннего критерия Фишера. Относительный риск (ОР) заболевания по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как отношение шансов (ОШ). Подсчитывали ОШ для оценки ассоциации между определенными генотипами и риском развития заболевания по стандартной формуле:

$$OP = a/b \times d/c,$$

где a, b – количество больных, имеющих и не имеющих мутантный генотип; d, c – количество человек в контрольной группе, имеющих и не имеющих мутантный генотип. ОР указан с 95%-ным доверительным интервалом (ДИ). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Результаты анализа полиморфизма гена CCR2 в кодирующей области среди больных БА и в контрольной группе представлены в табл. 1. Сравнительный анализ частот генотипов гена CCR2 не выявил статистически достоверных различий между выборками больных БА и контрольной группой (ОШ = 0,999;

95%-ный ДИ – 0,575–1,738;  $p = 1,0$ ). При изучении данных по носительству аллелей V и I достоверных различий между больными БА и лицами контрольной группы также выявлено не было (ОШ = 0,949; 95%-ный ДИ – 0,572–1,575;  $p = 0,899$ ).

При сравнении распределения частот генотипов полиморфизма V64I гена CCR2 среди больных ХОБЛ и контрольной выборки получены различия (табл. 2).

При изучении V64I полиморфизма гена хемокинового рецептора CCR2 у больных ХОБЛ, было установлено достоверное повышение частоты встречаемости носителей аллеля 64I в группе больных ХОБЛ по сравнению с контрольной группой ( $18,7 \pm 3,2 \%$  и  $11,6 \pm 1,0 \%$  соответственно;  $p = 0,021$ ) (табл. 2).

ОШ обнаружения носителя аллеля 64I в группе больных ХОБЛ в 1,8 раза было выше, чем в контрольной группе (95%-ный ДИ – 1,102–2,787). Кроме того, выявлено преобладание числа носителей гомозиготного генотипа 64V/64V гена CCR2 в контрольной группе по сравнению с больными ХОБЛ (78,9 % и 66,7 % соответственно; ОШ = 0,54; 95%-ный ДИ – 0,31–0,92;  $p = 0,033$ ) (табл. 2).

Была проанализирована частота генотипов и аллелей гена CCR2 у больных с разными стадиями ХОБЛ (табл. 3).

У больных ХОБЛ III стадии отмечено достоверное повышение частоты встречаемости носителей гетерозиготного генотипа (64V/I) по сравнению с контрольной группой ( $34,2 \pm 7,7 \%$  и  $19,0 \pm 1,8 \%$ ;  $p = 0,03$ ).

Таблица 1

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма гена CCR2 у больных БА и в контрольной группе

Генотипы	Контроль (n = 464)		Больные БА (n = 90)	
	Абс.	%	Абс.	%
64V/V	366	78,9 ± 1,9	71	78,9 ± 4,4
64V/I	88	19,0 ± 1,8	18	20,0 ± 4,2
64I/I	10	2,1 ± 1,4	1	1,1 ± 1,0
<i>p</i>	0,796			
Аллели: V	820	88,4 ± 1,1	160	88,9 ± 2,4
I	108	11,6 ± 1,1	20	11,1 ± 2,4
<i>p</i> *	0,899			
ОШ	0,949			
95%-ный ДИ	0,572–1,575			
Генотип 64V/64V	366	78,9 ± 1,9	71	78,9 ± 4,3
Генотипы V/I+I/I	98	21,1 ± 1,9	19	21,1 ± 4,3
<i>p</i> *	1,000			
ОШ	0,999			
95%-ный ДИ	0,575–1,738			

Примечание: *p* – уровень значимости при сравнении распределения генотипов с показателями группы контроля; *p*\* – уровень значимости, достигнутый точным критерием Фишера.

Таблица 2

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма гена CCR2 у больных ХОБЛ и в контрольной группе

Генотипы	Контроль (n = 464)		Больные ХОБЛ (n = 72)	
	Абс.	%	Абс.	%
64V/V	366	78,9 ± 1,9	48	66,7 ± 5,6
64V/I	88	19,0 ± 1,8	21	29,2 ± 5,3
64I/I	10	2,1 ± 1,4	3	4,2 ± 2,3
<i>p</i>	0,066			
Аллели: V	820	88,4 ± 1,1	117	81,3 ± 3,2
I	108	11,6 ± 1,1	27	18,7 ± 3,2
<i>p</i> *	0,021**			
ОШ	1,752			
95%-ный ДИ	1,102–2,787			
Генотип 64V/V	366	78,9 ± 1,9	48	66,7 ± 5,5
Генотипы 64V/I+64I/I	98	21,1 ± 1,9	24	33,3 ± 5,5
<i>p</i> *	0,033**			
ОШ	1,867			
95%-ный ДИ	1,09–3,199			

Примечание: *p* – уровень значимости при сравнении распределения генотипов с показателями группы контроля; *p*\* – уровень значимости, достигнутый точным критерием Фишера; \*\* – уровень значимости, достигнутый при сравнении частоты генотипов и аллелей с показателями группы контроля.

Таблица 3  
Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма гена CCR2 у больных с разными стадиями ХОБЛ и в контрольной группе

Генотипы	Контроль, (n = 464)		ХОБЛ II стадии, (n = 23)		ХОБЛ III стадии (n = 38)		ХОБЛ IV стадии (n = 9)	
	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.
64V/V	78,9 ± 1,9	366	78,3 ± 8,6	18	60,5 ± 7,9	23	55,6 ± 6,6	5
64V/I	19,0 ± 1,8	88	17,4 ± 7,9	4	34,2 ± 7,7	13	44,4 ± 6,6	4
64I/I	2,2 ± 1,4	10	4,3 ± 4,5	1	5,3 ± 3,6	2	–	–
<i>p</i>			1,0		0,030**		0,153	
Аллели: V	88,4 ± 1,1	820	87,0 ± 5,0	40	77,6 ± 4,8	59	77,8 ± 9,8	14
I	11,6 ± 1,1	108	13,0 ± 5,0	6	22,4 ± 4,8	17	22,2 ± 9,8	4
<i>p</i> *			0,813		0,011**		0,256	
ОШ			0,878		0,457		0,461	
95%-ный ДИ			0,364–2,119		0,257–0,813		0,149–1,426	
Генотип 64V/V			78,3 ± 8,6	18	60,5 ± 7,9	23	55,6 ± 6,6	5
Генотипы V/I+I/I			21,7 ± 8,6	5	39,5 ± 7,9	15	44,4 ± 6,6	4
<i>p</i> *			1,0		0,014**		0,335	
ОШ			0,964		0,411		0,088–1,270	
95%-ный ДИ			0,349–2,661		0,206–0,817		0,160–4,042	

Примечание: *p* – уровень значимости при сравнении распределения генотипов с показателями группы контроля; *p*\* – уровень значимости, достигнутый точным критерием Фишера; \*\* – уровень значимости, достигнутый при сравнении частоты генотипов и аллелей с показателями группы контроля.

Показатель ОШ, указывающий на риск развития тяжелой формы ХОБЛ, составил 0,411 (95%-ный ДИ – 0,206–0,817). Частота вариантного аллеля I была достоверно выше у больных ХОБЛ III стадии по сравнению со здоровыми (22,4 ± 4,8 и 11,6 ± 1,1; ОШ = 0,457; 95%-ный ДИ – 0,257–0,813; *p* = 0,011).

Таким образом, при сравнении частот генотипов и аллелей полиморфизма V64I гена CCR2 в группе больных БА и популяционной контрольной группе различий не выявлено. Наряду с этим установлено достоверное повышение частоты встречаемости носителей аллеля 64I в группе больных ХОБЛ по сравнению с контрольной группой (18,7 ± 3,2 % и 11,6 ± 1,0 % соответственно; *p* = 0,021). ОШ обнаружить носителя аллеля 64I в группе больных ХОБЛ в 1,8 раза было выше, чем в контрольной группе (95%-ный ДИ – 1,102–2,787). Кроме того, выявлено преобладание числа носителей гомозиготного генотипа 64V/V гена CCR2 в контрольной группе по сравнению с больными ХОБЛ (78,9 % и 66,7 % соответственно; ОШ = 0,54; 95%-ный ДИ – 0,31–0,92; *p* = 0,033). Полученные данные свидетельствуют об ассоциации между наличием редкого аллеля 64I в гене CCR2 и ХОБЛ и о том, что носительство гомозиготного генотипа 64V/64V является протективным фактором в отношении развития ХОБЛ.

Таким образом, сравнительный анализ участия гена CCR2 в развитии БА и ХОБЛ на примере выборки пациентов позволил раскрыть некоторые генетические аспекты этих заболеваний. В проведенном исследовании полиморфизм гена хемокинового рецептора CCR2 был связан с развитием ХОБЛ и не связан с развитием БА.

## Литература

1. Шмелев Е.И. Различия в диагностике и лечении бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких. *Consilium Medicum* 2002; 9: 492–497.

2. Пузырев В.П. (ред.). Наследственность и болезни легких: Учеб. пособие. Томск; 2007.
3. Огородова Л.М., Федорова О.С., Брагина Е.Ю. и др. Генетические маркеры бронхиальной астмы у детей, больных атопическим дерматитом. *Пульмонология* 2007; 4: 37–40.
4. Букреева Е.Б., Сеитова Г.Н. Хроническая обструктивная болезнь легких. В кн.: Пузырев В.П., Огородова Л.М. (ред.). Генетика бронхолегочных заболеваний. М.: Издательский холдинг "Атмосфера"; 2010. 104–122.
5. Фрейдин М.Б., Огородова Л.М., Цой А.Н., Бердникова Н.Г. Генетика бронхиальной астмы. В кн.: Пузырев В.П., Огородова Л.М. (ред.). Генетика бронхолегочных заболеваний. М.: Издательский холдинг "Атмосфера"; 2010. 78–104.
6. Егорова Н.Е., Логвиненко Н.И., Максимов В.Н. Особенности полиморфизма некоторых макрофаг-специфических генов у больных с тяжелой пневмонией в условиях Севера. В кн.: 17-й Национальный конгресс по болезням органов дыхания. Казань; 2007. 288.
7. Anthony W., O'Regan M.B., Jeffrey S., Berman M.D. The gene for acute sarcoidosis? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 168: 1162–1166.
8. Пузырев В.П., Степанов В.А., Фрейдин М.Б. Молекулярные основы распространенных мультифакториальных заболеваний. В кн.: Иванов В.И., Киселев Л.Л. (ред.). Геномика – медицине. М.: ИКЦ "Академкнига"; 2005. 100–137.
9. Амаржаргал Я., Рудко А.А. Полиморфизм генов CCR5, CCR2, SDF1 в популяции Монголии. *Мед. генетика* 2007; 5: 30–33.
10. Воевода М.И., Устинов С.Н., Юдин Н.С. и др. Связь полиморфизма гена хемокинового рецептора CCR2 с инфарктом миокарда. *Докл. РАН* 2002; 385 (2): 367–370.
11. Gonzalez P., Alvares R., Batalla A. et al. Genetic variation at the chemokine receptor CCR5/CCR2 in myocardial infarction. *Genes Immun.* 2001; 2 (4): 191–195.
12. Чучалин А.Г. (ред.). Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). М.: Атмосфера; 2002.

13. Чучалин А.Г. (ред.). Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). М.: Атмосфера; 2007.
14. Чучалин А.Г. (ред.). Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (COLD). Пересмотр 2007 г. М.: Атмосфера, 2008.

**Информация об авторах**

Черкашина Ирина Ивановна – д. м. н., проф. кафедры внутренних болезней № 1 ГОУ ВПО "КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого"; тел.: (391) 264-29-80; e-mail: Cherkashina@list.ru  
Никулина Светлана Юрьевна – д. м. н., проф., проректор по учебной работе ГОУ ВПО "КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого"; тел.: (391) 220-09-14; e-mail: Nikulina@mail.ru

Логвиненко Надежда Ивановна – д. м. н., проф. кафедры терапии ФПК ППВ ГОУ ВПО НГМУ; тел.: (3832) 20-86-45; e-mail: Nadejda-Logvinenko@yandex.ru

Максимов Владимир Николаевич – д. м. н., старший научный сотрудник ГУ "НИИ терапии СО РАМН"; тел.: (383) 279-99-45; e-mail: Medik11@mail.ru

Воевода Михаил Иванович – д. м. н., проф., директор ГУ "НИИ терапии СО РАМН"; тел. (383) 264-25-16; e-mail: Mvoevola@ya.ru

Шестовицкий Владимир Андреевич – д.м.н., проф. кафедры терапии ИПО ГОУ ВПО "КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого"; тел.: (391) 264-29-80; e-mail: chestovitzki@yandex.ru

Шульман Владимир Абрамович – д. м. н., проф. кафедры внутренних болезней № 1 ГОУ ВПО "КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого"; тел.: (391) 264-09-79; e-mail: shulman36@mail.ru

Чернова Анна Александровна – к. м. н., ассистент кафедры внутренних болезней № 1 ГОУ ВПО "КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого"; тел.: (391) 264-17-71; e-mail: anechkachernova@yandex.ru

Поступила 06.07.11

© Коллектив авторов, 2013

УДК [616.24-036.12+616.248]-056.7