Уушгины архаг бөглөрөлт өвчний үед *CHRNA5, CHRNA3* генийн полиморфизмыг тодорхойлсон дүн

Б.Агарзандан[2], Ж.Жамбалдорж[1], Г.Чимэдлхамсүрэн[1], П.Одончимэг[3], Ж.Сарантуяа[1]

[1]Молекул биологи – Удамзүйн тэнхим, Био-Анагаахын Сургууль, АШУҮИС
[2]Биологийн тэнхим, Био-Анагаахын Сургууль, АШУҮИС
[3]Уушгины эмгэг судлалын тасаг, ШУГТЭ
Цахим шуудан: agarzandan@mnums.edu.mn Утас: 99857973

Түлхүүр үг:

Никотины ацетилхолин рецептор
Нэг нуклеотидын полиморфизм

Товч утга; Сүүлийн үед хийгдсэн хэд хэдэн судалгаагаар *CHRNA5 (rs16969968), CHRNA3 (rs1051730)* генийн полиморфизм болон хүрээлэн буй орчны нөлөөлөл нь уушгины архаг бөглөрөлт өвчин (УАБӨ) үүсэх эрсдэлт хүчин зүйл болохыг тогтоогоод байна.[1,2] Судалгааг аналитик судалгааны тохиолдол хяналтын загвар ашиглан УАБӨ-тэй 100 хүн, эрүүл 100 хүн хамруулсан. *CHRNA5* генийн *rs16969968*, *CHRNA3* генийн *rs1051730* генийн полиморфизмыг тодорхойлохдоо огтлогдсон хэрчмийн уртын полиморфизм (ОХУП)-ын аргыг ашигласан. *CHRNA5* генийн *rs16969968, CHRNA3* генийн *rs1051730* полиморфизмын аллель болон генотипын давтамжийг судалгааны хоёр бүлэгт харьцуулан судлахад статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай илэрсэн. **Дүгнэлт:** 1. *CHRNA5* генийн *rs16969968, CHRNA3* генийн *rs1051730* полиморфизмын эрсдэлт А аллель судалгааны тохиолдлын бүлэгт өндөр давтамжтай илэрсэн нь УАБӨ-д нөлөөлөх удмын эрсдэлт хүчин зүйл байж болохыг харуулж байна. 2. *CHRNA5, CHRNA3* генийн А-А гаплотипын хослол агуулж буй хүмүүс УАБӨ-р өвчлөх эрсдэл нь 2.58 дахин их байна.

Үндэслэл: Сүүлийн үед хийгдсэн хэд хэдэн судалгаагаар *CHRNA5 (rs16969968), CHRNA3 (rs1051730)* генийн полиморфизм болон хүрээлэн буй орчны нөлөөлөл нь уушгины архаг бөглөрөлт өвчин (УАБӨ) үүсэх эрсдэлт хүчин зүйл болохыг тогтоогоод байна.[1,2] *CHRNA5, CHRNA3* генүүд нь 15-р хромосомын урт мөрөнд (15q25.1) байрлаж никотин ацетилхолин рецепторын дэд нэгжийг кодлодог. Никотины ацетилхолин рецептор нь ацетилхолин болон никотин медиатор холбогдох, лиганд-холбоот ионы сувгийн рецептор юм.[3] *CHRNA3* генийн 78894339 дэх байрлалын нуклеотидын өөрчлөлт (A/G), *CHRNA5* генийн 78882925 дэх байрлалын нуклеотидын өөрчлөлтөөр (A/G) никотины ацетилхолин рецепторын дэд нэгжийн бүтцийн М3-М4 гогцоон дотор уургийн дарааллын аминхүчлийн (Аспартат<Аспарагин) солигдолт болдог. Сөрөг цэнэгтэй аспартат нь Ca^{2+}-ийн ионы нэвтрэмтгий байдлыг нөхцөлдүүлж байдаг бол аспарагинаар солигдсон үед сөрөг цэнэгтэй карбоксил бүлгийн гидроксил бүлэг нь амидын бүлэгээр халагдаж рецепторын үйл ажиллагаанд нь өөрчлөлт орж эсийн доторх Ca^{2+}-ийн урсгалыг бий болгож агонист бодист үзүүлэх хариу урвал буурах, үрэвслийн үйл явцыг сэдээж, хавдрын өсөлтийг дэмждэг хэмээн таамаглаж байна.[4,5]

Зорилго: *CHRNA5* генийн *rs16969968, CHRNA3* генийн *rs1051730* полиморфизмыг УАБӨ-тэй холбон судлах

Зорилт:

1. CHRNA5, CHRNA3 генийн полиморфизмыг тохиолдол болон хяналтын бүлэгт тодорхойлж, УАБӨ-д холбоотой эсэхийг тогтоох, нуклеотидын дараалал тогтоох аргаар баталгаажуулах
2. CHRNA5, CHRNA3 генүүдийн гаплотип хослолыг тооцоолж, УАБӨ-д холбоотой эсэхийг тогтоох

Арга аргачлал: Судалгааг аналитик судалгааны тохиолдол хяналтын загвар ашиглан хийсэн. Улсын Нэгдүгээр Төв Эмнэлэг (УНТЭ), Төрийн Тусгай Албан Хаагчдын Нэгдсэн Эмнэлгийн (ТТАХНЭ) Уушги судлалын тасаг, АШУҮИС-ийн Молекул биологи - Удамзүйн тэнхмийн сургалт судалгааны лабораторийг түшиглэн хийж гүйцэтгэсэн. Судалгааны тохиолдлын бүлэгт УНТЭ, ТТАХНЭ-ийн Уушги судлалын тасагт УАБӨ-ний сэдрэл оноштой хэвтэн эмчлүүлсэн 100 өвчтнийг олон улсын GOLD хөтөлбөрийн шалгуураар оношлон хамруулсан. Хяналтын бүлэгт УНТЭ, ТТАХНЭ-т урьдчилан сэргийлэх үзлэгт хамрагдсан, тохиолдлын бүлгийн хүмүүстэй нас, хүйс ойролцоо харьцангуй эрүүл 100 хүнийг сонгон сайн дурын үндсэн дээр хамруулсан. Судалгаанд оролцогчдоос 3 мл цус авч, сорьц тус бүрээс ДНХ ялгах цомог (Bioneer Inc, South Korea) ашиглан үйлдвэрлэгчийн стандарт протоколын дагуу геномын ДНХ ялгасан. *CHRNA5, CHRNA3* генийн полиморфизмыг тодорхойлохдоо огтлогдсон хэрчмийн уртын полиморфизм (ОХУП)-ын аргыг ашигласан. Энгийн полимеразын гинжин урвалын аргаар аллель өвөрмөц праймерыг ашиглан бай дараалыг олшруулаад TaqI болон DraI рестрикцийн эсгэгээр зүсэж, үүссэн хэрчмийн уртаар генийн аль хэв шинж болохыг тодорхойлсон. Үр дүнг 2%, 3%-ийн агарозын (Promega Corporation, АНУ) гель электрофорезоор тодорхойлсон. Судалгааны мэдээлэлд боловсруулалт хийхдээ Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, АНУ), Stata 12 (StataCorp, АНУ), SNPAlyze (Dynacom, Япон) зэрэг программуудыг ашигласан. Тодорхойлсон генотипуудын нуклеотидын дарааралыг тогтоохдоо ПГУ-ын бүтээгдэхүүн цэвэршүүлэх цомог (PCR purification kit #21106; QIAGEN АНУ) ашиглан протоколын дагуу бүтээгдэхүүн цэвэршүүлж, BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit ашиглан ПГУ-аар олшруулж, каппиляр электрофорезээр тодорхойлон, шинжилгээний үр дүнг CLC Sequence viewer ашиглан боловсруулалт хийсэн.

Үр дүн: Судалгаанд тохиолдлын болон хяналтын бүлэгт нийт 200 хүн оролцсон ба дундаж нас 62.24±10.2 хүйсийн харьцаагаар авч үзэхэд 55.5% (n=111) нь эрэгтэй, 44,5% (n=89) эмэгтэй хүмүүс байв. Судалгааны бүлгүүдэд хүйсийн харьцаа нас, биеийн жингийн индекс (БЖИ), тамхи татсан жил, өдөрт татсан тамхины тоо, тамхичны индексээр ойролцоо, харин уушгины агааржилтын үйл ажиллагааны үзүүлэлтээр хоорондоо статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай байсан.

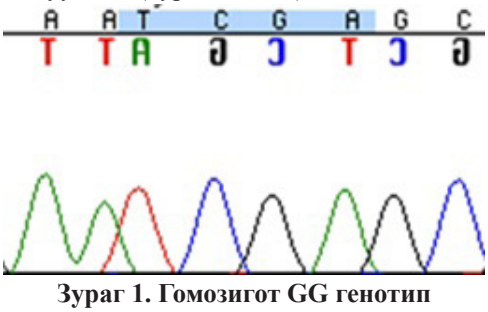
Судалгаанд хамрагдсан 200 хүнд *CHRNA5* генийн *rs16969968* полиморфизмыг тодорхойлоход гомозигот GG генотипын давтамж 71,5% (n=143), гетерозигот AG генотипын давтамж 28.5% (n=57) илэрсэн ба гомозигот AA генотип илэрсэнгүй. CHRNA3 генийн rs1051730 полиморфизмыг тодорхойлоход гомозигот GG генотипын давтамж 78,5% (n=157), гетерозигот AG генотипын давтамж 21.5% (n=43) илэрсэн ба гомозигот AA генотип илэрсэнгүй. Судалгааны тохиолдол болон хяналтын бүлгүүдэд *CHRNA5* генийн *rs16969968, CHRNA3* генийн *rs1051730* полиморфизмын аллель болон генотипын давтамжийг харьцуулан судлахад судалгааны хоёр бүлэгт статистик ач холбогдол бүхий ялгаатай илэрсэн. (Хүснэгт1)

Хүснэгт 1. *CHRNA5* генийн *rs16969968, CHRNA3* генийн *rs1051730* полиморфизмын судалгааны бүлгүүд дэх генотипын давтамж

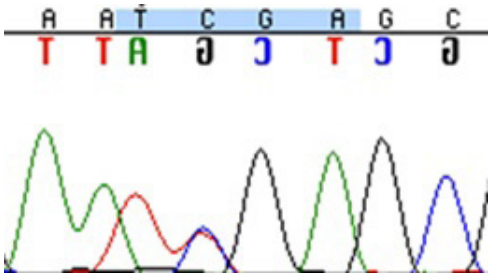
Ген	Генотип	Тохиолдлын бүлэг(n=100)	Хяналтын бүлэг(n=100)	p утга	OR	(95% CI)
CHRNA5	Гетерозигот AG Гомозигот GG	37 (0.37) 63 (0.63)	20 (0.20) 80 (0.80)	**0.0085**	2.34	(1.24-4.43)
CHRNA3	Гетерозигот AG Гомозигот GG	28(0.28) 72(0.72)	15 (0.15) 85 (0.85)	**0.0272**	2.20	(1.09-4.44)

Тайлбар: CHRNA5 генийн rs16969968, CHRNA3 генийн rs1051730 полиморфизмын генотипын давтамж: Хувьсагчууд бодит тоо давтамжаар илэрхийлэгдсэн. Статистик үнэн магадлалыг Пирсоны хи квадрат тест ашиглан тооцоолсон. p утга 0.05-аас бага байх үед статистик үнэн магадлалтай гэж үзсэн. OR- Харьцангуй харьцаа (odd's ratio); 95% CI=95%-ийн итгэх интервал

CHRNA5 генийн rs16969968, CHRNA3 генийн rs1051730 полиморфизмын тохиолдол болон хяналтын бүлгүүдэд илэрсэн хэв шинжүүдээс (Гомозигот GG, Гетерозигот AG) санамсаргүй түүврийн аргаар сонгож, нуклеотидын дараалал тогтоох аргаар үр дүнг баталгаажуулсан. (Зураг 1,2,3,4.)

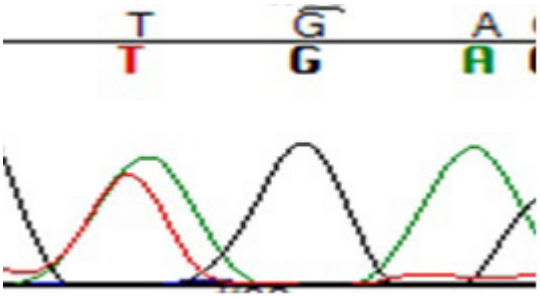


Зураг 1. Гомозигот GG генотип

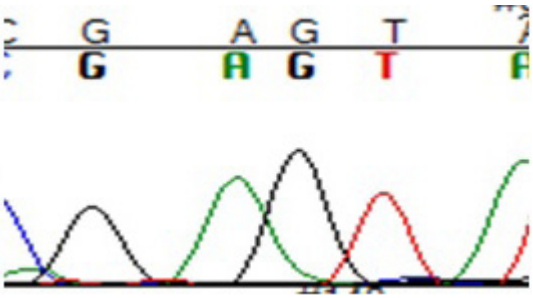


Зураг 2. Гетерозигот AG генотип

CHRNA5 генийн полиморфизмын гомозигот GG, гетерозигот AG генотипыг нуклеотидын дараалал тогтоох аргаар баталгаажуулж, үр дүнг зургаар харуулав.



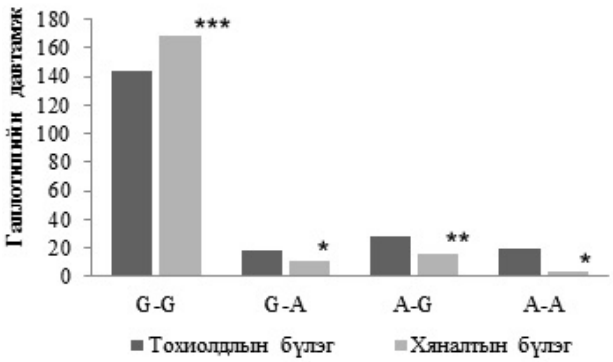
Зураг 3. Гомозигот GG генотип



Зураг 4. Гетерозигот AG генотип

CHRNA3 генийн полиморфизмын гомозигот GG, гетерозигот AG генотипыг нуклеотидын дараалал тогтоох аргаар баталгаажуулж, үр дүнг зургаар харуулав.

CHRNA5 генийн *rs16969968, CHRNA3* генийн *rs1051730* полиморфизмын гаплотип хослолын давтамжийг судалгааны бүлгүүдэд харьцуулж үзэхэд G-G (OR=0.47, 95% CI 0.34-0.67, p=0.00038) гаплотип нь судалгааны хоёр бүлэгт өндөр давтамжтай илэрсэн. Харин A-A гаплотиптэй хүмүүс УАБӨ-өөр өвчлөх эрсдэл нь 2.58 дахин өндөр байна. (OR=2.44, 95% CI 1.05-5.64, p=0.03). G-A, A-G гаплотип нь УАБӨ-д сул эрсдэлтэйг зааж байна. (Зураг 5.)



Зураг 5. *CHRNA5* генийн *rs16969968, CHRNA3* генийн *rs1051730* полиморфизмын судалгааны бүлгүүд дэх гаплотипийн давтамж

Тайлбар: *CHRNA5* генийн *rs16969968, CHRNA3* генийн *rs1051730* полиморфизмын судалгааны бүлгүүд дэх гаплотипийн давтамжийг үзүүлэв. Статистик үнэн магадлалыг Пирсоны хи квадрат тест ашиглан тооцоолсон. p утга 0.05-аас бага байх үед статистик үнэн магадлалтай гэж үзсэн. p<0.05*, p<0.01**, p<0.001***

Хэлцэмж: УАБӨ нь дэлхий нийтэд өргөн тархсан, жил ирэх тусам уг өвчнөөр өвчлөгсөд болон өвчний улмаас нас барагсдын тоо нэмэгдэж байна.[6] УАБӨ үүсэхэд нөлөөлөх хүчин зүйлийг гадаад болон дотоод хэмээн ангилдаг ба гадаад эрсдэлт хүчин зүйлст тамхидалт, орчны агаарын бохирдолт, амьдрах орчин зэрэг хүчин зүйлүүд ордог. Дээрх хүчин зүйлс өвчин үүсэхэд нөлөөлдөг болох нь батлагдсан байна.[7] Дотоод эрсдэлт хүчин зүйлийг тухайн хүний удмын онцлог, ген, геномын дараалал, түүний бүтээгдэхүүнтэй холбон судлаж тайлбарлах болсон.[8,9] *CHRNA5* генийн *rs16969968 болон CHRNA3* генийн *rs1051730* полиморфизмууд нь тамхи таталт, тамхинд донтолт болон уушгины хавдрын өсөлтийг дэмждэг байна.[10] Европ-Америк, Кавказын хүн амд хийсэн хэд хэдэн геномын судалгаагаар эдгээр полиморфизмууд нь уушгины хавдартай болох эрсдэлд маш хүчтэй, харин УАБӨ-д бага эрсдэлтэй болохыг тогтоосон байна.[10,11]

Бидний судалгааны үр дүнгээс харахад *CHRNA5, CHRNA3* генийн эрсдэлт аллель судалгааны тохиолдлын бүлэгт өндөр давтамжтай илэрсэн нь УАБӨ үүсэх удмын хүчин зүйлийн нэг болохыг харуулж байна. *CHRNA5* генийн *rs16969968* полиморфизмын эрсдэлт хэв шинж АА генотипыг үндэстэн ястны популяцийн тархалтаас үзэхэд Европ тивд 13.9%, Америк тивд 6.3%, Африк тивд 0.5%, Өмнөд Азид 4.3%, Зүүн Азид эрсдэлт хэв шинж болох АА генотип илрээгүй ба гетерозигот AG хэв шинж 5.4%-тай, *CHRNA3* генийн *rs1051730* полиморфизмын эрсдэлт хэв шинж АА генотипын тархалт Европ тивд 14.1%, Америк тивд 6.6%, Африк тивд 0.9%, Өмнөд азид 4.3%, Зүүн Азид АА генотип нь илрээгүй байна. *CHRNA5, CHRNA3* генийн популяцийн тархалтаас харахад үндэстэн ястнуудад АА генотип нь маш бага хувьтай илэрдэг нь харагдаж байна. Дээрх генотипийн тархалт өөр өөр хувьтай ялгаатай байгаа нь магадгүй үндэстэн улс орны хүмүүсийн удамшлын онцлог, бүс нутагт тархаж буй генийн дараалал, гадаад орчны хүчин зүйлс зэрэгтэй холбоотой байж болох юм. Pawel Krawczyk, Beata Bielnacka нарын судалгаанд эрсдэлт аллель (гомозигот АА) 10,5% илэрсэн бөгөөд судалгаанд оролцсон оролцогчдын тоо нь бидний судалгаанд оролцогчдын тоотой харьцуулахад 10 дахин их байсан.[12]

Бид ОХУП-н аргаар *CHRNA5, CHRNA3* генийн полиморфизмыг тодорхойлсон ба илэрсэн хэв шинжүүдээс (Гомозигот GG, Гетерозигот AG) сонгож, нуклеотидын дараалал тогтоох аргаар үр дүнг баталгаажуулсан. ОХУП-н аргаар тодорхойлсон полиморфизмын үр дүн, нуклеотидын дараалал тогтоох аргаар тодорхойлсон үр дүнтэй нийцэж байсан нь бидний судалгааны үр дүнг улам баталгаажуулж байна.

Дүгнэлт:

1. *CHRNA5* генийн *rs16969968, CHRNA3* генийн *rs1051730* полиморфизмын эрсдэлт А аллель судалгааны тохиолдлын бүлэгт өндөр давтамжтай илэрсэн нь УАБӨ-д нөлөөлөх удмын эрсдэлт хүчин зүйл байж болохыг харуулж байна.
2. *CHRNA5, CHRNA3* генийн А-А гаплотипын хослол агуулж буй хүмүүс УАБӨ-р өвчлөх эрсдэл нь 2.58 дахин их байна.

Талархал: Энэхүү судалгааг хийхэд туслалцаа үзүүлсэн АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын сургуулийн Молекул биологи - Удамзүйн тэнхмийн эрдэмтэн багш нар, Мал Эмнэлгийн Хүрээлэнгийн Молекул генетикийн

лабораторийн хамт олон, сорьц цуглуулахад туслалцаа үзүүлсэн УНТЭ, ТТАХНЭ-ийн Уушги судлалын хамт олонд судалгааны багийн зүгээс гүн талархал илэрхийлж цаашдын ажил үйлсэд нь өндөр амжилт хүсье.

Ном зүй:

1. *Zhang J, Summah H, Zhu YG, Qu JM. Nicotinic acetylcholine receptor variants associated with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. Respir Res. 2011;12(158):1465-9921.*
2. *Teramoto S. 1. COPD pathogenesis from the viewpoint of risk factors. Internal medicine (Tokyo, Japan). 2007;46(2):77-79.*
3. *Improgo MR, Scofield MD, Tapper AR, Gardner PD. From smoking to lung cancer: the CHRNA5/A3/B4 connection. Oncogene. 2010;29(35):4874-4884.*
4. *Lococo F, Cesario A, Petracca-Ciavarella L, Granone P, Russo P. Role of CHRNA5-A3 genetic Locus variants and developing drug for chronic obstructive pulmonary disease. Curr Med Chem. 2012;19(34):5863-5870.*
5. *Kuryatov A, Berrettini W, Lindstrom J. Acetylcholine receptor (AChR) alpha5 subunit variant associated with risk for nicotine dependence and lung cancer reduces (alpha4beta2) (2)alpha5 AChR function. Molecular pharmacology. 2011;79(1):119-125.*
6. *Pauwels RA, Buist AS, Ma P, Jenkins CR, Hurd SS, Committee GS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary. Respiratory care. 2001;46(8):798-825.*
7. *Hammond EC, Seidman H. Smoking and cancer in the United States. Preventive medicine. 1980;9(2):169-174.*
8. *Rennard SI. The Promise of Observational Studies (ECLIPSE, SPIROMICS, and COPDGene) in Achieving the Goal of Personalized Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Seminars in respiratory and critical care medicine. 2015;36(4):478-490.*
9. *Bosse Y. Updates on the COPD gene list. International journal of chronic obstructive pulmonary disease. 2012;7:607-631.*
10. *Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, et al. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. Hum Mol Genet. 2007;16(1):36-49.*
11. *Siedlinski M, Cho MH, Bakke P, et al. Genome-wide association study of smoking behaviours in patients with COPD. Thorax. 2011;66(10):894-902.*
12. *Wojas-Krawczyk K, Krawczyk P, Biernacka B, et al. The polymorphism of the CHRNA5 gene and the strength of nicotine addiction in lung cancer and COPD patients. Eur J Cancer Prev. 2012;21(2):111-117.*

Results of the *CHRNA5* and *CHRNA3* gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease.

Agarzandan B[2], Jambaldorj J[1], Chimedlkhamsuren G[1], Odonchimeg P[3], Sarantuya J[1]

[1]Department of Molecular biology and Genetics, School of Bio-medicine, MNUMS
[2]Department of Biology, School of Bio-medicine, MNUMS
[3]Department of Pulmonology, Third Central Hospital Mongolia
Email: agarzandan@mnums.edu.mn, Tel: 99857973

We have involved 100 COPD case, 100 control subjects using case-control of analytic study. Determination of *CHRNA5* and *CHRNA3* gene polymorphisms were performed by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) method. A comparative study of the alleles and genotype frequencies of the polymorphism of the *CHRNA5* gene *rs16969968* and the *CHRNA3* gene *rs1051730* revealed statistically significant differences between the two study groups.

Key words: Nicotinic acetylcholine receptor, single-nucleotide polymorphism