

Полиморфные варианты гена GLCCI1 у детей с бронхиальной астмой: результаты 1 этапа одноцентрового открытого проспективного исследования

Е.С. Минина¹, В.И. Новикова¹, П.Д. Новиков¹, А.С. Бабенко²

¹ Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

GLCCI1 gene polymorphism in children with bronchial asthma: results of stage 1, single-center, open-label prospective trial

E.S. Minina¹, V.I. Novikova¹, P.D. Novikov¹, A.S. Babenko²

¹ Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Аннотация

Цель исследования. Анализ роли полиморфного варианта гена GLCCI1 (rs37973) у детей с бронхиальной астмой (БА). **Материалы и методы.** В исследовании приняли участие 60 детей 3-17 лет с аллергической (n=37) и смешанной формой БА (n=23). Генетическое исследование включало выполнение генотипирования исследуемого локуса гена GLCCI1 (rs37973) методом ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). **Результаты.** Анализ частоты встречаемости генотипов и аллелей установил преобладание гетерозигот (AG) и аллели G в группе исследования. Были выявлены статистически значимо более высокие показатели ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ОФВ₁ и МОС75 (по данным спирометрии) при гетерозиготном генотипе (AG) в сравнении с гомозиготой GG (p<0,05). При этом наблюдалось статистически значимо большее количество детей с уровнем ОФВ₁ ≥80% (p=0,009) при сравнении этих же подгрупп генотипов.

Заключение. Была выявлена ассоциация полиморфного варианта локуса rs37973 гена GLCCI1 с функцией внешнего дыхания по данным спирометрии. Наличие гетерозиготного варианта гена (AG) определяло более высокие показатели функции внешнего дыхания (ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ОФВ₁, МОС75). Проведение исследования с установлением генотипа rs37973 GLCCI1 гена может использоваться для диагностики прогностически благоприятного и неблагоприятного варианта течения БА у детей, что следует учитывать при выборе различных средств базисной терапии и способов реабилитации.

Ключевые слова

Бронхиальная астма, GLCCI1, функция внешнего дыхания, ОФВ₁.

Summary

Objective. The role of the GLCCI1 gene polymorphism (rs37973) analysis in children with bronchial asthma (BA).

Methods. The study involved 60 children 3-17 years old with allergic (n=37) and mixed forms of BA (n=23). The genetic study included performing genotyping of the studied locus of the GLCCI1 gene (rs37973) by PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism). **Results.** Analysis of the frequency of genotypes and alleles occurrence established the predominance of heterozygotes (AG) and allele G in the study group. There were statistically significantly higher indices of VC, FVC, FEV₁ and MEF75 (according to spirometry data) with a heterozygous genotype (AG) in comparison with a homozygous GG (p<0,05). At the same time, there was a statistically significantly greater number of children with a FEV₁ level ≥80% (p=0,009) when comparing the same subgroups of genotypes.

Conclusion. The study revealed the association of GLCCI1 gene polymorphism (rs37973) with the respiratory function according to spirometry data. The presence of a heterozygous gene variant (AG) determined higher indicators of the function of respiratory function (VC, FVC, FEV₁, MEF75). The study with the establishment of the GLCCI1 gene (rs37973) genotype can be used to diagnose a prognostically favorable and unfavorable course of asthma in children, which should be taken into account when choosing various basic methods of therapy and rehabilitation.

Keywords

Bronchial asthma, GLCCI1, respiratory function, FEV₁.

Введение

Бронхиальная астма (БА) у детей является наиболее распространенным хроническим заболеванием, которое оказывает влияние на качество жизни детей, их семей и на систему здравоохранения в целом. Согласно опубликованным данным Всемирной организации здравоохранения во всем мире более 300 миллионов человек страдают БА [1]. Однако точное количество больных БА неизвестно, так как остается проблема гиподиагностики заболевания, особенно у детей до 5 лет [2, 3].

БА является мультифакторным заболеванием, которое возникает в результате взаимодействия большого количества эндогенных и экзогенных факторов [4, 5]. В документе 2020 г. Глобальной инициативы по бронхиальной астме (GINA) [3] обозначена роль экзогенных факторов риска БА в реализации генетической предрасположенности к развитию заболевания, частоте его обострений и эффективности различных методов лечения. В настоящее время выявлено более 150 генов, которые ответственны за развитие БА [4]. Становление технологии полногеномного анализа ассоциаций (Genome-wide Association Study – GWAS) позволило идентифицировать большое количество полиморфных вариантов генов связанных с индукцией БА, установить этнические особенности генотипов по данным вариантам генов, определить их роль в зависимости от этнической принадлежности пациента [5, 6, 7].

Одним из направлений генетических исследований сегодня является изучение роли полиморфных вариантов генов в эффективности лечения БА [8]. К препаратам базисной медикаментозной терапии БА относят глюкокортикостероиды (преимущественно ингаляционные формы – иГКС), антилейкотриеновые препараты и β_2 -агонисты длительного действия. Обсуждается также применение препаратов моноклональных антител – к IgE (омализумаб), к 4 и 5 интерлейкинам [3, 9].

В различных исследованиях была показана ассоциация гена глюкокортикоид-индуцированного транскрипта 1 (GLCCI1) с терапией БА. Этот ген располагается на 7 хромосоме, наиболее известные его SNP-варианты (SNP – single nucleotide polymorphism) – rs37973 и rs37972 [10, 11]. Была отмечена роль полиморфного варианта гена rs37973 в развитии неконтролируемого течения БА [12] и более низком уровне ОФВ₁ на фоне лечения иГКС

(маркер – аллель G) [13], снижении показателей спирометрии при гетерозиготном (AG) [12] и монозиготном варианте (GG) [12, 14, 15] генотипа.

Целью нашего исследования был анализ роли полиморфного варианта гена GLCCI1 (rs37973) у детей с БА в Витебской области, Беларусь.

Материалы и методы

Было проведено одноцентровое открытое проспективное исследование на базе аллергологического отделения УЗ «Витебский областной детский клинический центр», г. Витебск, Республика Беларусь.

Исследование было одобрено комитетом по этике клинических испытаний учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (ВГМУ). Выполнялось в рамках внутриуниверситетского научного стартап-гранта для молодых ученых на 2020 г. ВГМУ.

Группа исследования состояла из 60 детей 3-17 лет ($9,7 \pm 3,3$ лет) с аллергической ($n=37$) и смешанной формой БА (аллерген-индуцированная, индуцированная физической нагрузкой) ($n=23$). Участники исследования: 41 мальчик ($9,6 \pm 3,3$ лет) и 19 девочек ($10,0 \pm 3,5$ лет). По степени тяжести и течению заболевания группа состояла преимущественно из персистирующей БА легкой степени тяжести (81,7%). Диагноз был выставлен согласно международным рекомендациям и обоснован на данных анамнеза, клинических проявлениях, лабораторном, инструментальном и иммунологическом обследовании. Базисное медикаментозное лечение БА проводилось 36 детям (27 детей – иГКС в качестве монотерапии или в комбинации с β_2 -агонистами длительного действия/ антилейкотриеновыми препаратами, 9 детей – монотерапия антилейкотриеновыми препаратами).

Материалом для исследования послужили образцы соскобного материала и отделяемого слизистой оболочки ротоглотки, забор материала осуществляли цитощеткой. Выделение геномной ДНК выполнялось сорбционным методом с использованием набора реагентов «Нуклеосорб. Комплектация А» (кат. № 005a.2, ОДО «Праймтех», Беларусь), согласно протоколу производителя.

Для определения генотипа гена-мишени (GLCCI1, rs37973) в биологических образцах использовали метод ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм

длин рестрикционных фрагментов) с последующим разделением полученных фрагментов в агарозном геле. Для ПЦР целевой последовательности использовали олигонуклеотидные праймеры описанные в работе К. Hirai и др., 2019 г. [16]. Последовательность прямого олигонуклеотидного праймера – 5'-TGTTGACCCCTGCTATTCAGTG-3', обратного олигонуклеотидного праймера – 5'-CAGGAGAAATGTCTGGAACGTG-3'.

Конечный объем реакционной смеси составил 25 мкл и содержал необходимые реагенты в следующих концентрациях: 0,1 мМ смеси дНТФ, 2 мМ раствора $MgCl_2$, 1 ед. термостабильной Taq ДНК-полимеразы с соответствующим буферным раствором из комплекта предоставляемого производителем фермента – PrimeTaq ДНК-полимеразы, с буферами кат. № 1801.4 (ОДО «Праймтех», Беларусь), 500 нМ олигонуклеотидных праймеров (АО «ГенТерра», Россия). Реакцию проводили с использованием твердотельного амплификатора T100 (BioRad, США). Температурный режим: +95°C – 2 минуты, а затем 32 цикла +95°C – 5 секунд, +58°C – 10 секунд и +72°C – 30 секунд. Конечный этап +72°C – 5 минут.

Рестрикцию проводили с использованием фермента AраI (NEB, США) кат. № R0507S с CutSmart буферным раствором, согласно протоколу производителя. Для проведения 1 реакции использовали 5 ед. активности фермента. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл.

Разделение фрагментов проводили в 3% агарозном (ОДО «Праймтех», Беларусь, кат. № 0032.2) геле с использованием 1х ТАЕ буферного раствора (ЗАО «Евроген», Россия, кат. № RB022).

Спирометрию выполняли во 2-й день пребывания в стационаре с использованием спирометра «МАС-1», в ходе исследования оценивали следующие показатели: жизненная емкость легких (ЖЕЛ), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за 1-ю секунду ($ОФВ_1$), максимальные объемные скорости при выдохе ($МОС_{25}$, $МОС_{50}$, $МОС_{75}$), отношение $ОФВ_1/ФЖЕЛ$, индекс Тиффно. Для статистической обработки и сравнения данных спирометрии показатели выражали в % и % от должных показателей.

Статистический анализ данных производили с помощью программы Statistica 10.0. К количественным признакам, имеющим распределение, отличное от нормального, применяли непараметрические методы и использовали критерий

Манна-Уитни (при сравнении 2-х независимых групп). Для анализа частот генотипов и аллелей использовали критерий χ^2 Пирсона и двусторонний критерий Фишера.

Результаты и обсуждение

У наблюдаемых детей с аллергической и смешанной формой БА при проведении кожных скарификационных проб была выявлена сенсibilизация к бытовым ($n=35$, 58,3%), эпидермальным ($n=29$, 48,3%), пыльцевым ($n=4$, 6,7%) и пищевым аллергенам ($n=4$, 6,7%). Среди группы бытовых аллергенов наиболее часто встречалась сенсibilизация к домашней пыли и перу подушки, среди группы эпидермальных аллергенов – шерсть кошки и шерсть собаки. У пациентов со смешанной формой БА отмечалось более тяжелое течение заболевания ($p=0,021$). Среди аллергических заболеваний наиболее часто встречался аллергический ринит (АР), так же наблюдался атопический дерматит, крапивница. Следует отметить, что практически у всех детей (95%) в группе исследования, несмотря на наши рекомендации по гипоаллергенному быту и диете, были выявлены экзогенные факторы риска, способствующие развитию БА и приводящие к ее обострению (таблица 1).

Анализ частоты встречаемости генотипов и аллелей выявил преобладание гетерозигот (AG) и аллели G в группе исследования (таблица 2). Статистически значимых различий по частоте встречаемости генотипов и аллелей в зависимости от формы БА выявлено не было ($\chi^2=2,234$, $p=0,135$), что указывает на отсутствие влияния данного варианта гена на развитие различных форм БА.

При сравнении подгрупп по генотипу не было выявлено различий по полу и возрасту, тяжести течения БА, стажу БА, уровню общего IgE, наличию сопутствующих аллергических заболеваний, ступени лечения БА ($p>0,05$), также не было выявлено различий при частотном анализе аллелей ($p>0,05$).

При оценке данных спирометрии были отмечены статистически значимо более высокие показатели ЖЕЛ, ФЖЕЛ, $ОФВ_1$ и $МОС_{75}$ при гетерозиготном генотипе (AG) в сравнении с гомозиготой по аллели G (GG) (таблица 3).

Детальный анализ значений $ОФВ_1$ (% от должных показателей) выявил статистически значимо большее количество детей с уровнем $\geq 80\%$ ($p=0,009$), характеризующим контролируемое течение БА по данному по-

Таблица 1. Клиническая характеристика группы исследования

Показатель		Аллергическая форма БА (n=37)	Смешанная форма БА (n=23)	p
Пол:	n (%)			0,438
- мужской		27 (73,0%)	14 (60,9%)	
- женский		10 (27,0%)	9 (39,1%)	
Возраст, лет	M±SD	9,5±2,9	10,0±3,9	0,749
Место жительства:	n (%)			0,982
- город		31 (83,8%)	19 (82,6%)	
- село		-	1 (4,4%)	
- поселок		6 (16,2%)	3 (13,0%)	
Степень тяжести и течение БА:	n (%)			0,021
- легкая интермиттирующая		2 (5,4%)	-	
- легкая персистирующая		34 (91,9%)	15 (65,2%)	
- средняя персистирующая		1 (2,7%)	7 (30,4%)	
- тяжелая персистирующая		-	1 (4,4%)	
Стаж заболевания, лет	M±SD	4,1±3,7	3,6±3,9	0,476
Отягощенная наследственность по БА	n (%)	23 (62,2%)	11 (47,8%)	0,352
Экзогенные факторы риска:	n (%)			
- окна, выходящие на дорогу/промышленное предприятие		23 (62,2%)	22 (95,7%)	0,042
- наличие домашних животных				
- наличие в месте проживания ковров / перьевых подушек / книжных полок / растений в горшках с землей		22 (59,5%) 29 (78,4%)	15 (65,2%) 21 (91,3%)	0,589 0,049
Сопутствующий АР	n (%)	20 (50,1%)	10 (43,5%)	0,395
Другие сопутствующие аллергические заболевания (атопический дерматит, крапивница)	n (%)	9 (24,3%)	5 (21,7%)	0,415
Уровень общего IgE, МЕ/мл	M±SD n	489,3±372,6 n=30	576,1±364,5 n=18	0,463

Примечание: p – критерий Манна-Уитни

Таблица 2. Частота встречаемости генотипов и аллелей гена GLCCI1 (rs37973) в группе исследования, n (%)

Показатель	Группа исследования (n=60)		
	AA	AG	GG
Частота встречаемости генотипа	10 (16,6%)	28 (46,7%)	22 (36,7%)
Частота встречаемости аллели А	48 (40%)		
Частота встречаемости аллели G	72 (60%)		

казателю, у гетерозигот (AG) в сравнении с гомозиготами GG.

Заключение

У детей с БА чаще встречаются гетерозиготы AG локуса rs37973 гена GLCCI1. Проведенное ис-

следование выявило ассоциацию полиморфного варианта rs37973 гена GLCCI1 с функцией внешнего дыхания по данным спирометрии. В исследуемой группе детей наличие гетерозиготного варианта гена (AG) определяло более высокие показатели функции внешнего дыхания (ЖЕЛ,

Таблица 3. Показатели функции внешнего дыхания по данным спирометрии, М±SD, Ме [Q25; Q75]

Показатель	Группа исследования			P
	AA (n=8)	AG (n=23)	GG (n=17)	
ЖЕЛ, % от должных показателей	86,9±6,6	93,8±11,2	84,0±11,8	p ₁₋₂ =0,119 p ₁₋₃ =0,485 p ₂₋₃ =0,018
	88,5 [84,0; 91,5]	94,0 [86,0; 101,0]	83,0 [78,0; 90,0]	
ФЖЕЛ, % от должных показателей	85,6±7,5	96,4±14,2	83,4±11,9	
	87,0 [80,5; 92,0]	92,0 [85,0; 109,0]	85,0 [77,0; 90,0]	
ОФВ ₁ , % от должных показателей	81,6±9,3	92,3±11,5	76,6±13,1	p ₁₋₂ =0,071 p ₁₋₃ =0,382 p ₂₋₃ =0,001
	82,5 [74,5; 89,5]	90,0 [83,0; 100,0]	79,0 [70,0; 84,0]	
МОС ₂₅ , % от должных показателей	73,3±17,0	82,9±17,3	69,6±18,4	
	70,5 [61,0; 91,0]	81,0 [72,0; 95,0]	71,0 [62,0; 84,0]	
МОС ₅₀ , % от должных показателей	70,9±20,0	85,6±22,8	68,3±23,0	p ₁₋₂ =0,136 p ₁₋₃ =0,705 p ₂₋₃ =0,095
	69,5 [55,0; 86,5]	80,0 [69,0; 95,0]	74,0 [49,0; 86,0]	
МОС ₇₅ , % от должных показателей	78,9±33,8	85,7±26,3	63,6±19,8	
	69,5 [54,5; 90,0]	78,0 [67,0; 89,0]	68,0 [42,0; 80,0]	
ОФВ ₁ /ФЖЕЛ, %	85,2±7,9	85,4±6,7	80,9±10,5	p ₁₋₂ =0,982 p ₁₋₃ =0,415 p ₂₋₃ =0,245
	87,0 [79,0; 90,1]	85,0 [80,0; 90,0]	85,0 [73,0; 87,0]	
Индекс Тиффно, %	83,3±6,0	86,8±7,9	80,4±10,4	
	84,3 [79,0; 88,0]	87,7 [80,0; 92,0]	81,0 [75,0; 87,0]	

Примечание: p – критерий Манна-Уитни

ФЖЕЛ, ОФВ₁, МОС₇₅) в сравнении с гомозиготой GG. Проведение исследования с установлением генотипа rs37973 GLCC1 гена может использоваться для диагностики прогностически благо-

приятного и неблагоприятного варианта течения БА у детей, что следует учитывать при выборе различных средств базисной терапии и способов реабилитации.

Литература

1. Всемирная организация здравоохранения. Астма. Режим доступа 27.11.2020: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/asthma>.
2. Фурман Е.Г. и др. Оценка риска развития бронхиальной астмы у детей раннего возраста с помощью опросника «Asthma Prediction Tool». Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2018; 63(1): 35-39.
3. Global initiative for asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2020. Режим доступа 25.11.2020: <https://ginasthma.org/reports/>.
4. Минина Е.С., Новикова В.И. Бронхиальная астма у детей: особенности лечения и реабилитации: монография. Витебск: ВГМУ, 2017: 274 с.
5. Warner J.O. et al. Epidemiology and genetics of asthma. J. Allergy Clin. Immun. 2000; 105(2): 166-171.
6. Астафьева Н.Г. и др. Ассоциативные связи между атопией, генами комплекса HLA и другими генами. Российский аллергологический журнал. 2019; 16(3): 5-25.
7. Willis-Owen S.A.G., Cookson W.O.C., Moffatt M.F. The genetics and genomics of asthma. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2018; 19: 223-246.
8. Garcia-Menaya J.M. et al. Pharmacogenetic factors affecting asthma treatment response. Potential implications for drug therapy. Frontiers in Pharmacology. 2019; 10: 520.
9. Титова Н.Д., Новиков П.Д. Рекомендации по диагностике и противорецидивному лечению бронхиальной астмы у детей дошкольного возраста. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2020; 1: 63-70.
10. Застрожина А.К., Захарова И.Н., Сычев Д.А. Бронхиальная астма: фармакогенетические подходы к оптимизации

ции терапии ингаляционными глюкокортикостероидами. Российский аллергологический журнал. 2019; 16(3): 26-34.

11. Савельева О.Н. и др. Фармакогенетика бронхиальной астмы. Медицинская генетика. 2019; 18(4): 3-23.

12. Федорова Ю.Ю. и др. Ассоциация аллельных вариантов генов, участвующих в метаболизме глюкокортикостероидов, с развитием бронхиальной астмы. Генетика. 2019; 55(12): 1424-1432.

13. Hu C. et al. GLCCI1 variation is associated with asthma susceptibility and inhaled corticosteroid response in a Chinese han population. Arch Med Res. 2016; 47(2): 118-125.

14. Tantisira K.G. et al. Genome wide association between GLCCI1 and response to glucocorticoid therapy in asthma. N Engl J Med. 2011; 365(13): 1173-1183.

15. Izuhara Y. et al. GLCCI1 variant accelerates pulmonary function decline in patients with asthma receiving inhaled corticosteroids. Allergy. 2014; 69(5): 668-673.

16. Hirai K. et al. Impact of gene expression associated with glucocorticoid-induced transcript 1 (GLCCI1) on severe asthma and future exacerbation. Biol. Pharm. Bull. 2019; 42: 1746-1752.

Сведения об авторах:

Минина Е.С. – к.м.н., ассистент кафедры педиатрии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет. E-mail: minina.e.s@mail.ru

Новикова В.И. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой педиатрии ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Новиков П.Д. – д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Бабенко А.С. – к.х.н., доцент кафедры биоорганической химии, Белорусский государственный медицинский университет.

Поступила 3.12.2020 г.