

УДК [577.21:616.5-002]-053.3/5

Ляховська Н.В., Шликова О.А., Ляховський В.І.

ВПЛИВ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНУ БІЛКА КЛІТИН КЛАРА (СС 16) НА ПЕРЕБІГ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДОРΟΣЛИХ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Бронхіальна астма (БА) є поширеним захворюванням, на етіологію якого впливає багато факторів. Визначено ряд генів, які асоціюються з розвитком БА, в тому числі ген білка клітин Клара. Проте, до цього часу немає чіткого уявлення про роль кожного гена, взаємодію поліморфних генів та їх вплив на імунну відповідь в патогенезі БА. Метою нашої роботи було вивчити вплив поліморфізму гену білку клітин Клара (A38G), питомою вагою 16 кДа, (СС16) на перебіг БА. Під нашим спостереженням протягом 5 років знаходились 45 осіб, хворих на БА. При аналізі частоти поліморфізму гена СС16, що у осіб, що входили до групи контролю мутантний генотип GG не був виявлений, частота гетерозиготного генотипу AG склала 13% (6 осіб), частота гомозиготного генотипу AA становила 86,9% (40 осіб). У хворих на БА відповідні дані були такими: GG у 6,52% хворих (3 осіб), AG – 28,9% (13 осіб), генотип AA – 64,4% (29 осіб), тобто між частотами генотипів у групі контролю та у хворих на БА відмічається достовірна різниця ($p = 0,019$). У носіїв поліморфної алелі G клінічними особливостями були: прояви atopічного дерматиту, грибової сенсibiliзації, частіше використання ІГКС, тяжчий перебіг БА, хронічний обструктивний бронхіт.

Ключові слова: бронхіальна астма, поліморфізм, білок клітин Клара.

Бронхіальна астма (БА) є поширеним захворюванням, на етіологію якого має вплив чимало факторів. Зростанню розповсюдженості цієї патології сприяють сучасний урбанізований стиль життя, вплив несприятливих умов довкілля, інфекції, пасивне паління та багато інших. Останнім часом широко вивчаються асоціації ряду генів з процесом розвитку БА, список генів-кандидатів постійно розширюється [1]. До цього часу немає чіткого уявлення про роль кожного гена, взаємодію поліморфних генів та їх вплив на імунну відповідь в патогенезі БА.

Білок клітин Клара є важливим ендogenous регулятором, котрий модулює запальні реакції в тканині легень. Цей білок належить до родини секретоглобінів і продукується невідчастими клітинами бронхіол. Білок клітин Клара (Clara Cell Protein) має декілька офіційних назв (СС16, СС10, утероглобін, сечовий білок 1, утероглобулін або секреторний білок клітин Клара), які пов'язані з молекулярною масою або місцем продукції. Досліджено, що білок клітин Клара здатен інгібувати фосфоліпазу А2. Вивчення участі СС 16 в імунологічній відповіді дозволило зробити висновки [2], що цей білок здатен впливати на баланс між Th1/Th2.

Ген, що кодує СС16 довжиною в 5 кб і складається з 550-ВР 5'- нетранслуючої ділянки (5'UTR) та з 3 екзонів [3]. Основним, але недостатньо вивченим на сьогоднішній день поліморфізмом гену СС16 є заміна аденіна на гуанін в позиції 38 (A38G) по направлення вниз від початку транскрипції [4].

При вивченні СС16, як можливу мішень для лікарських засобів відмічено, що поліморфізм G38A гену СС16 може характеризувати зниження чутливості до прийому стероїдів [5].

Мета дослідження

Метою нашої роботи було вивчити вплив поліморфізму гену білку клітин Клара (A38G), питомою вагою 16 кДа, (СС16) на перебіг БА.

Матеріали та методи дослідження

Нами було обстежено 45 дорослих хворих на БА на базі алергологічного і пульмонологічного відділення Полтавської обласної клінічної лікарні. Діагноз та ступінь тяжкості встановлено відповідно до затверджених критеріїв (наказ МОЗ України №767 та міжнародні рекомендації GINA, 2014). Анамнестичні дані зібрані шляхом анкетування з використанням спеціального опитувальника. Усім пацієнтам з БА були проведені загальноклінічне лабораторне, інструментальне та алергологічне обстеження. Наявність сенсibiliзації до алергенів діагностовано шляхом проведення шкірного тестування (прик-тест) з основними аероалергенами (побутовими, пилковими, епідермальними, грибовими) і харчовими алергенами (ТОВ «Імунолог», м. Вінниця). Обстеження проводили за умови відсутності у пацієнта загострення основного чи супутніх хронічних захворювань, гострих інтеркурентних інфекцій та тяжкої супутньої патології, яка б могла вплинути на результати дослідження. В якості групи контролю досліджувались зразки ДНК 46 практично здорових осіб, без алергологічного анамнезу з бази НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Виділення геномної ДНК здійснювали методом фенол-хлороформної екстракції [6]. Поліморфну ділянку гена СС16 ампліфікували за допомогою методу ПЛР на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технологія», Росія) з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів СС16; для ідентифікації алелів проводили рестрикційний аналіз ампліконів при 37°C протягом 12 годин з використанням ендонуклеази рестрикції AspS9 I (НПО «СибЭнзим», Росія). Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc). Розподіл генотипів за досліджуваними поліморфними локусами перевіряли на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга за допомо-

гою критерію χ^2 . Для оцінки достовірності відмінностей між групами використовували точний двосторонній критерій Фішера (для малих груп). Для усіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Під нашим спостереженням протягом 5 років були 45 осіб хворих на БА. При первинному обстеженні (2010-2011 рр.) була проаналізована частота поліморфних варіантів генів СС 16 серед хворих на БА та у групі популяційного контролю. У зразках ДНК 46 осіб, що входили до групи контролю, мутантний генотип GG не був виявлений, частота гетерозиготного генотипу AG склала 13% (6 осіб), частота гомозиготного генотипу AA становила 86,9% (40 осіб). У хворих на БА відповідні дані були такими: GG у 6,52% хворих (3 осіб), AG – 28,9% (13 осіб), генотип AA – 64,4% (29 осіб), тобто між частотами генотипів у групі контролю та у хворих на БА відмічається достовірна різниця ($p = 0,019$). При розгляді клінічних особливостей відмічено, що в групі з інтермітуючим перебігом БА 1 хворий мав генотип AG, 2 - GG; з легким

перебігом – 8 осіб мали генотип AG; з перебігом середньої тяжкості 4 обстежених – AG, 1- GG. Середня тривалість захворювання на момент первинного обстеження склала 6,5 роки. Спадкова схильність до виникнення БА відмічена у 70%. Переважна більшість осіб мали сенсibiliзацію до двох і більше алергенів, особливістю цих хворих була гіперчутливість до грибкових алергенів (найчастіше до групи Aspergillus), так в групі з гетерозиготою гену СС16 вказані прояви були у 6 осіб, з мутантною гомозиготою у 2 осіб, що є статистично достовірно при порівнянні з генотипом AA гену СС16 (табл.1). Серед супутньої патології звертає на себе увагу достовірна різниця за точним методом Фішера по кількості осіб, що мають прояви atopічного дерматиту (табл.1) при порівнянні груп з поліморфізмом гену СС 16. Так, серед носіїв генотипу GG 2 особи, що мають інтермітуючий перебіг хворіють на atopічний дерматит, серед носіїв генотипу AG - 4 особи. Насправді, вплив поліморфізму генів епітеліальних клітин легень (СС16) на ушкодження шкіри носить в літературних джерелах суперечливий характер.

Табл.1
Клінічні особливості перебігу БА в залежності від поліморфізму гену СС16

Наявність ознаки		Хворі на БА носії генотипу AA гену СС16, (n=29)	Хворі на БА носії алелю G гену СС16, (n=16)	p'
Мають прояви atopічного дерматиту	так	4	6	0,04
	ні	24	10	
Частіше користуються ІГКС	так	3	9	0,02
	ні	26	7	
Прояви грибкової сенсibiliзації	так	3	8	0,03
	ні	26	8	
		Хворі на БА носії генотипу AA гену СС16, (n=24)	Хворі на БА носії алелю G гену СС16, (n=16)	p*
Тяжкий перебіг БА	так	2	7	0,045
	ні	22	9	
Хронічний обструктивний бронхіт	так	1	6	0,032
	ні	23	10	

Під час перших оглядів проводилось аналізування лікарських засобів, що приймали хворі, яке показало, що особи, які були носіями генотипу AG або GG гену СС 16 частіше використовували інгаляційні глюкокортикостероїдні (ІГКС) препарати (табл.1). Це можна пояснити де в чому схожою дією на молекулярному рівні білків клітин Клара та глюкокортикоїдів. Відомо, що активація гену СС16 інгібує функцію ядерного фактору - $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) шляхом подавлення фосфорилування I κ B- β в епітеліальних клітинах дихальних шляхів, що в свою чергу призводить до зменшення запалення в легеневій тканині [7]. Глюкокортикостероїди, як і білки клітин Клара подавляють активність фосфоліпази А2, що призводить до гальмування утворення ряду медіаторів запалення – простагландинів, лейкотриснів та інших. Можливо, прийом стероїдних препаратів виконує, як би замісну функцію білків клітин Клара, що дозволяє хворим з генетичним поліморфізмом СС16 досягати стану ремісії. Отже, світові рекомендації, щодо профілактичного прийому ІГКС є важливою необхідністю для хворих на БА, особливо з поліморфізмом гену СС16. Незважаючи на частіший прийом

ІГКС, при повторному огляді (2015-2016), з'ясувалося що у 7 осіб, що у носіїв поліморфного алелю G (табл.1) відмічався тяжкий перебіг БА (кількість госпіталізацій, тривалість та частота загострень, показники зовнішнього дихання). Тоді як у групі носіїв генотипу AA (в яку ввійшли 24 попередньо обстежених особи) лише у 2 відмічались дані ознаки ($p = 0,045$). Також нашу увагу привернув той факт, що у 6 осіб носіїв алелі G (табл.1) в останній час був встановлений діагноз хронічного обструктивного бронхіту. З цих хворих двоє з генотипом GG первинно мали інтермітуючий перебіг, 1 з генотипом GG та 3 з генотипом AG – перебіг середньої тяжкості. У носіїв генотипу AA був лише 1 пацієнт з хронічним обструктивним бронхітом.

Висновок

У хворих на БА, котрі є носіями поліморфної алелі G гену СС16 відмічається несприятливий перебіг бронхолегеневих захворювань.

Література

1. Фрейдин М.Б. Генетика atopии: современное состояние / М.Б. Фрейдин, Е.Ю. Брагина, Л.М. Огородова [и др.] // Вестник ВО-Гис. – 2006. – Том 10, №3. – С. 492–503.

2. Sengler C. Clara cell protein 16 (CC16) gene polymorphism influences the degree of airway responsiveness in asthmatic children / C. Sengler, A. Heinzmann, S.P. Jerkic // J. Allergy Clin. Immunol. - 2003. - V. 111. №3. - P. 515-519.
3. Hay J.C. Human CC10 gene expression in airway epithelium and subchromosomal locus suggest linkage to airway disease / J.C. Hay, C. Danel, C.S. Chu [et al.] // Am J Physiol. - 1995. - V. 268. - P. 565-575.
4. Laing I. CC16: the A38G polymorphism is associated with airway responsiveness at one month and asthma at 6 years in children unselected for asthma / I. Laing, E. Eber, C. Hayden [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. - 1998. - V. 157. - P. 857.
5. Chen L.C. Evaluation of a common variant of the gene encoding clara cell 10 kd protein (CC10) as a candidate determinant for asthma severity and steroid responsiveness among Chinese children / L.C. Chen, H.M. Tseng, C.J. Wu [et al.] // J Asthma. - 2012. - V. 49(7). - P. 665-672
6. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. / за ред. проф. Кайдашева І.П. - Полтава : Полімет, 2003. - 320 с.
7. Laing A. A polymorphism of the CC16 gene is associated with an increased risk of asthma / A. Laing // J. Med. Genet. - 1998. - №35. - P. 463-467.

References

1. Frejdin M.B. Genetika atopii: sovremennoe sostojanie / M.B. Frejdin, E.Ju. Bragina, L.M. Ogorodova [i dr.] // Vestnik VOGiS. - 2006. - Tom 10, №3. - S. 492-503.
2. Sengler C. Clara cell protein 16 (CC16) gene polymorphism influences the degree of airway responsiveness in asthmatic children / C. Sengler, A. Heinzmann, S.P. Jerkic // J. Allergy Clin. Immunol. - 2003. - V. 111. №3. - P. 515-519.
3. Hay J.C. Human CC10 gene expression in airway epithelium and subchromosomal locus suggest linkage to airway disease / J.C. Hay, C. Danel, C.S. Chu [et al.] // Am J Physiol. - 1995. - V. 268. - P. 565-575.
4. Laing I. CC16: the A38G polymorphism is associated with airway responsiveness at one month and asthma at 6 years in children unselected for asthma / I. Laing, E. Eber, C. Hayden [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. - 1998. - V. 157. - P. 857.
5. Chen L.C. Evaluation of a common variant of the gene encoding clara cell 10 kd protein (CC10) as a candidate determinant for asthma severity and steroid responsiveness among Chinese children / L.C. Chen, H.M. Tseng, C.J. Wu [et al.] // J Asthma. - 2012. - V. 49(7). - P. 665-672
6. Metodi klinichnih ta eksperimental'nih doslidzhen' v medicini. / za red. prof. Kajdasheva I.P. - Poltava : Polimet, 2003. - 320 s.
7. Laing A. A polymorphism of the CC16 gene is associated with an increased risk of asthma / A. Laing // J. Med. Genet. - 1998. - №35. - P. 463-467.

Реферат

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА БЕЛКА КЛЕТОК КЛАРА (СС 16) НА ТЕЧЕНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ВЗРОСЛЫХ
Ляховская Н.В., Шлыкова О.А., Ляховский В.И.

Ключевые слова: бронхиальная астма, полиморфизм, белок клеток Клара.

Бронхиальная астма (БА) является распространенным заболеванием, на этиологию которого влияет много факторов. Определен ряд генов, которые ассоциируются с развитием БА, в том числе, ген белка клеток Клара. Однако до сих пор нет четкого представления о роли каждого гена, взаимодействии полиморфных генов и их влиянии на иммунный ответ в патогенезе БА. Целью нашей работы было изучить влияние полиморфизма гена белка клеток Клара (A38G), удельным весом 16 кДа, (СС16) на течение БА. Под нашим наблюдением в течение 5 лет находились 45 человек, больных БА. При анализе частоты полиморфизма гена СС16 у лиц, входивших в группу контроля, мутантный генотип GG не был обнаружен, частота гетерозиготного генотипа AG составила 13% (6 человек), частота гомозиготного генотипа AA составила 86,9% (40 человек). У больных БА соответствующие данные были следующими: GG в 6,52% больных (3 человека), AG - 28,9% (13 человек), генотип AA - 64,4% (29 человек), то есть между частотами генотипов в группе контроля и у больных БА отмечается достоверная разница (p = 0,019). У носителей полиморфной аллели G клиническими особенностями были: проявления атопического дерматита, грибковой сенсibilизации, частое использование ИГКС, тяжелое течение БА, хронический обструктивный бронхит.

Summary

INFLUENCE OF POLYMORPHISM OF CLARA CELL PROTEIN ON DEVELOPMENT OF BRONCHIAL ASTHMA

Lyakhovska N. V., Shlykova O. A., Lyakhovskiy V. I.

Key words: bronchial asthma, polymorphism, protein Clara cells.

Bronchial asthma (BA) is a common disease, whose aetiology is influenced by many factors. There has been identified a number of genes associated with the development of asthma, including protein gene Clara cells. However, there is still no clear picture of the role of each gene, the interaction of polymorphic genes and their effect on the immune response in the pathogenesis of asthma. The aim of our study was to examine the effect of the protein gene polymorphism Clara cells (A38G) specific weight of 16 kDa (SS16) for BA. 45 patients with asthma were under our observation for 5 years. The analysis of the frequency of the gene polymorphism SS16 in the persons of control group did not reveal a mutant genotype GG, the occurrence rate of heterozygous genotype AG made up 13% (6 people), the occurrence rate of the homozygous genotype AA was 86.9% (40 people). The patients with asthma demonstrated the following data: GG was in 6.52% of patients (3 people), AG was detected in 28.9% (13 people), and genotype AA was in 64.4% (29 people), i.e. there was a significant difference (p = 0.019) in the occurrence rate between the genotypes in the control group control and test group. The carriers of G alleles of polymorphic clinical features manifested atopic dermatitis, fungal sensitization, and frequent use of inhaled corticosteroids, severe asthma, and chronic obstructive bronchitis.