

© Коллектив авторов, 2006

М.В. Жданова¹, М.А. Богданова¹, А.Н. Войтович¹, О.М. Ащепкова²,
Е.Э. Журавская², Н.В. Трофимова², Г.А. Новик¹, В.И. Ларионова¹

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ГЕНОТИПАМИ ВСII-ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА

¹Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», ²ГУЗ «Детская городская больница №2 им. святой Марии Магдалины», г. Санкт-Петербург

Авторы сравнивали течение бронхиальной астмы (БА) у детей с различными генотипами генетического маркера BclI гена глюкокортикоидного рецептора. 485 детей с различной степенью тяжести БА были включены в исследование, из них легкая БА отмечалась у 101 ребенка (20,8%), среднетяжелая – у 261 (53,8%), тяжелая – у 123 (25,4%). Изучали данные анамнеза, аллергологического обследования и молекулярно-генетического анализа полиморфных вариантов BclI-маркера. Распределение аллелей и генотипов BclI-полиморфизма гена глюкокортикоидного рецептора не отличалось у детей с БА и контрольной группы, и соответствует показателям в популяциях западных стран. У девочек с тяжелым течением БА достоверно чаще встречался генотип GG, чем при легком течении заболевания. При сопоставлении течения заболевания и различных генотипов BclI-полиморфизма гена глюкокортикоидного рецептора выявлены клинико-функциональные особенности: более легкие клинические проявления БА у детей с генотипом CC в сравнении с детьми, имеющими G-аллель (генотипы CG и GG). Девочки имеют более тяжелое течение БА по сравнению с мальчиками, имеющими тот же генотип.

Authors performed comparative study of bronchial asthma (BA) clinical presentations in children with different genotypes of glucocorticoid receptor gene BclI. 485 children with different BA severity were examined, including 101 patients (20,8%) with mild BA, 261 children (53,8%) with moderate BA and 123 children (25,4%) with severe BA. Examination included study of anamnestic data, allergologic methods and molecular genetic analysis of BclI marker polymorph variants. There were no difference in distribution of BclI alleles and phenotypes in children with BA and in control group and these results were similar with data of population studies in western countries. Rate of GG phenotype was significantly higher in female patients with severe BA in comparison with patients with mild BA. Analysis of relations between BA severity and different BclI genotypes showed that patients with CC genotype had more mild BA clinical presentations than patients with G-allele (CG and GG genotypes). BA presentations were more severe in female patients than in male patients with the same genotype.

Известно, что заболеваемость бронхиальной астмой (БА) в детской популяции составляет 5–10% [1]. Исходя из ведущей роли воспаления в патогенезе БА, лечение предусматривает использование глюкокортикоидных гормонов (ГКГ), как наиболее эффективных противовоспалительных средств. ГКГ, связываясь со специфическим цитоплазматическим глюкокортикоидным рецептором (ГКР), влияют на функциональное состояние клетки. Ген, кодирующий ГКР, локализован на хромосоме 5 (5q31) [2], состоит из 777 аминокислот (α -форма) или из 742 (β -форма, образующаяся при альтернативном сплайсинге), обладающих молекулярной массой 94 и 90 kDa соответственно. Ген состоит из 9 экзонов, кодирующих 3 характерных домена белка: структурный N-терминальный домен, отвечающий за функцию трансактивации; центральный домен, связывающийся с ДНК, и

C-терминальный домен, связывающий лиганд. Существуют данные, свидетельствующие об ассоциации изменений в гене, кодирующем ГКР, с нарушением функции сердечно-сосудистой системы, метаболическими расстройствами, злокачественными изменениями крови при острой лейкемии, миеломе) и резистентностью к ГКГ. Эти изменения могут быть связаны с различными генетическими вариантами гена (мутациями и полиморфизмами). Для гена, кодирующего ГКР, известно около двух десятков полиморфизмов, из них подавляющее число имеют частоту редкого аллеля 7% или менее. Наиболее хорошо изучен BclI генетический маркер этого гена [3].

BclI-полиморфизм расположен в интроне, вне кодирующего или сплайсингового участков гена ГКР, и не имеет явного влияния на процессинг пре-мРНК, и функциональная роль данного поли-

морфизма не ясна [4]. Предположительно он не влияет на аффинность рецептора, но может приводить к тканеспецифическим различиям в экспрессии [5]. Возможно, что этот полиморфизм связан с функционально значимыми изменениями в промоторном или 3 нетранслируемых участках гена ГКР [4]. Кроме того, VcII-полиморфизм также может быть связан с изменениями в двух ранее неизвестных экзонах данного гена (1A и 1B) или в двух промоторах, открытых недавно [6].

Различные независимые клинические исследования предполагают связь этого полиморфизма с гиперинулинемией [7], ожирением [8–10], индексом массы тела [4], повышенными уровнями холестерина и липопротеидов низкой плотности [11], эссенциальной гипертензией [12], гиперчувствительностью гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы к глюкокортикоидам (ГК) [13], глюкокортикоид-зависимой вазоконстрикцией [5]. Не исключается связь со степенью тяжести посттравматических стрессорных расстройств [14].

Несмотря на известное влияние ГК на все этапы воспаления, в том числе и аллергического, требует дополнительного исследования вопрос о связи мутаций и полиморфизмов в гене, кодирующем ГКР, с чувствительностью и резистентностью к терапии ГКГ.

При изучении литературы по исследованиям VcII-полиморфизма гена ГКР нам не встретились данные по оценке роли VcII-полиморфизма при бронхолегочной патологии и по возможной ассоциации с тяжестью течения БА, с дозами ингаляционных глюкокортикостероидов (ИГКС), используемых в терапии.

Цель исследования – сравнение клинико-анамнестических данных, течения БА у детей с различными генотипами генетического маркера VcII гена ГКР.

Материалы и методы исследования

Обследовано 485 детей, больных БА: 396 мальчиков и 89 девочек из числа находившихся на обследовании и лечении в аллергологическом отделении ДГБ №2 им. Св. Марии Магдалины г. Санкт-Петербург. Возраст обследованных составил от 2 до 17 лет (средний возраст 12,7 лет). Диагностику БА осуществляли на основании критериев, предложенных международными согласительными документами [15]. Степень тяжести основывалась на общепринятой классификации [1]. В данной группе легкая БА отмечалась у 101 ребенка (20,8%), среднетяжелая – у 261 (53,8%), тяжелая – у 123 (25,4%). В зависимости от тяжести течения и периода БА больные получали комбинированные препараты (будесонид+форматерол – беродуал, тиказон+сальматерол+серетид – симбикорт) или ингаляционные β_2 -адреномиметики короткого (сальбутамол, фенотерол) и длительного действия (сальметрол – серевент, форматерол –

оксис, форадил), системные ГКГ (преднизолон) или ИГКС (беклометазон – бекотид, беклодент, альвиедин, беклазан; бодесонид – пульмикорт, будесонид; флутиказон – фликсотид), кромоны (кромогликеевая кислота – кромогексал, кромоген, интал; недокромил – тайлед), метилксантины (эуфиллин, теофиллин).

В качестве контрольной была выбрана группа из практически здоровых детей (78 мальчиков и 73 девочки) в возрасте от 4 до 17 лет (средний возраст 12,5 лет).

Использовали следующие методы обследования детей: аллергологические (сбор аллергологического анамнеза, постановка скарификационных проб с неинфекционными аллергенами, постановка ингаляционных провокационных проб (ИПП) с гистамином и дистиллированной водой, проба с постоянной физической нагрузкой на велоэргометре), функциональные (оценка функции внешнего дыхания на компьютерном спирографе), иммунологические (определение содержания общего IgE в сыворотке крови).

Выделение ДНК осуществляли модифицированным фенольно-хлороформным методом из лейкоцитов периферической крови. Молекулярно-генетический анализ полиморфных вариантов VcII-полиморфизма гена ГКР проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом. Этот полиморфизм обусловлен заменой гуанина на цитозин в 647 положении во втором интроне этого гена. В результате этой замены (TGATCA на TCATCA) формируется сайт рестрикции для эндонуклеазы Ksp 221 [16]. В большинстве работ полиморфизм определяется на сенс-цепи, в этом случае С меняется на G [4]. ПЦР проводили на автоматическом термоциклере MJ (MJ Research Inc) с использованием термостабильной рекомбинантной Taq полимеразы фирмы «Сибэнзим» (Россия).

Для ПЦР анализируемого участка гена ГКР были выбраны следующие праймеры:

F 5' AAATTgAAgCTTAACAATTTTggC 3' и R 5' gCAgTgAACAgTgTACCAgACC 3'.

40 циклов амплификации проводили в конечном объеме 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг геномной ДНК, 250 пкмоль каждого праймера, 10мМ Tris-HCl pH 8,4, 0,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 0,2 мМ каждого dNTP и одну единицу Taq полимеразы. ПЦР включала 30 с – денатурация при 94 °С, 30 с – отжиг при 59 °С и 45 с – синтез при 72 °С. Длина фрагмента, нарабатываемого в результате ПЦР, – 206 п.н.

Для генотипирования продукты ПЦР рестрицировали Ksp 22I («Сибэнзим», Россия, E081, E082), после чего анализировали в 2,5% агарозном геле. Имеют место аллель С, имеющий Ksp 22I рестрикционный сайт, и аллель G, не несущий сайта для Ksp 22I. При комбинации этих аллелей формируются 3 генотипа: GG (206 п.н.); CG (206 п.н., 116 п.н., 90 п.н.); CC (116 п.н., 90 п.н.) (рис. 1).

Обработка результатов исследования проведена при помощи программы SPSS версии 11.0.1 с использованием следующих методов статистической обработки: кри-

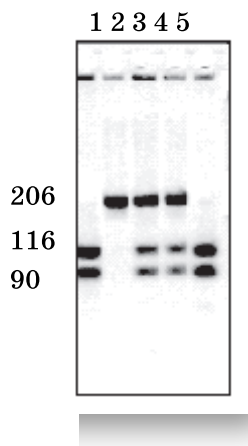


Рис. 1. С+647G полиморфизм гена глюкокортикоидного рецептора.

1, 5 – гомозигота СС (116 п.н., 90 п.н.); 2 – гомозигота GG (206 п.н.); 3, 4 – гетерозигота CG (206 п.н., 116 п.н., 90 п.н.).

терий χ^2 , критерий Фишера, непараметрический тест Манна–Уитни.

Результаты и их обсуждение

Распределение аллелей и генотипов VcII-полиморфизма гена ГКР не отличалось в группах детей с БА и контрольной группе и совпало с соответствующими показателями в популяциях западных стран (рис. 2). Генотип GG достоверно чаще ($p < 0,001$) встречался у девочек с тяжелым течением БА, чем с легким течением заболевания. Других различий между частотой аллелей генотипов VcII-полиморфизма гена ГКР у детей, больных БА разной степени тяжести, не отмечалось (рис. 3). Различий в распределении аллелей и генотипов в зависимости от пола также найдено не было (рис. 3).

У детей, носителей более распространенного генотипа СС, отмечались следующие особенности течения БА. При оценке эффективности терапии за год, предшествующий госпитализации, хоро-

ший эффект наблюдался в большей степени у девочек с генотипом СС по сравнению с CG ($p = 0,05$). Более низкий уровень IgE (до 100 ед) был выявлен в группе девочек с генотипом СС по сравнению с CG ($p = 0,03$). При выписке девочек из стационара средние дозы ИГКС (по беклометазону) использовались у большего количества детей с генотипом СС, чем у детей с генотипом GG ($p = 0,02$). При выписке детей после обострения заболевания в группе девочек с генотипом СС чаще рекомендовалась комбинированная терапия ИГКС и пролонгированным адреномиметиком постоянно, чем девочкам с генотипом CG ($p = 0,03$). Отмечены различия в параметрах спирометрии на фоне обострения БА у мальчиков: значения форсированной жизненной емкости легких (FVC%) были выше ($p = 0,04$), а значения индекса Генслера (FEV_1/FVC) – ниже ($p = 0,02$) в группе с генотипом СС по сравнению со значениями при генотипе CG. При разделении детей на группы по генотипам и степеням тяжести БА отмечено, что при БА средней тяжести и генотипе СС процент детей, получивших при выписке средние дозы ИГКС, был выше по сравнению с остальными ($p = 0,03$). В группе детей с легкой БА при генотипе СС низкий уровень IgE (до 100 ед) отмечался чаще, чем при генотипе CG ($p = 0,02$). При легкой БА отрицательная проба с дозированной физической нагрузкой была чаще у детей с генотипом СС, чем с генотипом CG ($p = 0,05$).

Дети, гетерозиготные носители аллеля G, характеризовались следующими особенностями. В группе мальчиков с бытовой и эпидермальной сенсибилизацией достоверно чаще встречались носители генотипа CG, чем гомозиготы по аллелю G (генотип GG) ($p = 0,03$). По результатам пробы с дозированной физической нагрузкой отрицательная проба отмечалась достоверно у большего количества мальчиков с генотипом CG, чем у имеющих генотип СС ($p = 0,02$), однако положительная проба при нагрузке 2 Вт/кг отмечалась у мальчиков-но-

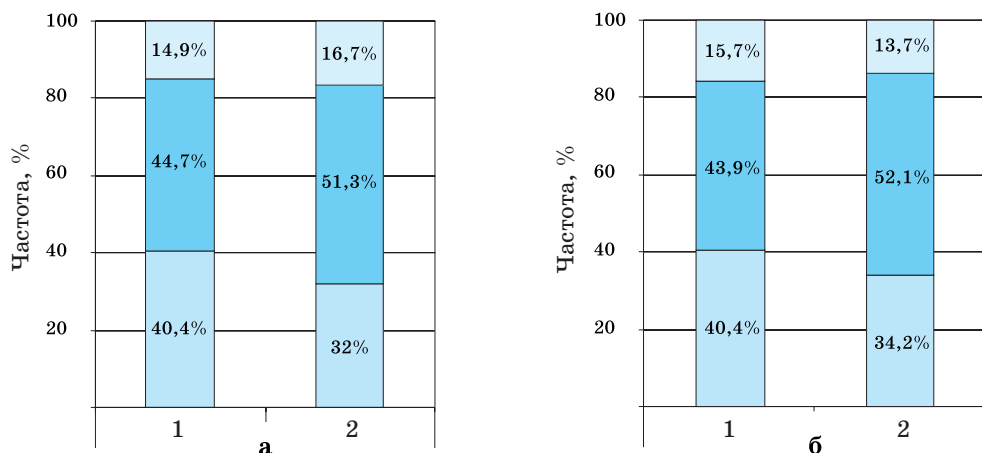


Рис. 2. Распределение генотипов VcII-полиморфизма гена ГКР у мальчиков (а) и девочек (б) с БА. 1 – бронхиальная астма, 2 – контроль; здесь и на рис. 3: верхняя часть столбика – GG, средняя – CG, нижняя – СС.

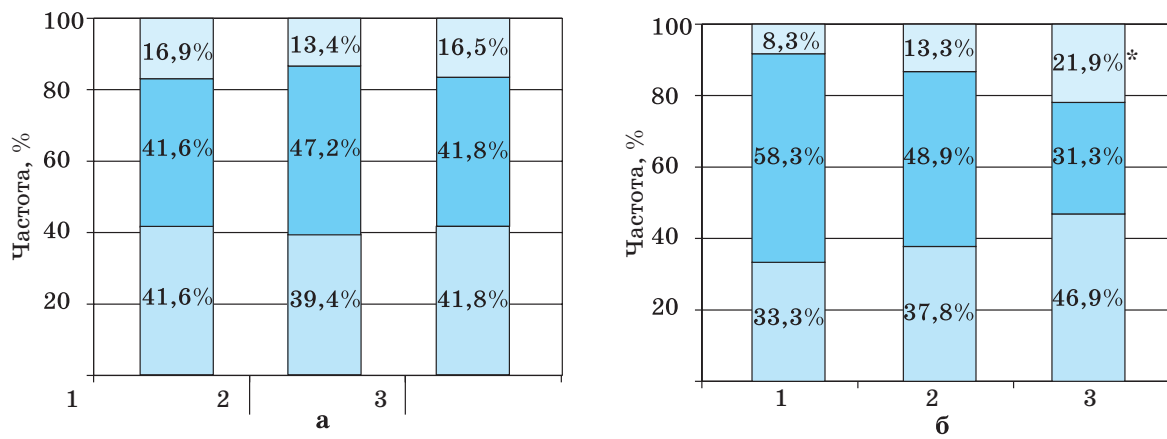


Рис. 3. Распределение генотипов BclI-полиморфизма гена ГКР у мальчиков (а) и девочек (б) с БА в зависимости от степени тяжести заболевания.

* $p < 0,001$ при сравнении с легкой БА; 1 – легкая БА, 2 – среднетяжелая БА, 3 – тяжелая БА.

сителей генотипа CG в меньшем количестве случаев в сравнении с носителями генотипов CC ($p=0,03$) и GG ($p=0,02$). Отмечены различия в параметрах спирометрии на фоне обострения БА у мальчиков: значения FEV_1/FVC ниже у детей с генотипом GG по сравнению со значениями при генотипе CC и CG ($p=0,05$ в обоих случаях). При БА средней степени тяжести положительная ИПП с гистамином чаще отмечалась у детей с генотипом CG, чем с генотипом CC ($p=0,03$).

Дети, носители генотипа GG, имели следующие отличия течения БА от детей с другими генотипами. Длительность терапии ИГКС, равная 4–6 месяцам, достоверно чаще наблюдалась в группе мальчиков-носителей генотипа GG по сравнению с таковой у мальчиков с генотипами CG и CC ($p=0,005$ и $p=0,03$ соответственно). Высокие дозы ИГКС при выписке назначались чаще девочкам с генотипом GG, чем с генотипом CC ($p=0,04$). Длительность терапии ИГКС при постоянном приеме, равная 1–3 годам и 4–6 месяцам в группе детей с тяжелой БА и генотипом GG, отмечалась чаще по сравнению с детьми с генотипом CC ($p=0,003$ и $p=0,002$ соответственно).

При сравнении течения БА у девочек и мальчиков были выявлены следующие особенности. Необходимость при выписке после обострения БА и вне его в комбинированной терапии ИГКС и пролонгированным адреномиметиком у детей с генотипом CC распределилась следующим образом: у мальчиков чаще назначалась курсовая терапия, у девочек – постоянный прием ($p=0,02$). У детей с гетерозиготным генотипом (CG) различались уровни IgE: средний (100–500 ед) и высокий (500–1000 ед) чаще встречался у девочек, чем у мальчиков ($p=0,04$ и $p=0,04$ соответственно). У девочек с генотипом GG достоверно чаще отмечалась необходимость в использовании при обострении

БА адреномиметиков через небулайзер, чем у мальчиков-носителей того же генотипа ($p=0,03$). В группах с генотипом GG большее количество мальчиков выписывали на средних дозах ИГКС, чем девочек, в то время как высокие дозы ИГКС при выписке назначались большему количеству девочек ($p=0,03$ и $p=0,02$ соответственно). У девочек и мальчиков в группе с генотипом GG различаются на фоне обострения БА такие параметры функции внешнего дыхания, как максимальные объемные скорости ($FEF50\%$, $FEF25\%$, $FEF25-75\%$): все эти значения были выше у девочек ($p=0,01$; $p=0,03$ и $p=0,03$ соответственно).

Полученные данные позволяют предполагать связь генотипов BclI-полиморфизма гена ГКР с различиями в течении БА. Так, для детей с генотипом CC более характерными оказались следующие показатели: низкий уровень IgE; низкая частота положительного теста с дозированной физической нагрузкой; более легкие обострения БА, сопровождающиеся умеренным снижением $FVC\%$; лучший ответ на проводимую терапию ИГКС (по оценке эффективности терапии за год, предшествующий обследованию) и более частая возможность использования малых и средних доз ИГКС для контроля течения БА (контролируемая БА). У мальчиков с генотипом CC попытка уменьшения дозы или полной отмены ИГКС не приводила к обострению БА.

Для детей с гетерозиготным генотипом CG были выявлены следующие особенности: высокий уровень IgE; большая частота положительных тестов (кожно-скарификационные пробы, IgE-специфические антитела), подтверждающих бытовую и эпидермальную сенсибилизацию. Достоверно чаще выявлялась положительная ИПП с гистамином и у части детей – положительная проба с дозированной физической нагрузкой при нагрузке 2 Вт/кг. У детей с генотипом GG более существен-

но снижались значения FVC% в периоде обострения БА по сравнению с детьми с генотипом СС.

И, наконец, дети-носители генотипа GG характеризовались высоким уровнем IgE; более тяжелыми обострениями БА (особенно у девочек), потребовавшими обязательного и длительного использования адrenomиметиков (беродуал и др.) через небулайзер для купирования обострения; в периоде обострения БА самыми низкими значениями FEV₁/FVC и более длительным использованием высоких доз ГКС (пульмикорт через небулайзер, парентерально, *per os*) для достижения стабилизации состояния. Использовались высокие дозы ИГКС для контроля течения БА и более длительный их прием (более 1–3 лет). Более тяжелое течение БА отмечалось у девочек, что потребовало назначения высоких доз ИГКС.

Заключение

Таким образом, при сопоставлении течения БА и генотипов BclI-полиморфизма гена ГКР выявлены следующие клинико-функциональные особенности: у девочек с тяжелым течением БА достоверно чаще встречался генотип GG, чем при легком течении заболевания; полученные результаты свидетельствуют о наличии тенденции к более легким клиническим проявлениям БА у детей с гомозиготным по аллелю С генотипом (СС) в сравнении с детьми, имеющими G-аллель (генотипы CG и GG); различается течение БА у девочек и мальчиков, носителей одного генотипа, причем девочки имеют более тяжелое течение БА по сравнению с мальчиками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Национальная Программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» – М., 1997.
2. Encio I.J., Detera-Wadleigh S.D. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266. – P. 7182–7188.
3. Bray P.J., Cotton R.G.H. Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathologic and in vitro mutation and polymorphisms. // *Hum. Mutat.* – 2003. – Vol. 21. – P. 557–568.
4. Van Rossum E.F.C., Koper J.W., van den Beld A.W. et al. Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo, and body mass index. // *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. – 2003. – Vol. 59. – P. 585–592.
5. Panarelli M., Holloway C.D., Fraser R. et al. Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1998. – Vol. 83. – P. 1846–1852.
6. Breslin M.B., Geng C.D., Vedeckis W.V. Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids. // *Mol. Endocrinol.* – 2001. – Vol. 15. – P. 1381–1395.
7. Weaver J.U., Hitman G.A., Kopelman P.G. An association between a BclI restriction fragment length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women. // *J. Mol. Endocrinol.* – 1992. – Vol. 9. – P. 295–300.
8. Buemann B., Vohl M.C., Chagnon M. et al. Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus. // *Obes. Res.* – 1997. – Vol. 5. – P. 186–192.
9. Ukkola O., Perusse L., Chagnon Y.C. et al. Interactions among the glucocorticoid receptor, lipoprotein lipase and adrenergic receptor genes and abdominal fat in the Quebec Family Study. // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* – 2001. – Vol. 25. – P. 1332–1339.
10. Tremblay A., Bouchard L., Bouchard C. et al. Long-term adiposity changes are related to a glucocorticoid receptor polymorphism in young females. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – Vol. 88, №7. – P. 3141–3145.
11. Ukkola O., Rosmond R., Tremblay A. et al. Glucocorticoid receptor BclI variant is associated with an increased atherogenic profile in response to long-term overfeeding. // *Atherosclerosis.* – 2001. – Vol. 157. – P. 221–224.
12. Watt G.C., Harrap S.B., Foy C.J. et al. Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corners approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. // *J. Hypertens.* – 1992. – Vol. 10. – P. 473–482.
13. Rosmond R., Chagnon Y.C., Holm G. et al. A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. // *Obes. Res.* – 2000. – Vol. 8. – P. 211–218.
14. Bachmann A.W., Sedgley T.L., Jackson R.V. et al. Glucocorticoid receptor polymorphisms and post-traumatic stress disorder. // *Psychoneuroendocrinology.* – 2005. – Vol. 30, №3. – P. 297–306.
15. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (GINA). Пересмотр 2002. / Под ред. А.Г. Чучалина: Пер. с англ. – М.: Атмосфера, 2002.
16. Fleury I., Patrick Beaulieu P., Primeau M. et al. Characterization of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene. // *Clin. Chem.* – 2003. – Vol. 49, №9. – P. 1528–1531.