

УДК 616.248:575.224.234-053.2/6

МАЛАЯ Н.К., КАЛАДЗЕ Н.Н., МАЛЫЙ К.Д.

ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского», г. Симферополь

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ СЕКРЕТОГЛОБИНА SCGB1A1 И РАЗВИТИЕ ЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ У ДЕТЕЙ

**Резюме.** Цель исследования — изучение генетического полиморфизма A(38)G первого экзона секретоглобина SCGB1A1 у детей крымской популяции и выяснение возможной взаимосвязи между степенью полиморфизма и развитием патологии легких (бронхиальной астмы и рецидивирующего бронхита). Исследовались образцы ДНК, полученные от детей, страдающих бронхиальной астмой (75 человек), рецидивирующим бронхитом (19 детей) и здоровых (20 детей), в возрасте от 6 до 16 лет. Исследование генетического полиморфизма проводилось с помощью полимеразной цепной реакции методом аллельной дискриминации с регистрацией результатов с помощью электрофореза. Частоты аллельных сочетаний генетических вариантов исследованного полиморфизма у больных бронхиальной астмой, рецидивирующим бронхитом и в контрольной группе отличаются между собой. Так, среди больных бронхиальной астмой частота носителей гомозиготного варианта AA ниже, а среди больных рецидивирующим бронхитом выше, чем в контрольной группе. Частота гетерозигот AG, наоборот, была выше среди больных бронхиальной астмой, чем у больных рецидивирующим бронхитом и в контрольной группе. Также среди больных рецидивирующим бронхитом частота гетерозигот AG существенно ниже, чем гомозигот. Полученные результаты возможно использовать в прогностических целях для оценки перспектив развития синдрома обструкции.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, дети, генетический полиморфизм, секретоглобин SCGB1A1.

Бронхиальная астма (БА) в связи с достаточной широкой распространенностью (в некоторых странах страдает до 1–18 % популяции [1, 2]) и ростом в последние годы (до 2–2,5 раза [1, 3]) по-прежнему является одной из глобальных проблем здравоохранения. Проблема особенно актуальна для педиатрии в связи с более тяжелыми по сравнению со взрослыми пациентами течением и последствиями болезни [2, 5]. Для Украины проблема также сохраняет актуальность в связи с тем, что в нашей стране среди детей заболеваемость БА, по ряду оценок, достигает 15 % [4, 5].

Развитие симптомокомплекса бронхиальной астмы — типичного мультифакториального заболевания — зависит от сочетанного влияния многих факторов, обеспечивающих функционирование слизистой респираторного тракта [6–8]. Продукт секреции клеток Клара — секретоглобин SCGB1A1 (утероглобин CC16) — один из таких факторов, влияющих на функционирование слизистой, генетический полиморфизм

которого ассоциируется с развитием данной патологии. Эта белковая молекула с небольшим молекулярным весом (16 тыс. D), синтезируемая у млекопитающих эпителиальными клетками дистальных бронхиол (клетками Клара), существует в виде гомодимера, с двумя дисульфидными связями между субъединицами, и обладает выраженным иммуномодулирующим и противовоспалительным действием [9, 10]. Ген секретоглобина SCGB1A1, длиной 4172 нуклеотида, расположен в 11-й хромосоме (11q12.2) и содержит три экзона [11, 12], первый из экзонов, нетранслируемый, входит в состав так называемого downstream promoter element (DPE). Для гена секретоглобина описано несколько видов полиморфизма, один из которых — A(38)G (замена А на G в 38-м положении первого экзона) — ассоциируется с повышенной вероятностью

© Малая Н.К., Каладзе Н.Н., Малыш К.Д., 2014

© «Здоровье ребенка», 2014

© Заславский А.Ю., 2014

стью развития БА [12–14]. В связи с тем, что степень генетического полиморфизма в различных этногеографических группах населения может довольно значительно различаться, целью настоящего исследования и явилось определение степени полиморфизма A(38)G гена SCGB1A1 у детей в крымской популяции для выяснения возможной взаимосвязи между степенью данного полиморфизма и развитием БА.

## Материалы и методы

Исследовались образцы ДНК, полученные от детей, страдающих бронхиальной астмой, рецидивирующим бронхитом (РБ) и здоровых. Всего на настоящий момент обследовано 114 детей в возрасте от 6 до 16 лет (средний возраст  $12,4 \pm 3,0$  года).

Группа больных БА составила 75 человек (51 мальчик (68 %), 24 девочки (32 %)). Из них 63 % больных (47 детей) находились в состоянии ремиссии и 37 % (28 детей) — в состоянии обострения. У 38 пациентов (51 %) диагностирована интермиттирующая БА, у 26 пациентов (34,5 %) — легкая персистирующая БА, у 11 (14,5 %) — средней тяжести персистирующая БА. Диагноз ставился в соответствии с протоколом диагностики и лечения БА [8].

Группа больных рецидивирующим бронхитом без эпизодов обструкции составила 19 человек, а контрольная группа здоровых детей без пульмонологической патологии — 20 человек.

Образцы ДНК для исследования выделяли из периферической крови и слюны обследуемых методом фенол-хлороформной экстракции [15].

Исследование A(38)G-полиморфизма проводилось с помощью полимеразной цепной реакции методом аллельной дискриминации в соответ-

ствии с работой [16], с использованием системы из трех праймеров — двух прямых аллелеспецифических, различающихся по 3-концевому нуклеотиду: прямой 1 5'CAgAgACggAACCAgAgACA, прямой 2 5'AgAgACggAACCAgAgACg, и общего обратного праймера 5'TCCTgAgAgTTCCTAAgTCC. Синтез праймеров осуществлен в НПФ «Синтол», Россия.

Полимеразная цепная реакция проводилась в объеме 25 мкл в двух пробирках, в одной из которых находился прямой праймер 1 и обратный праймер, во второй — прямой праймер 2 и обратный праймер. После проведения амплификации и последующего электрофореза в 3% агарозном геле в присутствии бромистого этидия проводилась детекция результатов амплификации в ультрафиолетовом свете [17]. У гомозигот эффективная амплификация происходила только в одной из пробирок, что регистрировалось по наличию флуоресцирующей зоны в одном из амплифицированных образцов, у гетерозигот эффективная амплификация происходила в обеих пробирках и флуоресцирующие зоны регистрировались в обоих образцах. Вычислялись частоты аллелей и частоты аллельных сочетаний и их соответствие равновесию Харди — Вайнберга по критерию  $\chi^2$  с расчетными, отвергая нулевую гипотезу при  $P < 0,05$  [18, 19].

## Результаты и обсуждение

Частоты встречаемости аллельных вариантов A(38)G у различных групп обследованных детей приведены в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что во всех группах обследованных более распространена аллель G, составляющая 63–69 %, в то время как аллель A составила 31–37 %. Достоверные различия в ча-

Таблица 1. Частоты аллельных вариантов у пациентов и в контрольной группе

Вариант	Больные БА		Больные РБ		Здоровые		$\chi^2$ Больные БА/здо- ровые	$\chi^2$ Больные РБ/здо- ровые	$\chi^2$ Больные БА/боль- ные РБ
	К-во слу- чаев	Частота аллели	К-во слу- чаев	Частота аллели	К-во слу- чаев	Частота аллели			
Аллель А	47	0,3133	14	0,3684	14	0,3500	0,0038	0,0009	0,0082
Аллель G	103	0,6867	24	0,6316	26	0,6500	0,0021	0,0005	0,0048
Всего	150	1,0000	38	1,0000	40	1,0000			

Таблица 2. Частоты аллельных сочетаний области A(38)G первого экзона гена SCGB1A1 в группах пациентов с бронхиальной астмой, рецидивирующим бронхитом и в контрольной группе

Аллель- ное соче- та- ние	Больные БА (n = 75)				Больные РБ (n = 19)				Здоровые (n = 20)			
	Частота			$\chi^2$ Набл./ ожд.	Частота			$\chi^2$ Набл./ ожд.	Частота			$\chi^2$ Набл./ ожд.
	Набл.		Ожд.		Набл.		Ожд.		Набл.		Ожд.	
	Абс.	Доля		Абс.	Доля	Абс.		Доля				
AA	4	0,0533	0,0982	0,0205	6	0,3158	0,1357	0,2390**	3	0,1500	0,1225	0,0062
AG	39	0,5200	0,4303	0,0187	2	0,1053	0,4654	0,2786**	8	0,4000	0,4550	0,0066
GG	32	0,4267	0,4715	0,0043	11	0,5789	0,3989	0,0812*	9	0,4500	0,4225	0,0018
Всего	75	1,0000	1,0000		19	1,0000	1,0000		20	1,0000	1,0000	

Примечание: различия достоверны с вероятностью: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ .

стотах встречаемости аллелей А и G исследованного локуса в исследованных группах не выявлены, хотя и наблюдается некоторая тенденция.

Из данных табл. 2 видно, что частоты встречаемости аллельных вариантов в группе больных бронхиальной астмой и в контрольной группе статистически не отличаются от ожидаемых величин, т.е. равновесие Харди — Вайнберга внутри этих групп не нарушено. Однако в группе больных рецидивирующим бронхитом наблюдаются значительные достоверные различия между наблюдаемыми и ожидаемыми частотами встречаемости всех аллельных вариантов. Так, частоты гомозиготных аллельных сочетаний как АА, так и GG значительно увеличены, а гетерозиготное аллельное сочетание AG встречается чрезвычайно редко. Практически 90 % пациентов, при ожидаемых 44 %, в этой группе демонстрируют гомозиготное состояние.

Из данных табл. 3 видно, что по частоте аллельных сочетаний наблюдаются выраженные различия. Наименее выражены различия между больными с бронхиальной астмой и контрольной группой. Достоверные различия наблюдаются только по аллельному сочетанию АА, которое у пациентов с астмой встречалось достоверно реже. Гораздо более выражены различия между группой больных рецидивирующим бронхитом и контрольной группой и особенно между группами больных бронхиальной астмой и рецидивирующим бронхитом — частота встречаемости гомозиготного аллельного сочетания АА значительно выше, а гетерозиготного AG — значительно ниже. Значительно выраженные различия между группами больных бронхиальной астмой и рецидивирующим бронхитом проявляются также в частотах гомозиготного аллельного сочетания GG, достоверно более частого у пациентов с рецидивирующим бронхитом, в то время как разница при сравнении с контрольной группой недостоверна.

Из сопоставления данных табл. 1–3 видно, что хотя по частоте аллелей выраженных различий между исследованными группами нет, с некоторой недостоверной тенденцией большей встречаемости аллели А у пациентов с рецидивирующим бронхитом и в контрольной группе по сравнению с больными бронхиальной астмой и

при отсутствии достоверных различий в частотах встречаемости аллельных сочетаний в контрольной группе и у больных бронхиальной астмой, в группе пациентов с рецидивирующим бронхитом регистрируются значительные отличия в частотах аллельных сочетаний от равновесных, т.е. имеет место значительное нарушение равновесия Харди — Вайнберга. То, что носители гетерозиготного варианта AG встречаются в группе пациентов с рецидивирующим бронхитом настолько редко, может быть либо следствием сниженной жизнеспособности их носителей (что требует исследования достаточно больших выборок), либо результатом неоднородности самой исследуемой группы, множественных причин возникновения данного патологического состояния, а также небольшого количества случаев в исследованной выборке.

Различия в частотах встречаемости аллельных сочетаний становятся особенно выраженными при сравнении между исследованными группами. Наиболее выражены различия в частоте встречаемости гомозиготного варианта АА — частота достоверно выше у пациентов с рецидивирующим бронхитом и достоверно ниже у пациентов с бронхиальной астмой по сравнению с контрольной группой. Между группами пациентов с бронхиальной астмой и контрольной группой по другим аллельным сочетаниям достоверных различий нет. Но у группы пациентов с рецидивирующим бронхитом наблюдаются весьма высокие различия по частотам всех трех аллельных сочетаний как с контрольной группой, так и особенно с группой пациентов с бронхиальной астмой. В данном случае, как и при анализе отклонения частот аллельных сочетаний от равновесного, это может быть следствием небольшого числа случаев в исследованной выборке, а также может являться результатом этиопатогенетической неоднородности случаев внутри самой выборки. Так или иначе, обнаруженное явление нуждается, на наш взгляд, в дальнейшем исследовании.

Выше отмечалось, что в группе пациентов с бронхиальной астмой частота аллели А несколько ниже, а частота гомозиготного аллельного сочетания АА достоверно ниже, чем аналогичные показатели в контрольной группе, то есть из при-

**Таблица 3. Сравнение частот аллельных сочетаний области A(38)G гена SCGB1A1 между группами пациентов с бронхиальной астмой, рецидивирующим бронхитом и контрольной группой**

Аллельное сочетание	Пациенты с БА	Пациенты с РБ	Контроль	$\chi^2$ Больные БА/ здоровые	$\chi^2$ Больные РБ/ здоровые	$\chi^2$ Больные БА/ больные РБ
AA	0,0533	0,3158	0,1500	0,0623*	0,1833**	0,2182**
AG	0,5200	0,1053	0,4000	0,0360	0,2171**	1,6332**
GG	0,4267	0,5789	0,4500	0,0012	0,0369	0,0400*
Всего	1,0000	1,0000	1,0000			

**Примечание:** различия достоверны с вероятностью: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ .

веденных данных видно, что однонуклеотидный A(38)G-полиморфизм взаимосвязан с заболеваемостью бронхиальной астмой. Это согласуется с известными литературными данными, показывающими, что A(38)G-полиморфизм ассоциирован с возникновением и течением ряда патологических состояний, в патогенезе которых играет роль иммунная система. Так, отмечалось, что указанный полиморфизм, кроме влияния на заболеваемость и течение астмы, ассоциируется также с заболеваемостью саркоидозом [16], атопическим дерматитом [20], онкопатологией [9, 21] и др.

Относительно встречаемости различных полиморфных вариантов A(38)G-полиморфизма в популяции в литературе существует ряд противоречивых мнений. Так, в ряде работ [22] не было обнаружено взаимосвязи между развитием патологического процесса и данным видом полиморфизма, в ряде работ такая взаимосвязь обнаруживалась, однако характер генетической изменчивости наблюдался разный: в работе [23] у пациентов с бронхиальной астмой частота гомозиготного аллельного сочетания AA была выше, в то время как в работах [24, 25] регистрировалась обратная картина. Более однозначные данные касались взаимосвязи между аллельными вариантами A(38)G, уровнем секретоглобина SCGB1A1 и тяжестью астматических проявлений — гомозиготы AA имели меньший уровень циркулирующего секретоглобина и более тяжелое течение астмы [12, 25]. Также в литературе неоднократно отмечалось, что степень A(38)G-полиморфизма гена секретоглобина отличается в различных этногеографических популяциях [16, 23, 25]. Не исключено, что как популяционные различия, так и различия в оценке тяжести и особенностей течения астматического процесса могут влиять на получаемые результаты. Обнаруженные нами особенности A(38)G-полиморфизма у детей, больных бронхиальной астмой, говорят о перспективности данного направления исследований, продолжение которого с учетом тяжести процесса, а также во взаимосвязи с уровнем циркулирующего секретоглобина SCGB1A1 (утероглобина CC16) позволит лучше понять природу воспалительного процесса и возможности влияния на него при бронхиальной астме.

## Выводы

1. В крымской популяции регистрируется A(38)G-полиморфизм в первом экзоне секретоглобина SCGB1A1.

2. Частоты аллельных сочетаний генетических вариантов данного полиморфизма отличаются у больных бронхиальной астмой, рецидивирующим бронхитом и в контрольной группе. Частота гомозигот AA среди больных бронхиальной астмой ниже, а среди больных рецидивирующим бронхитом выше, чем в контрольной группе.

3. Частота гетерозигот AG среди больных рецидивирующим бронхитом ниже, чем гомозигот AA и GG.

## Список литературы

1. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы. Пересмотр 2011 г. / Под ред. А.С. Белевского. — М.: Российское респираторное общество, 2012. — 107 с.
2. Чучалин А.Г. и др. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактики». — М.: Атмосфера, 2008. — 106 с.
3. Бронхиальная астма, проблемы и достижения. По материалам 15-го ежегодного конгресса Европейского респираторного общества // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. — 2005. — № 1.1. — С. 9-16.
4. Охотникова Е.Н. Бронхиальная астма у детей в Украине: на пути к мировым стандартам диагностики и контроля заболевания // Здоров'я України. — 2007. — № 5/1 (март). — С. 47.
5. Нестеренко З.В. Фенотипические варианты бронхиальной астмы у детей // Астма та алергія. — 2010. — № 3-4. — С. 33-36.
6. Литвинець Л.Я. Молекулярно-генетичні основи і стратегія аналізу бронхіальної астми в дітей // Здоров'я ребенка. — 2012. — № 7(42). — С. 85-89.
7. Фрейдин М.Б., Пузырев В.П. Геномные основы подверженности атопическим заболеваниям // Молекулярная медицина. — 2007. — № 3. — С. 26-35.
8. Протокол діагностики та лікування бронхіальної астми в дітей: Наказ МОЗ України № 767 від 27.12.2005 р.
9. Mukherjee A.B., Zhang Z., Chilton B.S. Uteroglobin: a steroid-inducible immunomodulatory protein that founded the Secretoglobin superfamily // *Endocr. Rev.* — 2007. — Vol. 28(7), № 12. — P. 707-725.
10. Burbure C., Pignatti P. et al. Uteroglobin-Related Protein 1 and Clara Cell Protein in Induced Sputum of Patients with Asthma and Rhinitis // *CHEST.* — 2007. — Vol. 131, № 1. — P. 172-179.
11. [Http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SCGB1A1](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SCGB1A1)
12. Nie W., Xue Ch., Chen J., Xiu Q. Secretoglobin 1A member 1(SCGB1A1) + 38 A|G polymorphism is associated with asthma risk: A meta-analysis // *Gene.* — 2013. — Vol. 528, № 2. — P. 304-308.
13. Ku M.S., Sun X.L., Lu K.H. The CC16 A38G polymorphism is associated with the development of asthma in children with allergic rhinitis // *Clin. Exp. Allergy.* — 2011. — Vol. 41, № 6. — P. 794-800.
14. Ray R., Choi M., Zhang Z. Uteroglobin Suppresses SCCA Gene Expression Associated with Allergic Asthma // *The Journal of Biological Chemistry.* — 2005. — March 18, 280. — P. 9761-9764.
15. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. Методическое руководство. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
16. Janssen R., Sato H., Grutters J.C. et al. The Clara Cell 10Adenine38Guanine Polymorphism and Sarcoidosis Susceptibility in Dutch and Japanese Subjects // *Am. J. Respir. Crit. Med.* — 2004. — Vol. 170. — P. 1185-1187.
17. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Херрингтона С., Макги Дж. — М.: Мир, 1999. — 558 с.
18. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
19. Кайданов Л.З. Генетика популяций. — М.: Высшая школа, 1996. — 320 с.
20. Candelaria P.V., Backer V., Laing I.A. et al. Association between asthma-related phenotypes and the CC16 A38G polymorphism in an unselected population of young adult Danes // *Immunogenetics.* — 2005. — Vol. 57, № 1-2. — P. 25-32.

21. Saito M., Kimoto M., Araki T. et al. Proteome analysis of gelatin-bound urinary proteins from patients with bladder cancers // *Eur. Urol.* — 2005. — Vol. 48, № 5. — P. 865-867.

22. Mansur A.H. Secretoglobin 1A1 gene and asthma predisposition: what is the evidence? // *Clin. Exp. Allergy.* — 2009. — Vol. 39. — P. 8-11.

23. Menegatti E., Nardacchione A., Mirella A. et al. Polymorphism of the Uteroglobin Gene in Systemic Lupus Erythematosus and IgA Nephropathy // *Lab. Invest.* — 2002. — Vol. 82. — P. 543-546.

24. Mukherjee A.B., Zhang Z., Zheng F. Uteroglobin in the treatment of IgA mediated autoimmune disorders. Patent USA WO0062795, example 12.

25. Laing A., De Klerk N.H., Turne S.W. Cross-sectional and longitudinal association of the secretoglobin 1A1 gene A38G polymorphism with asthma phenotype in the Perth Infant Asthma Follow-up cohort // *Clin. Exp. Allergy.* — 2009. — Vol. 39. — P. 62-71.

Получено 18.10.13 □

Мала Н.К., Каладзе Н.Н., Малий К.Д.  
ДУ «Кримський державний медичний університет  
ім. С.І. Георгієвського», м. Сімферополь

#### ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ СЕКРЕТОГЛОБІНУ SCGB1A1 І РОЗВИТОК ЛЕГЕНЕВОЇ ПАТОЛОГІЇ В ДІТЕЙ

**Резюме.** Мета дослідження — вивчення генетичного поліморфізму секретоглобіну SCGB1A1 у дітей кримської популяції і з'ясування можливого взаємозв'язку між ступенем поліморфізму та розвитком патології легень (bronхіальної астми та рецидивуючого бронхіту). Досліджувались зразки ДНК, отримані від дітей, які страждають від бронхіальної астми (75 дітей), рецидивуючого бронхіту (19 дітей) та здорових (20 дітей), віком від 6 до 16 років. Дослідження генетичного поліморфізму проводилось за допомогою полімеразної ланцюгової реакції методом алейної дискримінації з реєстрацією результатів за допомогою електрофорезу. Частоти алейних поєднань генетичних варіантів дослідженого поліморфізму у хворих на бронхіальну астму, рецидивуючий бронхіт і в контрольній групі відрізняються між собою. Так, серед хворих на бронхіальну астму частота носіїв гомозиготного варіанту AA нижче, а серед хворих на рецидивуючий бронхіт вище, ніж у контрольній групі. Частота гетерозигот AG, навпаки, була вищою серед хворих на бронхіальну астму, ніж у хворих на рецидивуючий бронхіт і в контрольній групі. Також серед хворих на рецидивуючий бронхіт частота гетерозигот AG вірогідно нижча, ніж гомозигот AA і GG. Отримані результати можливо використовувати в прогностичних цілях для оцінки перспектив розвитку синдрому обструкції.

**Ключові слова:** бронхіальна астма, діти, генетичний поліморфізм, секретоглобін SCGB1A1.

Malaya N.K., Kaladze N.N., Maly K.D.  
State Institution «Crimean State Medical University named  
after S.I. Georgiyevsky», Simferopol, Ukraine

#### GENETIC POLYMORPHISM OF SECRETOGLOBIN SCGB1A1 AND DEVELOPMENT OF LUNG PATHOLOGY IN CHILDREN

**Summary.** The purpose of investigation — to study of A(38)G genetic polymorphism of the first exon of secretoglobin SCGB1A1 in Crimean children and to identify the possible correlation between the degree of polymorphism and development of lung pathology (bronchial asthma and recurrent bronchitis). There were investigated DNA samples from children with bronchial asthma (75 persons), recurrent bronchitis (19 persons) and healthy children (20 persons) aged from 6 to 16 years. The genetic polymorphism was determined by polymerase chain reaction with method of allele discrimination with registration the results by electrophoresis. Frequency of allele combinations of genetic variants of studied polymorphism was different in patients with bronchial asthma, recurrent bronchitis and in control group. Thus, among patients with bronchial asthma the frequency of homozygous allele AA carriers is lower, and among patients with recurrent bronchitis it is higher then in control group. Contrary, the frequency of AG heterozygotes was higher among patients with bronchial asthma then in patients with recurrent bronchitis and in control group. Also the frequency of AG heterozygotes in patients with recurrent bronchitis is much lower than homozygotes. The obtained results can be used for prognostic purpose to evaluate the prospects of the obstructive syndrome development.

**Key words:** bronchial asthma, children, genetic polymorphism, secretoglobin SCGB1A1.