

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ТЕЧЕНИЯ ОСТРОГО БРОНХИОЛИТА У ДЕТЕЙ



Азимова Камола Таълатовна, Гарифулина Лиля Маратовна
Самаркандский государственный медицинский университет, Республика Узбекистан, г. Самарканд

БОЛАЛАРДА ЎТКИР БРОНХИОЛИТНИНГ КЕЧИШИНИ ПРОГНОЗИ ҚИЛИШНИНГ ГЕНЕТИК ЁНДАШУВИ

Азимова Камола Таълатовна, Гарифулина Лиля Маратовна
Самарканд давлат тиббиёт университети, Ўзбекистон Республикаси, Самарканд ш.

GENETIC APPROACH TO PREDICTING THE COURSE OF ACUTE BRONCHIOLITIS IN CHILDREN

Azimova Kamola Talatovna, Garifulina Lilya Maratovna
Samarkand State Medical University, Republic of Uzbekistan, Samarkand

e-mail: info@sammu.uz

Резюме. Ўткир бронхиолит ва ўткир пневмония билан оғирган болалардан, шунингдек, 2 ойдан 2 ёшгача бўлган соғлом болалардан олинган ДНК намуналари қиёсий ўрганилди. Ген полиморфизмини ўрганиши усули сифатида электрофорез натижаларни қайд этиши аллел дискриминатсияси билан полимераза занжири реакцияси хизмат қилди. Ёш болаларда ўткир бронхиолит пайдо бўлишида СС16 генининг А38G полиморфизмининг А/Г генотипининг таъсири, яъни унинг камайиши аниқланган. А/А генотипининг ўткир брохиолитнинг оғир кечиши ва оғир бронхо-обструктив синдромнинг ривожланиши билан ўзаро таъсири кўрсатилган.

Калим сўзлар: болалар, кечуш оғирлиги, А38G гени СС16, генетик полиморфизм, ўткир бронхиолит.

Abstract. Relatively studied DNA samples obtained from children with acute bronchiolitis and acute pneumonia, as well as conditionally healthy children aged 2 months to 2 years. Polymerase chain reactions with the allelic discrimination method with the recording of results by electrophoresis served as a methodology for the study of gene polymorphism. The effect of the A/G genotype of polymorphism A38G the SS16 gene, namely its decrease in the implementation of acute bronchiolitis in young children, has been established. Interaction of genotype A/A with severe course of acute brochiolitis and development of severe course of bronchobstructive syndrome is shown.

Key words: children, severity of course, A38G gene SS16, genetic polymorphism, acute bronchiolitis.

Актуальность проблемы. В последние годы во всех странах мира в структуре общей заболеваемости детей наблюдается рост респираторной патологии. [19]. Согласно литературным данным дети первого года жизни, болеющие бронхиолитом, составляют 18% всех госпитализаций [1]. Доказано, что это заболевание вызывается преимущественно респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ), вирусами гриппа, риновирусом и реже может передаваться воздушно-капельным путем при контакте ребенка с инфицированным человеком [4,5]. Исследования некоторых ученых указывают на неблагоприятные последствия перенесенных в младенчестве частых респираторно-вирусных инфекций и связывают их с развитием в последующем астмы [8]. Так, результаты иссле-

дований, проведенные в Испании, показали, что дети с НВов-бронхиолитом, метапневмовирусным бронхиолитом человека (hMPV), RSV-бронхиолитом подвергаются повышенному риску развития астмы в возрасте 5–7 лет [6,7], а исследования американцев показало, что тяжесть детского бронхиолита связана с тяжестью астмы раннего возраста [6]. В последние годы работы исследователей свидетельствуют об активном участии секретоглобина (СС16), синтезирующегося клетками Клара слизистой воздухоносных путей в развитии воспаления в легочной ткани и его взаимосвязи как с прогрессированием острого воспалительного процесса, так и с его рецидивированием и с хронизацией легочной патологии [20]. Авторы не исключают также влияния поли-

морфизма A38G гена CC16 в реализации рецидивирующего характера бронхообструктивного синдрома.

В работах зарубежных исследователей прослежена связь гомозиготного положения мутантного аллеля А гена CC16 с развитием бронхиальной астмы. Исследователями выявлено снижение уровня CC16 в бронхоальвеолярном содержимом у больных при астме [10]. Однонуклеотидный полиморфизм A38G (rs3741240) по аллели А связан с снижением транскрипционной активности гена [11]. Выявлено, что с аллергией и астмой связан генотип AA [11]. Установлено, что больные с генотипом AA имели более низкий уровень CC16 в сыворотке, чем у пациентов с GG и AG генотипом [12]. В связи с этим авторы предполагают, что дети с бронхиальной обструкцией, имеющие генотип CC16 38A/38A (и более низкий уровень CC16 в сыворотке), возможно, обладают более высоким уровнем развития местного воспаления и бронхоконстрикции и, следовательно, повышенной вероятностью развития бронхиальной астмы [13].

Однако, изучение литературных источников показало отсутствие работ, свидетельствующих о влиянии данного гена на течение воспалительного процесса при инфекционных заболеваниях нижних дыхательных путей, в частности, острого бронхолита, а также возможном его влиянии на развитие рецидивирования обструктивной патологии легких у больных в более старшем возрасте. В связи с этим **целью работы** явилось изучение полиморфизма гена A38G у детей с острым бронхолитом и выяснение возможной взаимосвязи между степенью полиморфизма и тяжестью заболевания.

Материал и методы исследования: За период с 2021 по 2022 годы обследованы 70 детей в возрасте от 2 месяцев до 2х лет, разделенные на 3 группы: I - группу составили 27 детей с острым бронхолитом, во II вошли 23 ребенка с диагнозом острая пневмония (для сравнения) и в III группу включены 20 условно здоровых детей.

В зависимости от тяжести состояния больные дети госпитализированы в отделение пульмонологии и отделение реанимации Самаркандского областного детского многопрофильного центра и в отделение экстренной педиатрии и отделение детской реанимации Самаркандского филиала Республиканского научного центра экстренной медицинской помощи. У детей с острым бронхолитом наблюдалась бронхообструкция различной степени, у детей с острой пневмонией дыхательная недостаточность смешанного типа различной степени.

С целью оценки прогноза тяжести течения бронхолита использована балльная шкала, основанная на клинических и аускультативных признаках ESBA (J.M. Ramos Fernandez et all, 2013) (табл 1) [14]. Больным детям с острым бронхолитом проведено лабораторно-инструментальное обследование, а также полимеразная цепная реакция в режиме реального времени на выявление вирусного антигена (РСВ, аденовирус, риновирус, парагрипп). Реакции обратной транскрипции и ПЦР проводились с использованием коммерческих наборов «Реверта» и «Амплиценс-200» (Российская Федерация). Из крови пациентов методом фенол-хлороформной экстракции были выделены образцы ДНК [15]. Исследование A(38)G-полиморфизма проводилось с помощью полимеразной цепной реакции методом аллельной дискриминации [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 проведен в НПФ «Синтол», Россия.

Полимеразная цепная реакция была проведена в 25 мкл объема 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].

Полученные результаты обработаны статистическими методами и заключались в вычислении частоты аллелей и частоты аллельных сочетаний и их соответствие равновесию Харди-Вайнберга по критерию χ^2 с расчетными, отвергая нулевую гипотезу при $P < 0,05$ [18].

Результаты исследования. Нами определена частота встречаемости полиморфизма A38G гена CC16 у больных с острым бронхолитом и для проведения сравнительной характеристики исследована группа детей с острой пневмонией. Кровь условно здоровых детей без наличия хронической бронхолегочной патологии представлена в качестве контроля.

Выявлено, что у условно здоровых детей узбекской популяции распределение частот аллелей и генотипов по полиморфизму A38G не отличалось от мировых литературных данных и составило частоту генотипа A/G у каждого второго ребенка, частоту генотипа G/G в 45,0% случаях, и генотип A/A - лишь в 5% случаях.

Таблица 1. Шкала тяжести острого бронхолита (Creación de una Escala de Severidad de la bronquiolitis aguda (ESBA), J.M. Ramos Fernandez et all, 2013)

Возраст			пол		
Баллы	0	1	2	3	4
хрипы	нет	свистящие хрипы в конце выдоха	Свистящие хрипы на протяжении всего выдоха	Свистящие хрипы на протяжении вдоха и выдоха	Ослабленное дыхание
крепитация		крепитация в проекции одного легочного поля	крепитация в проекции 2-х легочных полей	крепитация в проекции 3-х легочных полей	крепитация в проекции 4-х легочных полей
одышка	Нет одышки	Втяжение межреберий и яремной ямки	Втяжение нижней апертуры грудной клетки	Раздувание крыльев носа, втяжение нижней апертуры грудной клетки	
соотношение вдоха к выдоху (i/e)	норма	Симметричное	ассиметричное		
Частота дыхания					
Баллы	0	1	2		
<2	<57	57-66	>66		
2-6 мес	<53	53-62	>62		
6-12 мес	<47	47-55	>55		
Частота сердечных сокращений					
7 дней-2 мес	125-152	153-180	>180		
2-12 мес	120-140	140-160	>160		

Таблица 2. Распределение генотипов и частот аллелей полиморфизма A38G гена CC16 в группах условно здоровых детей, острой пневмонией и с острым бронхолитом

Генотипы	III группа (условно здоровые) n=20	II группа (острая пневмония) n=23	I группа (острый бронхолит) n=27	P ¹	P ²	P ³
G/G	9 (45,0%)	9 (39,1%)	14 (51,8%)	$\chi^2 = 0,072$ p=0,790	$\chi^2 = 0,809$ p=0,369	$\chi^2 = 0,809$ p=0,369
A/G	10 (50%)	12 (52,1%)	7 (25,9%)	$\chi^2 = 0,020$ p=0,887	$\chi^2 = 2,884$ p=0,090	$\chi^2 = 3,632$ p=0,05
A/A	1 (5%)	2 (8,6%)	6 (22,2%)	$\chi^2 = 0,225$ p=0,636	$\chi^2 = 2,528$ p=0,194	$\chi^2 = 1,691$ p=0,887
Аллели	n=40	n=46	n=54			
G	28 (%)	30 (%)	35 (%)	$\chi^2 = 0,223$ p=0,637	$\chi^2 = 0,280$ p=0,598	$\chi^2 = 0,002$ p=0,967
A	12 (%)	16 (%)	19 (%)			

Примечание: P¹ - Достоверность различий между контролем и детьми с острой пневмонией; P² - Достоверность различий между контролем и детьми с острым бронхолитом; P³ - Достоверность различий между детьми с острой пневмонией и острым бронхолитом

Для изучения ассоциации полиморфизма гена CC16 с риском последующего развития бронхообструктивного заболевания у ребенка, ранее перенесшего острый бронхолит, проведен сравнительный анализ изучения частот генотипов

детей с острым бронхолитом, протекающим с бронхообструкцией и острой пневмонией, являющейся одной из частых патологий органов дыхания в раннем детском возрасте, а также с показателями условно здоровых детей.

Таблица 3. Распределение генотипов и частот аллелей полиморфизма A38G гена CC16 в зависимости от тяжести острого бронхолита по шкале ESBA

Генотипы	Легкой и средней степени тяжести N=16	Тяжелой степени N=11	Достоверность различия
G/G	11 (68,75%)	3 (27,2%)	$\chi^2=4,492$ p=0,035
A/G	5 (31,25%)	2 (18,1%)	$\chi^2=0,580$ p=0,447
A/A	0	6 (54,5%)	$\chi^2=11,221$ p=0,001
Аллели	n=32	n=22	
G	27 (84,3%)	8 (36,4%)	$\chi^2=13,177$ p=0,001
A	5 (15,7%)	14(63,6%)	

Наблюдаемое распределение частот генотипов не отличалось от теоретически ожидаемого по уравнению Харди-Вайнберга. По частоте встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма A38G гена CC16 при сравнении острой пневмонии с контрольной III-группой (табл. 2), достоверных различий не найдено, что подтверждает отсутствие особых различий в генотипе больных с острой пневмонией и условно-здоровых детей и данные генотипы никого вклада в особенности развития острой пневмонии не внесли.

В оценке тяжести острого бронхолита нами также была применена Шкала тяжести острого бронхолита (ESBA) (табл.1), позволяющая оценить тяжесть состояния ребенка при первичном осмотре, провести учет частоты дыхания и частоты сердечных сокращений ребенка. Соответственно данной шкале тяжесть острого бронхолита при оценке до 4х баллов соответствовала легкой степени тяжести, 5-8 баллов - средней степени тяжести и 9-13 баллов тяжелой степени. В наших исследованиях дети с легкой степенью составили 11,1% (3), со средней степенью тяжести 48,1% (13) и 40,7%(11) детей составили группу с тяжелой степенью острого бронхолита. При этом средняя балльная оценка в группе с тяжелой степенью составила 11,34±0,32 баллов, в средней 6,83±0,20 баллов и 3,40±0,39 баллов в группе детей с легкой степенью тяжести острого бронхолита, что было статистически меньше по сравнению со средней тяжестью и тяжелой степенью острого бронхолита (p<0,001).

Из таблицы 3 видно, что сравнительный анализ выявления соотношения распределения частоты аллелей и генотипов выявил, что у детей с тяжелой степенью острого бронхолита в основном наблюдался генотип AA, тогда как генотип G/G встречался у детей со средней и легкой степенью тяжести острого бронхолита.

Это свидетельствует о том, что аллель G чаще встречалась у детей со средней тяжестью заболевания, тогда как у детей с тяжелым течением предрасполагающей аллелью являлась аллель – A, которая согласно литературным данным является предрасполагающей к тяжелому

течению бронхообструкции в клинике острого бронхолита.

Обсуждение полученных результатов. Известно, что секретоглобин – белок, синтезирующийся в значительном количестве клетками слизистой воздухоносных путей, в основном клетками Клара является одним из факторов, обеспечивающих противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства слизистых оболочек организма [10].

В настоящее время известен факт влияния гена CC16 слага на возникновение хронической ЛОР-патологии. В последние годы идентифицированы мутантные аллели гена CC16, предрасполагающие в гомозиготном состоянии к астме у около 10% населения [10,12].

Нами изучен полиморфизм A38G гена CC16 у детей с острым бронхолитом, который являясь частой патологией детского возраста, часто не проходит бесследно, а способствует развитию рецидивов бронхообструктивного синдрома, повторной заболеваемости ребенка. Показана взаимосвязь заболеваемости острого бронхолита у детей с возникновением бронхиальной астмы в дальнейший период жизни.

Нами не выявлено статистических различий между данными III группы контроля и II группы - детьми с острой пневмонией. Выраженные различия наблюдались между III группой больных с острой пневмонией и I группой – с острым бронхолитом: частота встречаемости гомозиготного аллельного сочетания AA выше, а гетерозиготного AG статистически значительно ниже у детей с острым бронхолитом.

Определение степени тяжести по шкале ESBA и соотношение их с генотипами и аллелями A38G гена CC16 показало, преимущественное содержание гена A/A, характеризующее тяжелое течение заболевания с тяжелым бронхообструктивным синдромом.

Выводы. Установлено протективное действие генотипа A/G полиморфизма A38G гена CC16, в частности, его снижение в реализации возникновения острого бронхолита у детей раннего возраста.

Показана ассоциация генотипа А/А с тяжелым течением острого бронхолита и развитием тяжелого бронхообструктивного синдрома.

Литература:

1. Hasegawa K, Tsugawa Y, Brown DF, et al. Trends in bronchiolitis hospitalizations in the United States, 2000–2009. *Pediatrics* 2013; 132: 28–36
2. Rose, E.B.; Wheatley, A.; Langley, G.; Gerber, S.; Haynes, A. Respiratory Syncytial Virus Seasonality—United States, 2014–2017. *MMWR* 2018, 67, 71–76.]
3. Chen, P.C.; Mou, C.H.; Chen, C.W.; Hsieh, D.P.H.; Tsai, S.P.; Wei, C.C.; Sung, F.C. Roles of Ambient Temperature and PM_{2.5} on Childhood Acute Bronchitis and Bronchiolitis from Viral Infection. *Viruses* 2022, 14, 1932.
4. Silver, A.H.; Nazif, J.M. Bronchiolitis. *Pediatr. Rev.* 2019, 40, 568–576.
5. Ghazaly, M.; Nadel, S. Characteristics of children admitted to intensive care with acute bronchiolitis. *Eur. J. Pediatr.* 2018, 177, 913–920.
6. Sigurs, N.; Aljassim, F.; Kjellman, B.; Robinson, P.D.; Sigurbergsson, F.; Bjarnason, R.; Gustafsson, P.M. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax* 2010, 65, 1045–1052.
7. Meissner, H.C. Viral Bronchiolitis in Children. *N. Engl. J. Med.* 2016, 374, 62–72.
8. Jartti, T.; Mäkelä, M.J.; Vanto, T.; Ruuskanen, O. The link between bronchiolitis and asthma. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 2005, 19, 667–689.
9. Del Rosal, T.; García-García, M.L.; Calvo, C.; Gozalo, F.; Pozo, F.; Casas, I. Recurrent wheezing and asthma after bocavirus bronchiolitis. *Allergol. Immunopathol.* 2016, 44, 410–414]
10. Sung, F.-C.; Wei, C.-C.; Muo, C.-H.; Tsai, S.P.; Chen, C.W.; Hsieh, D.P.H.; Chen, P.-C.; Lu, C.-Y. Acute Bronchitis and Bronchiolitis Infection in Children with Asthma and Allergic Rhinitis: A Retrospective Cohort Study Based on 5,027,486 Children in Taiwan. *Viruses* 2023, 15, 810.
11. Henning Stenberg, Erik Wadelius, Subhabrata Moitra, Ida Åberg, Jaro Ankerst, Zuzana Diamant, Leif Bjermer & Ellen Tufvesson (2017): Club cell protein (CC16) in plasma, bronchial brushes, BAL and urine following an inhaled allergen challenge in allergic asthmatics, *Biomarkers*
12. Rizaev J. A., Khaidarov N. K., Abdullaev S. Y. Current approach to the diagnosis and treatment of glossalgia (literature review) // *World Bulletin of Public Health.* – 2021. – Т. 4. – С. 96-98.
13. Rizaev J. A., Rizaev E. A., Akhmadaliev N. N. Current View of the Problem: A New Approach to Covid-19 Treatment // *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology.* – 2020. – Т. 14. – №. 4.
14. Rizaev J. A., Maeda H., Khramova N. V. Plastic surgery for the defects in maxillofacial region after

surgical resection of benign tumors // *Annals of Cancer Research and Therapy.* – 2019. – Т. 27. – №. 1. – С. 22-23.

15. Rizaev J. A. et al. Clinical and radiological characteristics of periodontic interweaves in patients with chew recession // *European Journal of Interdisciplinary Research and Development.* – 2023. – Т. 11. – С. 36-41.
16. Rizaev J. A. et al. The need of patients with systemic vasculitis and coronavirus infection in the treatment of periodontal diseases // *Applied Information Aspects of Medicine (Prikladnye informacionnye aspekty mediciny).* – 2022. – Т. 25. – №. 4. – С. 40-45.
17. Rizaev J. A., Kuliev O. A. Risk factors of anemia in children and prognosing of it // *Электронный инновационный вестник.* – 2018. – №. 4. – С. 62-65.
18. Кайданов Л.З. Генетика популяций. — М.: Высшая школа, 1996. — 320 с.
19. Гапархоева З.М., Селиверстова Е.Н., Башкина О.А. Комплексная оценка влияния эндо- и экзогенных факторов на формирование бронхообструктивного синдрома различного генеза у детей // *Материалы III всероссийского съезда педиатров, работающих с детьми, страдающими аллергическими болезнями или имеющими другие иммунопатологические состояния.* – 2014. – С. 21.
20. Селиверстова Е.Н., Башкина О.А., Стройкова Т.Р., Сергиенко Д.Ф., Аверина И.А. Ассоциация полиморфизма гена CC16 с факторами риска формирования бронхообструктивного синдрома у детей // *Вестник РУДН. Серия: медицина. Аллергология. Дерматология.* – 2018. – Т. 22, №2. – С. 183-190

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ТЕЧЕНИЯ ОСТРОГО БРОНХОЛИТА У ДЕТЕЙ

Азимова К.Т., Гарифулина Л.М.

Резюме. Сравнительно изучены образцы ДНК, полученные от детей с острым бронхолитом и острой пневмонией, а также условно здоровых детей в возрасте от 2-х месяцев до 2-х лет. Полимеразная цепная реакция с методом аллельной дискриминации с регистрацией результатов с помощью электрофореза послужило методикой исследования генного полиморфизма. Установлено влияние генотипа А/Г полиморфизма А38G гена CC16, а именно его снижение в реализации острого бронхолита у детей раннего возраста. Показано взаимодействие генотипа А/А с тяжелым течением острого бронхолита и развитием тяжелого течения бронхообструктивного синдрома.

Ключевые слова: дети, тяжесть течения, А38G ген CC16, генетический полиморфизм, острый бронхолит.