

GENES POLYMORPHISM OF SURFACTANT PROTEIN B AND RESPIRATORY MORBIDITY IN PRESCHOOLERS

O. Mazulov, O. Yablon

Vinnitsya Pirogov Medical University,
Ukraine, Vinnitsa

Abstract

There was a prospective single-center study of 50 prematurely born children (25 males and 25 females, mean gestational age 31.6 ± 2.6 weeks, mean body weight at birth 1743.4 ± 454.3 g) conducted in Vinnitsya Children's Regional Hospital during 2010-2015. At the age of 5.2 ± 0.7 years children were divided on a several groups: children diagnosed with asthma - 9 (18%), children diagnosed with recurrent episodes of obstructive bronchitis (recurrent wheezing) - 18 (36%), children diagnosed with bronchopulmonary dysplasia - 8 (16%) and 15 children without respiratory diseases (30%). As a result of Single nucleotide polymorphism (SNP) investigation in surfactant protein B *C1580T* locus a several sequences were evaluated and explored: *CC* in 17 (34%) of patients, a *TT* sequence of nucleotides in 12 (24%) of patients, and *CT* nucleotide sequence was observed in 21 (42%) children. Odds ratio found that the nucleotide sequence *CC* might be a predictive value of recurrent bronchial obstructions, nucleotide sequence *TT* more often observed in patients with asthma, and the presence of *CT* nucleotide sequence in polymorphic locus of gene of surfactant protein B *C1580T* might have a positive prognostic value regarding the absence of chronic bronchopulmonary diseases in children.

Keywords: polymorphism; surfactant protein B; respiratory morbidity; preschoolers.

Вступ. Генетичні розлади, які порушують метаболізм сурфактанту, активно розглядаються протягом останніх років як ключові ланки патогенезу захворювань дихальної системи у новонароджених та дітей старшого віку [10, 14]. Гени, які беруть участь в синтезі сурфактантних протеїнів є критичними щодо вироблення сурфактанту та забезпечення його нормальної функції, зокрема ген сурфактантного протеїну В (*SFTPB*; Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] номер 178640), сурфактантного протеїну С (*SFTPC*; OMIM номер 178620), а також ген *ABCA3* (*ABCA3*; OMIM номер 601615).

Спадковий дефіцит *SFTPB* вперше був описаний в 1993 році у доношеного новонародженого, який народився з дифузним ураженням легень, яке радіографічно нагадувало дефіцит сурфактанту [7]. Цей патологічний стан є наслідуваним за аутосомно-рецесивним типом з мутаціями, необхідними в обох алелях відповідно до причини захворювання. Батьки або нащадки, які гетерозиготні по мутаціям *SFTPB* зазвичай асимптоматичні. На теперішній момент відомо більше 40 різних мутацій *SFTPB* [13]. Дві третини всіх мутацій є мутації 121ins2 в екзоні 4, решта третина - неважливі інші дефекти, які не мають ніякого клінічного значення [12]. Загалом, мутації, які призводять до відсутності або порушенні функції *SFTPB*, зазвичай призводять до розвитку РДС у доношеного новонародженого, який прогресує і в більшості стає фатальним у віці дитини 3-6 місяців. [8]. Клінічна та рентгенологічна картина демонструє в даному випадку аналогічні до змін при РДС в результаті дефіциту сурфактанту [5]. У даних пацієнтів сурфактант в умовах дефектного *SFTPB* є менш ефективним в плані підтримання поверхнево-активного натягу [4]. Деяке покращення загального стану у даних пацієнтів може бути при замісній терапії сурфактантом або використанні кортикостероїдів, але на даний момент часу єдиним радикальним методом є трансплантація легень [3, 9]. Незначна кількість пацієнтів з частковим дефектом *SFTPB* можуть виживати в неонатальному періоді та в подальшому мати важку форму хронічного захворювання легень новонароджених [2, 6, 11].

Одним з методів вивчення генетики мультифакторіальних захворювань є дослідження асоціації поліморфних варіантів генів, продукти яких ймовірно приймають участь в розвитку патогенетичних ланок захворювання.

Найбільший інтерес викликає дослідження поліморфної ділянки гена *SFTPB* є 1580 C/T (SNP, rs11130866), яка викликана заміною треоніну (Thr) в С алелі ізoleyцином (Phe) в Т алелі в позиції 131 прекурсора. Дослідження, які були проведені

на пацієнтах показали, що ці генні поліморфні види *SFTPB* (rs11130866 C/T) асоційовані з пневмонією [14] та гострим респіраторним дистрес-синдромом, який викликаний пневмонією. Також є дані досліджень, які доводять роль поліморфізмів гену *SFTPB C1580T*, як одного з предикторів зниження функції зовнішнього дихання та ризику розвитку ХОЗЛ у дорослих [1].

Виходячи з вищенаведеного, ми припустили, що поліморфізм в гені *SFTPB C1580T* може бути асоційований з формуванням різної бронхолегеневої патології у дітей.

Мета дослідження:

Встановлення патогенетичної ролі поліморфізму гену *SFTPB C1580T* у формуванні бронхолегеневої патології у дітей.

Матеріали та методи дослідження:

Під спостереженням знаходилися 50 передчасно народжених дітей, які лікувалися у відділенні анестезіології та інтенсивної терапії новонароджених Вінницької обласної дитячої клінічної лікарні (ВОДКЛ) у 2010-2011 роках. Середній гестаційний вік дітей склав $31,6 \pm 2,6$ тижні, середня вага при народженні склала $1743,4 \pm 454,3$ г. Співвідношення дітей за статтю було однаковим (25 дівчаток та 25 хлопчиків).

Діти, які були включені в дослідження, були білої раси, члени їх родини стало проживали на одній території протягом трьох поколінь. Критеріями виключення з дослідження була будь-яка вроджена патологія.

Всім дітям проведено генетичне дослідження на базі молекулярно-генетичної лабораторії Державного закладу «Референс-центр молекулярної діагностики МОЗ України». Матеріалом для генетичного дослідження була периферична венозна кров, зразки якої збиралися на фільтрувальний папір.

Геномну ДНК для молекулярно-генетичного дослідження виділяли за допомогою комерційного набору “*Quick-DNATMUniversalKit*” (ZymoResearch, USA) відповідно інструкції. Очищену ДНК використовували для постановки полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Для визначення поліморфного варіанту *C1580T* гену *SFTPB* (rs1130866) використовували модифіковані протоколи [10] з олігонуклеотидними праймерами із застосуванням методу ПЛР та наступним аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ).

Специфічні фрагменти гену *SFTPВ* ампліфікували із застосуванням комерційного набору DreamTaq Green PCR MasterMix (фірми «ThermoScientific», США). Продукт ампліфікації ДНК гену *SFTPВ* підлягав гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеази рестрикції *TaaI* («Thermo Scientific», США).

Стан рестрикційних фрагментів гену *SFTPВ* (*C1580T*) аналізували в 3% агарозному гелі (агароза фірми «CleverScientific», Великобританія). Для оцінки розміру фрагментів використовували маркер молекулярної ваги GeneRuler 50 bpDNALadder («ThermoScientific», США). Гелі візуалізували за допомогою транслюмінатора, обробка отриманого зображення проводилася в комп'ютерній програмі Vitran.

Електрофореграма розподілу рестрикційних фрагментів поліморфізму *C1580T* гену *SFTPВ*, представлена на рисунку 1 демонструє, що амплікони поліморфізму *C1580T* гену *SFTPВ* підлягали гідролітичному розщепленню за наявності сайту рестрикції 5'-ACN↓GT-3', який з'являється в результаті нуклеотидної заміни *C* на *T* в позиції 1580. Внаслідок цього утворювалися рестрикційні фрагменти з молекулярною вагою 230 п.н. та 62 п.н., що відповідає генотипу *TT*. За відсутності сайту рестрикції фрагмент залишався незмінним – 292 п.н. (генотип *CC*). У гетерозиготних носіїв поліморфного варіанту (генотип *CT*) реєструвалися всі типи фрагментів: 292, 230 та 62 п.н.

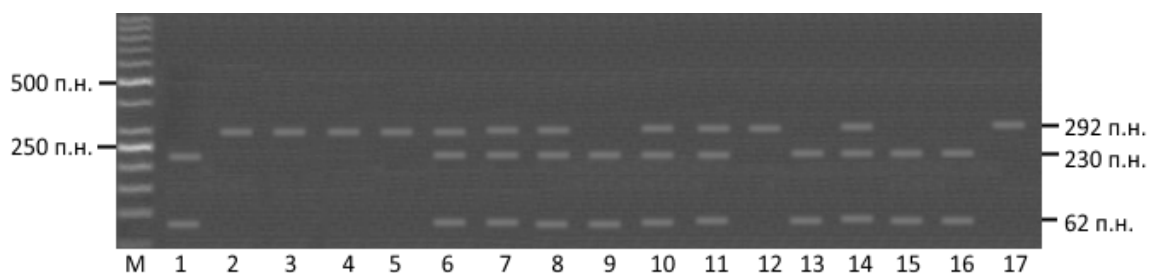


Рис.1.Електрофореграма розподілу рестрикційних фрагментів поліморфізму *C1580T* гену *SFTPВ*:

зразки 2-5, 12, 17 – генотип *CC*,

зразки 6-8, 10, 11, 14 – генотип *CT*,

зразки 1, 9, 13, 15, 16 – генотип *TT*,

М – маркер молекулярної ваги.

Після виписки зі стаціонару, спостереження за дітьми продовжувалося у кабінеті катамнезу Вінницької обласної дитячої клінічної лікарні. Була детально вивчена історія

життя кожної дитини, було проведено різностороннє медичне обстеження з метою виявлення захворювань органів дихання. На момент проведення аналізу середній вік дітей складав $5,2 \pm 0,7$ років.

Статистична обробка проведена за допомогою пакету даних Statistica 6.0. та SPSS 24.0.0.0. Було проведено оцінку розподілення даних, регресійний аналіз з визначенням коефіцієнту Пірсона, а також визначення чутливості та специфічності вмісту сурфактантного протеїну за допомогою ROC-кривих.

Від батьків усіх пацієнтів було отримано добровільну письмову згоду на участь у науковому дослідженні, яке проводили з дозволу комісії з біоетики.

Результати:

В результаті проведеного генетичного дослідження поліморфної ділянки *SFTPВ* C1580T було виявлено три основні послідовності нуклеотидів: *CC*, *CT* і *TT*. Серед усіх дітей послідовність *CC* визначено в 17 (34%) пацієнтів, послідовність нуклеотидів *TT* у 12 (24%) пацієнтів, а послідовність нуклеотидів *CT* в поліморфній ділянці гену спостерігалась у 21 (42%) дитини, дані представлені на рисунку 2.

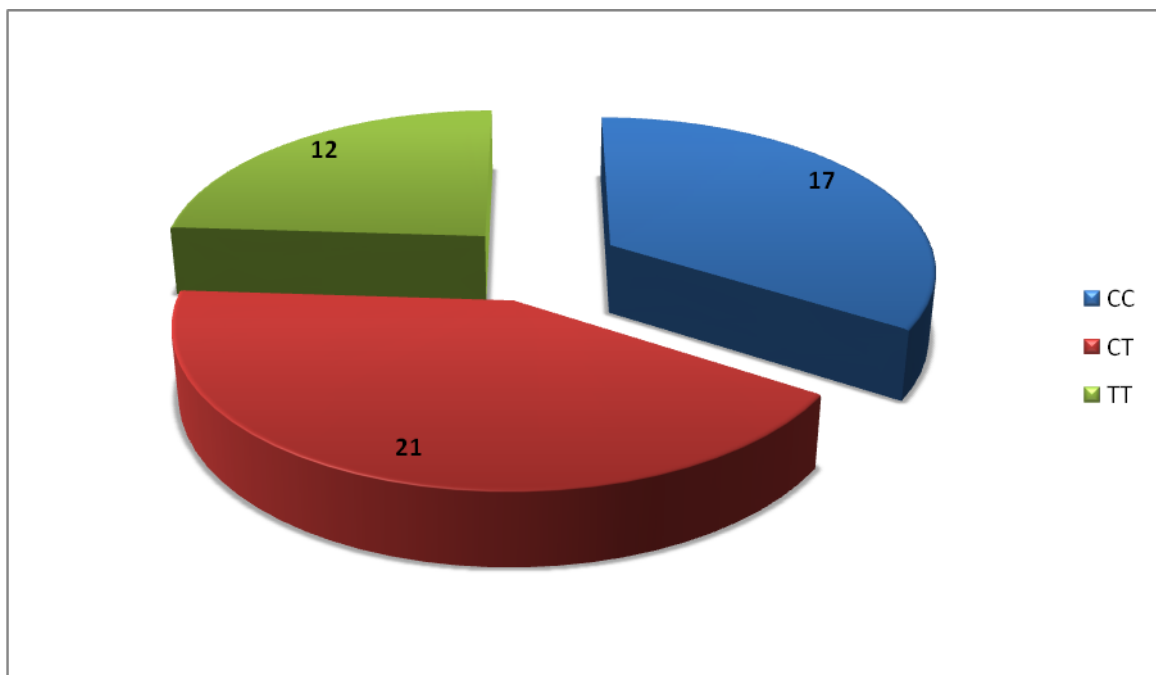


Рис. 2. Розподіл алелей поліморфного гену *SFTPВ* серед обстежуваних дітей.

При вивченні стану здоров'я дітей у віці $5,2 \pm 0,7$ років сформовано групи дітей, у яких було діагностовано бронхіальну астму – 9 (18 %) дітей, повторні епізоди

обструктивних бронхітів – 18 (36 %) дітей, перенесена БЛД - 8 (16 %) дітей, а також 15 дітей без захворювань дихальної системи (30 %).

Встановлено, що у групі дітей з наступним розвитком бронхіальної астми 1 дитина мала послідовність нуклеотидів *CC*, 4 дітей *CT* та 4 дітей *TT*. У 9 дітей з повторними епізодами обструктивних бронхітів був визначений генотип *CC*, у 5 дітей генотип *CT*, у 4 послідовність *TT*. 2 дітей з подальшим розвитком БЛД мали генотип *CC*, 5 дітей – *CT* та лише один з послідовністю *TT*. Серед дітей без значимої бронхолегеневої патології 5 були носіями алельного поліморфізму *CC*, 8 – *CT* та двоє мали генотип *TT*.

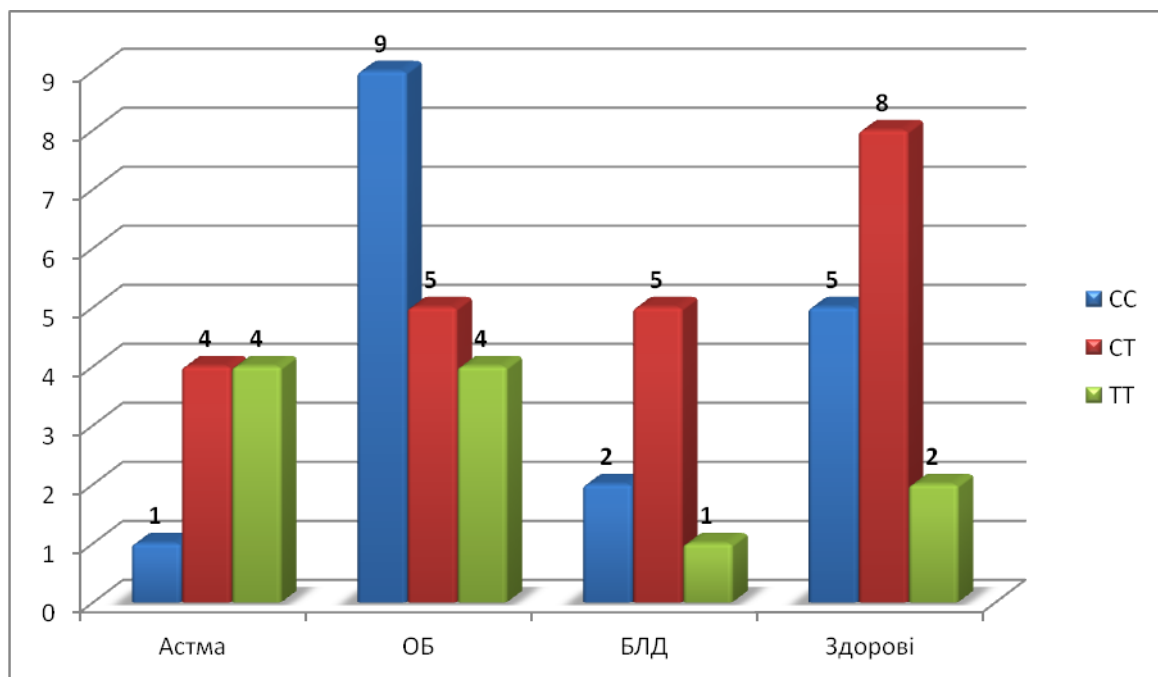


Рис. 3. Алельний поліморфізм гена *SFTPB* в залежності від стану здоров'я дітей (абс.)

Підрахунок відношення шансів ризику виникнення ураження бронхолегеневої системи чи відсутності захворювань легень в залежності від алельного поліморфізму надано у таблиці 1.

Таблиця 1. Стан здоров'я дітей в залежності від алелю поліморфізму гена *SFTPВ*

Стан здоров'я	Відношення шансів, 95% довірчий інтервал	Критерій Фішера	Значення р
<i>СС</i> астма	0.1953 [0.02227 - 1.713]	0.1096	0.06250
<i>СС</i> бронхіт	3 [0.888 - 10.18]	0.07023	0.04426
<i>СС</i> БЛД	0.6 [0.1074 - 3.351]	0.4417	0.3014
<i>СС</i> здорові	0.9583 [0.2664 - 3.448]	0.6076	0.4803
<i>СТ</i> астма	1.022 [0.2393 - 4.367]	0.6292	0.4857
<i>СТ</i> бронхіт	1.353 [0.3373 - 5.426]	0.4682	0.3423
<i>СТ</i> БЛД	2.451 [0.5159 - 11.64]	0.2227	0.1424
<i>СТ</i> здорові	1.714 [0.5066 - 5.801]	0.2872	0.2030
<i>ТТ</i> астма	3.886 [0.828 - 18.23]	0.09279	0.05487
<i>ТТ</i> бронхіт	1.143 [0.2826 - 4.622]	0.5595	0.4234
<i>ТТ</i> БЛД	0.4571 [0.05004 - 4.176]	0.4297	0.2722
<i>ТТ</i> здорові	0.4444 [0.08363 - 2.362]	0.2834	0.1841

Обговорення. Результати проведених нами досліджень виявились статистично недостовірними, скоріш за все, за рахунок невеликої кількості спостережень. Але це дало змогу простежити тенденції асоціації поліморфної ділянки сурфактантного протеїну В *C1580T* з формуванням бронхолегеневої патології, особливо алелі *С*. Також гомозигота *ТТ*, за результатами наших досліджень, володіє протективними властивостями по відношенню до формування захворювань органів дихання.

Дані, які отримали американські дослідники, показали, що *С* алель є фактором, який сприяє розвитку гострого респіраторного дистрес-синдрому, причому *СТ* меншою мірою, ніж *СС* відповідальна за ризик розвитку ураження дихальної системи [11]. Інші дослідники, зокрема Ge L. та ін., у експериментальному дослідженні показали, що наявність *С* алелі у гені сурфактантного протеїну В є фактором ризику бактеріального ураження дихальної системи, зокрема *Pseudomonas aeruginosa*.

Висновки:

1. Встановлено, що послідовність нуклеотидів *CC* в гені сурфактантного протеїну В *C1580T* володіє протективними властивостями щодо розвитку БЛД та бронхіальної астми.
2. В той же час послідовність нуклеотидів *CC* може бути предиктором формування повторних бронхообструктивних синдромів.
3. Встановлено, що послідовність *TT* в гені сурфактантного протеїну В *C1580T* частіше відмічалась у пацієнтів, хворих на бронхіальну астму.
4. Наявність гетерозиготності *CT* в гені сурфактантного протеїну В *C1580T* має позитивну прогностичну значимість щодо відсутності хронічного ураження бронхолегеневої системи у дітей.

Література

1. Bækvad-Hansen M. et al. Surfactant protein-B 121ins2 heterozygosity, reduced pulmonary function, and chronic obstructive pulmonary disease in smokers //American journal of respiratory and critical care medicine. – 2010. – Т. 181. – №. 1. – С. 17-20.
2. Dunbar A.E., 3rd, Wert S.E., Ikegami M. et al. Prolonged survival in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency associated with a novel splicing mutation. *Pediatr Res.* 2000;48:275–282.
3. Faro A., Hamvas A. Lung transplantation for inherited disorders of surfactant metabolism. *NeoReviews.* 2008; 9:e468–e476.
4. Hall I.P. Pharmacogenetics, pharmacogenomics and airway disease. *Respir. Res.*, 2002; 3: 10.
5. Herman T.E., Noguee L.M., McAlister W.H., Dehner L.P. Surfactant protein B deficiency: radiographic manifestations. *Pediatr Radiol.* 1993; 23:373–375.
6. Noguee L.M. Genetic mechanisms of surfactant deficiency. *Biol Neonate.* 2004; 85:314–318.
7. Noguee L.M., de Mello D.E., Dehner L.P., Colten H.R. Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med.* 1993;328:406–410.
8. Noguee L.M., Wert S.E., Proffitt S.A., Hull W.M., Whitsett J.A. Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:973–981.

9. Palomar L.M., Noguee L.M., Sweet S.C., Huddleston C.B., Cole F.S., Hamvas A. Long-term outcomes after infant lung transplantation for surfactant protein B deficiency related to other causes of respiratory failure. *J Pediatr.* 2006; 149:548–553.
10. Pilot-Matias T.J., Kister S.E., Fox J.L., Kropp K., Glasser S.W., Whitsett J.A. Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B. *DNA.* 1989;8:75–86.
11. Quasney M.W., Waterer G.W., Dahmer M.K., Kron G.K., Zhang Q., Kessler L.A., Wunderink R.G. Association between surfactant protein B+ 1580 polymorphism and the risk of respiratory failure in adults with community-acquired pneumonia. *Critical care medicine.* 2004;32:1115–1119.
12. Rossi F.P. et al. Interstitial lung disease in a child heterozygous for the 1549C→GAA (121ins2) mutation of surfactant protein B //European Respiratory Journal. – 2011. – T. 38. – №. 4. – C. 985-987.
13. Tredano M., Griese M., de Blic J. et al. Analysis of 40 sporadic or familial neonatal and pediatric cases with severe unexplained respiratory distress: relationship to SFTPB. *Am J Med Genet A.* 2003; 119:324–339.
14. Whitsett J.A., Weaver T.E. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *New England Journal of Medicine.* 2002;347:2141–2148.