

На правах рукописи

АВЕРИНА Ирина Анатольевна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ВИТАМИН D-СТАТУСА У ДЕТЕЙ
С ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ**

14.01.08 – Педиатрия

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Астрахань – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

СЕРГИЕНКО Диана Фикретовна, доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

МИЗЕРНИЦКИЙ Юрий Леонидович, доктор медицинских наук, профессор, Обособленное структурное подразделение «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю. Е. Вельтищева» ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, заведующий отделом хронических, воспалительных и аллергических болезней легких

ИЛЬЕНКОВА Наталья Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно–Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра детских болезней с курсом последиplomного образования, заведующая кафедрой

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «_____» апреля 2021 года в _____ часов на заседании совета Д 208.005.02 по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук при ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России (414000, г.Астрахань, ул. Бакинская, 121).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <http://astgmu.ru> ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2021 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
к.м.н.

Севостьянова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Наиболее сложный раздел детской пульмонологии – хронические заболевания легких (ХЗЛ) – включает в себя гетерогенную группу нозологических форм с различными этиопатогенетическими механизмами развития. Поражение системы дыхания как одной из важных систем жизнеобеспечения организма связано с устойчивым интоксикационным синдромом, трансформацией иммунологической толерантности, гипоксией. Это обуславливает раннюю инвалидизацию пациентов, потребность в систематическом осуществлении лечебных мероприятий, снижение продолжительности жизни, что обеспечивает высокую медико-социальную значимость хронической бронхолегочной патологии у детей [Геппе Н.А., 2010; Розина Н.Н., Мизерницкий Ю.Л., 2011].

В настоящее время ведется активный поиск новых предикторов тяжести течения ХЗЛ для понимания патогенетических основ и формирования персонализированного подхода к терапии. Особое внимание исследователей привлекают плейотропные эффекты витамина D (VD) на систему воспаления. Известно, что 1,25-дигидроксикальциферол D₃ участвует в активации моноцитов, стимуляции клеточного звена иммунитета, супрессии и пролиферации лимфоцитов, продукции иммуноглобулинов и синтезе цитокинов, в то же время он обладает опосредованной способностью связывать внеклеточный актин и эндотоксин. Многообразие иммунологической интерференции позволяет рассматривать статус витамина D в качестве фактора, влияющего на трансформацию клинической картины ХЗЛ, среди которых можно назвать бронхиальную астму (БА), хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), саркоидоз и др [Визель А.А., Визель И.Ю., 2016; Behan L., Dimitrov B.D., 2016].

Согласно современным представлениям, изучение оси «витамин D и его рецептор (рецептор витамина D (VDR))» является основополагающим для понимания принципов реализации геномных и негеномных влияний кальцитриола на клетки. Одной из причин действенного влияния витамина D в реализации воспалительного процесса могут быть генетические механизмы, которые в значительной степени способны определять его роль, как

в развитии заболевания, так и в ответе организма на фармакологическую коррекцию витамином D. В связи этим происходит перенос внимания на генетические основы регуляции VDR. При этом в оценке вариабельности патологии и реакции на фармакотерапию витамином D особое внимание уделено BSM1 и FOK1 – полиморфизмам гена VDR [Safar H.A., Chehadeh SHE., 2018].

На сегодняшний день отсутствуют работы, уточняющие влияние полиморфизмов гена VDR и уровня сывороточного кальцидиола на течение воспалительного процесса с возможностью модификации клинической картины, а также подтверждающие вероятность реализации хронических заболеваний легких различной этиологии в детской когорте больных. Полученные знания представляются важными и перспективными для понимания интимных патогенетических аспектов хронической бронхолегочной патологии у детей с возможностью формирования индивидуализированного подхода к витамин D-терапии.

Степень разработанности темы исследования

Медицинская литература содержит работы, посвященные изучению влияния активных метаболитов VD на течение и прогноз ХЗЛ. Ранее российскими и зарубежными учеными были описаны закономерности влияния сывороточного VD на клинические особенности течения муковисцидоза (МВ). В ряде исследований подчеркнуто непосредственное участие сывороточного кальцитриола в регулировании процессов легочного воспаления при ХОБЛ и БА у пациентов старше 18 лет. Однако сегодня не существует работ, отражающих изменение VD-статуса в контексте диверсификации клинической картины в детской когорте больных ХЗЛ с учетом гетерогенности этиопатогенетических механизмов.

В настоящее время внимание исследователей сосредоточено на иммуногенетических механизмах формирования заболеваний. С учетом геномного и негеномного иммуномодулирующего воздействия VD, реализуемого посредством рецептора витамина D, не исключается влияние полиморфизмов BSM1 (283 G > A) и FOK1 гена VDR на фенотипические особенности хронических бронхолегочных заболеваний. В медицинской литературе имеются единичные работы по изучению фенотип-ассоциированных влияний полиморфизмов гена VDR на риск развития ХЗЛ. Однако эти

исследования носят весьма противоречивый и фрагментарный характер, они проводились в основном во взрослой когорте больных.

В литературе имеются отдельные работы, раскрывающие как моделирующее влияние VD-статуса на клиническую картину, так и воздействие генетических полиморфизмов рецептора VD на течение отдельных нозологических форм хронических заболеваний у детей. В то же время полученные знания позволят уточнить генетические основы ХЗЛ и создать базу для формирования персонализированного подхода в лечении VD у данной когорты больных.

Цель исследования. Установить влияние сывороточного кальцидиола и молекулярно-генетических детерминант обмена витамина D на течение хронических заболеваний легких у детей.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительную характеристику и выявить особенности течения на современном этапе у больных с первичными и вторичными ХЗЛ согласно клинико-anamnestическим данным и инструментальным методам обследования.

2. Определить клиническую значимость изменения уровня сывороточного кальцидиола у детей с гетерогенными механизмами развития хронической бронхолегочной патологии.

3. Провести сравнительную характеристику клинико-anamnestических и лабораторно-инструментальных методов исследования у детей с различными этиопатогенетическими механизмами развития ХЗЛ в фокусе полиморфизма BSM1 (283 G > A) гена VDR.

4. Установить особенности клинического течения и показатели сывороточного кальцидиола в зависимости от полиморфных вариантов FOK1 гена VDR у детей с ХЗЛ.

Научная новизна исследования

Определены особенности течения ХЗЛ у детей на современном этапе.

Получены новые данные о состоянии витамин-D-статуса у условно здоровых детей Астраханской области и у детей, имеющих ХЗЛ, с учетом этиопатогенетических механизмов развития заболевания. Оценены изменения уровня кальцидиола в контексте клинической картины заболевания. Выявлена взаимосвязь сывороточного уровня VD с кратностью и тяжестью обострений,

характером микробиоты дыхательных путей, функциональными показателями легких. При этом доказано, что степень и выраженность изменений ассоциирована с этиологией недуга.

Оценены частоты аллелей и генотипов полиморфных локусов генов VDR – FOKI и BSMI, как у больных с разными формами ХЗЛ, так и у здоровых детей, живущих в Астраханской области. Проведен поиск фенотип-ассоциированных связей полиморфизмов BSMI (283 G>A) и FOKI гена VDR у детей с хронической бронхолегочной патологией.

Установлено, что однонуклеотидный полиморфизм BSMI (283 G>A) гена VDR оказывает выраженное фенотипическое влияние на развитие ХЗЛ и уровень сывороточного кальцидиола. Определена ассоциация генотипа A/A с развитием первичных и вторичных ХЗЛ у детей, выявлено предрасполагающее влияние на развитие вторичной хронической бронхолегочной патологии у лиц мужского пола, а также предупреждающее действие данного генотипа в развитии тяжелого обострения у детей с ХЗЛ и хронического характера высева патогенной микробиоты. Выявлено предрасполагающее действие генотипа G/G к развитию вторичных ХЗЛ у девочек, среднетяжелых обострений, определена ассоциация с контаминацией благоприятной грамположительной флорой дыхательных путей, а также с низкой частотой развития бронхоэктазов у детей с вторичными ХЗЛ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Определено влияние снижения показателей сывороточного VD на клиническое течение и характер функциональных изменений легких у детей с ХЗЛ.

Выявлены ассоциации полиморфизма BSMI (283 G>A) гена VDR с основными фенотипическими проявлениями хронических бронхолегочных заболеваний у детей. Установлены главные генотипы, которые обнаруживают как протективное, так и предрасполагающее воздействие на тяжелое течение заболевания и развитие осложнений у детей с хронической бронхолегочной патологией. Это позволяет рекомендовать исследование полиморфизма BSMI (283 G>A) гена VDR в качестве уточнения прогноза заболеваний и объективизации дальнейшего VD-статуса. Исследование представленных полиморфизмов вносит свою значимую

лепту в осмысление процесса патогенеза ХЗЛ при различных нозологических формах.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости назначения и мониторинга сывороточного уровня VD у пациентов с ХЗЛ, а также динамической коррекции дозы до достижения референтных показателей для улучшения прогноза и качества жизни данной категории больных.

Методология и методы исследования

В проведенном исследовании была применена базирующаяся на системном подходе научная методология с использованием общенаучных, формально-логических и специальных методов. В соответствии с дизайном исследования определена репрезентативная группа пациентов, которые были обследованы как стандартизированными методами с учетом соответствующей нозологии, так и дополнительными клинико-биохимическими (определение уровня сывороточного кальцидиола) и молекулярно-генетическими методами (исследование BSM1 и FOK1 полиморфизмов гена VDR). Результаты исследования обработаны и проанализированы с применением современных статистических методов, обусловленных целью и задачами данной работы, а также спецификой исходных данных. Ход работы произведен в соответствии с российскими и международными законодательными нормами, содержащими этические и юридические аспекты медицинских исследований.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У пациентов с хроническим бронхолегочным процессом, обусловленным генетическими мутациями или пороками развития, наблюдается более агрессивный характер микрофлоры дыхательных путей и снижение функциональных показателей. Однако, кратность и тяжесть обострений в группе вторичных ХЗЛ менее выраженная, чем у пациентов с первичными поражениями бронхолегочной системы.

2. Уровень сывороточного кальцидиола ассоциирован с кратностью и тяжестью обострений, характером микробиоты дыхательных путей, а также функциональными показателями легких. Согласно результатам клинико-инструментальных методов исследования, дефицитное состояние VD в сыворотке крови при-

водит к нарастанию клинических проявлений и снижению скоростных легочных показателей.

3. Однонуклеотидный полиморфизм BSM1 (283 G>A) гена VDR оказывает выраженное фенотипическое влияние на развитие и течение хронических заболеваний легких у детей и уровень кальцидиола в сыворотке крови. Генотип A/A ассоциирован с развитием хронических заболеваний легких с учетом гендерных различий, является упреждающим генотипом для развития тяжелого бронхолегочного обострения и коррелирует с наличием хронической грамтрицательной инфекции у больных. Генотип G/G ассоциирован со среднетяжелыми обострениями, низкой частотой развития бронхоэктазов, высоким уровнем контаминации грам + флорой дыхательных путей у пациентов с хроническими заболеваниями легких.

4. Генотипы полиморфизма FOKI гена VDR, содержащих мутантный аллель f, влияют на снижение функциональных показателей у детей с менделирующими заболеваниями легких.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверность итогов проделанной работы обусловлена достаточным объемом выборки (98 пациентов в возрасте от 3 месяцев до 17 лет 11 месяцев 29 дней с различными нозологическими формами, относящимися к ХЗЛ, и 93 ребенка из группы контроля, соответствующих по полу и возрасту основной когорте), корректным подбором современных методов исследования. Статистический анализ и интерпретация полученных результатов реализованы с использованием современных методов обработки информации. Основные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в работе, подтверждены доказательным фактическим материалом, отраженным в многочисленных иллюстрациях к тексту диссертационного исследования (рисунки, таблицы). Представленные положения, рекомендации и выводы сформулированы в соответствии с логикой исследования, являются закономерным результатом анализа полученных данных.

Основные положения диссертации опубликованы в материалах Международной конференции Прикаспийских государств «Актуальные вопросы современной медицины» (2016, 2018), в

сборнике VIII научно-практической конференции «Аллергические и иммунопатологические заболевания – проблема XXI века» (2016), в журнале «Успехи современной науки» (2017), в международном медицинском журнале «Archiv Euromedica» (2020), в журнале «Фарматека» (2020).

Внедрение результатов работы. Результаты представленного исследования были освоены и включены в практику пульмонологическим отделением ГБУЗ АО «ОДКБ им. Н.Н. Силищевой» г. Астрахани, а также кабинетом пульмонолога консультативной поликлиники данного лечебного учреждения и ГБУЗ АО «ДГП №3». Теоретический материал интегрирован в учебный процесс, его постулаты нашли применение в ходе практических и семинарских занятий студентов V курса, интернов, клинических ординаторов на кафедре факультетской педиатрии ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Авторский вклад состоит в личном участии диссертанта в работе на всех этапах представленного исследования. Совместно с научным руководителем был спланирован ход работы, сформулированы цель и задачи, разработан дизайн. Лично автором организовано и осуществлено исследование по разделам диссертации, утвержден объем и определены методы работы, проанализирована научная литература по соответствующей тематике, накоплен и систематизирован клинический материал, реализована статистическая обработка, интерпретация и анализ полученных данных. Кроме того, непосредственно диссертантом написана рукопись и подготовлены публикации по итогам работы.

Связь с планом научных исследований

Диссертация выполнена в соответствии с планом НИОКТР ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России в рамках комплексно-целевой программы «Клинико-лабораторные и иммунологические предикторы развития атопических заболеваний кожи и дыхательных путей у детей». Номер государственной регистрации №114070770018.

Публикации по теме диссертации. Основные положения и выводы диссертационного исследования отражены в 10 печатных работах, из них 5 статей опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационное исследование, изложенное на 179 страницах машинописного текста, содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, 3 главы авторских наблюдений, обсуждение результатов, выводы, практические рекомендации, список сокращений и литературы. В последний включены 187 трудов (87 иностранных и 100 отечественных). Иллюстративный материал включает в себя 77 таблиц и 10 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленной цели проведено комплексное обследование 98 пациентов в возрасте от 3 месяцев до 17 лет 11 месяцев 29 дней с различными нозологическими формами, относящимися к ХЗЛ. Больные проходили лечение в пульмонологическом отделении ГБУЗ АО «ОДКБ им. Н.Н. Силищевой» г. Астрахани в период с 2016 по 2019 гг.

Согласно дизайну исследования, все пациенты были разделены на две группы.

Первую группу составили дети в возрасте от 2 до 17 лет 11 месяцев 29 дней ($7,67 \pm 0,54$ лет) с хроническими заболеваниями, сформированными первоначально на здоровой легочной ткани ($n=42$). В данную группу вошли пациенты с диагнозами «хронический бронхит» ($n=30$, $8,0 \pm 0,67$) и «облитерирующий бронхолит» ($n=12$, $6,83 \pm 0,84$).

Вторая группа представлена детьми в возрасте с 3 месяцев до 17 лет 11 месяцев 29 дней ($8,77 \pm 0,75$ лет) со вторичными ХЗЛ, а именно – МВ ($n=34$, $9,0 \pm 1,09$), первичными иммунодефицитами ($n=12$, $10,67 \pm 1,05$) и пороками развития легких ($n=10$, $6,60 \pm 1,27$).

Дизайн исследования включал следующие этапы:

- Клинический блок – сбор клиничко-anamnestических данных, анкетирование с помощью специально разработанной анкеты-опросника, данные физикальных методов обследования. С учетом соответствующей нозологии проведение стандартных лабораторных и инструментальных методов исследования.

- Серологический блок – определение общего гидроксикальциферола в сыворотке крови методом ИФА с использованием тест-систем фирмы ЗАО «Техсистемс»).

- Молекулярно-генетический блок – для генотипирования полиморфизмов FOKI и BSMI (283 G>A) гена VDR. Для выполнения данного анализа производили выделение тотальной ДНК из лейкоцитов венозной крови с использованием: ЭДТА, SDS (фирма «Helicon»), фенол (фирма «AcrosOrganics», USA), протеиназы (фирма «Helicon»). Генотипирование полиморфных маркеров изучаемых генов осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

- Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью офисных приложений пакета Microsoft (электронных таблиц Excel и программы STATISTICA 10) с использованием параметрических и непараметрических методов в зависимости от распределения признака. Критический уровень значимости принимался меньше или равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно дизайну исследования в когорте обследуемых пациентов, были проанализированы следующие факторы: пол, возраст, тяжесть течения заболевания, частота и степень бронхолегочных обострений, степень дыхательной недостаточности, показатели ФВД: ФЖЕЛ, ОФВ1, особенности патогенной микрофлоры, длительность верификации возбудителей в микробиоте дыхательных путей, проведена интерпретация рентгенологических и ультразвуковых методов исследования, частоты встречаемости коморбидных состояний, объема проводимой терапии, кратности и характера переломов костей.

Проанализировав полученные данные, отмечены статистически значимые различия по частоте обострения хронического бронхолегочного процесса в двух группах, а именно, у пациентов с менделирующими заболеваниями нарастание клинических проявлений диагностировались достоверно реже, чем у детей первой группы ($\chi^2=18,495$, $p<0,001$). В тоже время, у пациентов с первичными заболеваниями легких, обострения, требующие госпитализации, регистрировали чаще, а именно – 3–4 и более раз в год ($\chi^2=7,443$, $p=0,025$).

В обследуемой когорте при анализе степени дыхательной недостаточности получены статистически значимые различия ($\chi^2=17,884$, $p<0,001$). При первичных ХЗЛ чаще встречается острая дыхательная недостаточность II – III степени, в то время как, у пациентов второй группы преобладает 0 степень.

Тяжесть и кратность обострения ассоциируется с характером микробиоты дыхательных путей. Микробиологический пейзаж, у обследуемых детей отличался разнообразием флоры, что обуславливало, особенность течения основного заболевания, а также определяло тактику терапии. Согласно дизайну исследования, нами проведена верификация как грам+, так и грам- микробиоты, а именно, следующих возбудителей: *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*. При изучении характера микробиологического пейзажа дыхательных путей отмечены статистически значимые различия между группами, так грам+ флора отмечена чаще у детей из первой группы, тогда как высеив грам- и смешанной флоры у пациентов второй группы (90,5% и 64,3% соответственно, $\chi^2=7,542$, $p=0,007$). При анализе характера микробного пейзажа дыхательных путей у детей при различных нозологических формах ХЗЛ было выявлено доминирование стафилококковой флоры у пациентов с первичными заболеваниями легких относительно второй группы (66,7 и 42,9% соответственно). В то же время изолированный высеив грам- микрофлоры наблюдался только у пациентов с менделирующими заболеваниями, а именно – с типичной экзокринопатией - муковисцидозом ($\chi^2=4,459$, $p=0,035$). Смешанный характер микрофлоры диагностирован у пациентов как с первичными, так и со вторичными ХЗЛ, однако, больные 2-ой группы находятся в лидерстве – 9,5 и 21,4% соответственно.

Определение функциональных показателей по данным спирометрии является золотым стандартом, отражающим функцию легких. В ходе исследования ФВД методом спирографии доминировали изменения обструктивно-рестриктивного характера. У детей первой группы преобладали изменения легкой и средней степени, в то время как у пациентов второй группы, регистри-

ровались низкие скоростные значения (ОФВ ($\chi^2=8,591$, $p=0,014$), ФЖЕЛ ($\chi^2=18,919$, $p<0,001$)).

При анализе коморбидных состояний и осложнений у обследуемой когорты, таких как заболевания назофарингиальной зоны, желудочно–кишечного тракта, центральной нервной системы, выявлены статистически значимые различия между группами. У детей с менделирующими заболеваниями чаще встречались реактивные изменения поджелудочной железы и печени ($\chi^2=31,008$, $p=0,01$ и $\chi^2=5,814$, $p=0,016$), а при первичных ХЗЛ – заболевания нервной системы в форме детского церебрального паралича и эпилепсии ($\chi^2=6,231$, $p=0,013$).

Резюмируя вышеизложенное, можно утверждать, что несмотря на имеющийся генетический дефект, более агрессивный характер микробиоты дыхательных путей и низкие функциональные показатели, кратность и тяжесть обострений у пациентов с вторичными ХЗЛ достоверно ниже, чем при первичных. Видимо, это связано с более низкой социализацией, систематическим приемом препаратов, составляющих базисную терапию, а также высокой настороженностью родителей по отношению к первым симптомам обострения и своевременным обращением за медицинской помощью.

Учитывая гормоноподобный эффект и иммуномодулирующее влияние на клетки иммунной системы активных метаболитов витамина D, проанализирована ассоциация VD-статуса и особенностей клинического течения первичных и вторичных ХЗЛ. Руководствуясь национальной программой «Недостаточность витамина D у детей и подростков РФ» 2018г., дефицит VD определяли как концентрацию 25(OH)D в сыворотке крови < 20 нг/мл, недостаточность – от 20 до 30, адекватные уровни – 30–100 нг/мл.

Отмечено, что у пациентов с менделирующими заболеваниями, статистически значимо чаще определяли дефицит сывороточного кальцидиола по сравнению с контрольной группой и с уровнем VD у пациентов с первичными хроническими заболеваниями ($\chi^2=32,646$, $p<0,001$, OR–6,579, ДИ 3,321–13,035). При анализе показателей у больных с первой группой достоверно чаще отмечалась недостаточность VD ($\chi^2=35,546$, $p<0,001$, OR–8,464, ДИ 3,955–18,110). Согласно полученным результатам, более чем у

60% детей контрольной группы были выявлены референтные значения VD ($\chi^2=46,480$, $p<0,001$, OR–9,318, ДИ 4,704–18,460), однако в 35% случаев отмечалось снижение уровня VD различной степени, а именно – дефицит (22,6%) и недостаточность (12,9%) (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика детей основных и контрольной групп по VD-статусу.

Уровень сыровотки витамина D3	Группа контроля (n = 93)	Первичные ХЗЛ (n = 42)	Вторичные ХЗЛ (n = 56)	Статистическая значимость
< 20 нг/мл	21 (22,6%)	8 (19,05%)	36 (64,3%)	$\chi^2=32,646$, $p<0,001$ $df=2$
20–30 нг/мл	12 (12,9%)	26 (61,9%)	12 (21,4%)	$\chi^2=36,875$, $p<0,001$, $df=2$
> 30 нг/мл	60 (64,5%)	8 (19,05%)	8 (14,3%)	$\chi^2=46,480$, $p<0,001$, $df=2$

p – достоверность различий между основными и контрольной группами

Анализ данных показал, что статистически значимо чаще регистрировалась кратность нарастания выраженности клинических проявлений до 3–4 раз в год у детей с ХЗЛ при недостаточности VD ($\chi^2=15,799$, $p<0,001$), в то время как при референтных значениях – не более 2 раз в год ($\chi^2=8,275$, $p=0,016$). Несмотря на то, что при дефиците VD у 40,9% детей кратность обострения превышала 4 раза в год, статистическая значимость не достигнута ($\chi^2=5,299$, $p=0,071$). Нами установлено, что дефицит кальцидиола ассоциирован с риском развития тяжелых обострений ($\chi^2=3,961$, $p=0,047$).

Оценивая показатели функции легких от уровня содержания VD в сыровотке крови, определено, что низкие параметры ФВД, а именно – ОФВ1 и ФЖЕЛ менее 60 % от должноствующих значений, статистически значимо чаще определяли у пациентов с сыровоточным уровнем кальцидиола, соответствующим дефицитным значениям ($\chi^2=15,005$, $p<0,001$ и $\chi^2=10,004$, $p=0,007$ соответственно). Условно нормативные значения ФЖЕЛ фиксировались при референтных показателях плазматического кальцидиола ($\chi^2=8,417$, $p=0,015$). Ассоциации между значениями VD в

диапазоне от 20 до 30 нг/мл определялись с умеренным снижением ФЖЕЛ ($\chi^2=7,541$, $p=0,024$) (Рисунок 1, 2).



Рисунок 1 – Показатели ОФВ1 в зависимости от уровня кальцидиола в сыворотке крови у детей с ХЗЛ.



Рисунок 2 – Показатели ФЖЕЛ в зависимости от уровня кальцидиола в сыворотке крови у детей с ХЗЛ.

Отмечено, что при недостаточности VD, грам+ микробиоту статистически значимо чаще определяли в первой группе ($\chi^2=10,239$, $p=0,006$). При верификации микробных патогенов в контексте определения сывороточного кальцидиола у обследуемой когорты отмечено статистически значимое преобладание во второй группе дефицита VD при идентификации *Streptococcus pneumoniae* ($\chi^2=11,494$, $p=0,004$), тогда как *Staphylococcus aureus* чаще определялся при недостаточности VD у пациентов с первичными заболеваниями легких ($\chi^2=12,274$, $p=0,003$).

Исходя из полученных результатов, определено, что концентрация сывороточного кальцидиола способна влиять на фенотипические характеристики ХЗЛ за счет геномных и негеномных механизмов регуляции хронического воспаления. Выявлена ассоциация между VD-статусом, кратностью и тяжестью обострений, характером микробиоты дыхательных путей, а также функциональными показателями легких.

При анализе влияния генетического полиморфизма BSM1 гена VDR на формирование ХЗЛ, была выявлена ассоциация генотипа A/A с развитием хронических заболеваний респираторного тракта в обеих группах (Таблица 2).

Таблица 2 – Распределение генотипов и вариантных аллелей полиморфизма BSM1 (283 G>A) гена VDR у детей основной и контрольной групп

Генотипы	Контрольная группа (n = 85)	Первичные ХЗЛ (n = 42)	Вторичные ХЗЛ (n = 56)	χ^2 ; p
G/G	28 (32,9%)	12 (28,5%)	20 (35,7%)	$\chi^2_{G G-G A-A A} = 18,556$ p<0,001, df=4
G/A	49 (57,6%)	18 (42,8%)	16 (28,5%)	
A/A	8 (9,5%)	12 (28,7%) [°]	20 (35,8%) ^{°°}	
Аллели	n = 134	n = 60	n = 72	$\chi^2 = 1,490$, p=0,475, df=2
G	77 (57,4%)	30 (50,0%)	36 (50,0%)	
A	57 (76,6%)	30 (50,0%)	36 (50,0%)	

[°] - p достоверность различий между контрольной и 1 группой ($\chi^2=7,889$, p=0,020)

^{°°} - p достоверность различий между контрольной и 2 группой ($\chi^2=18,028$, p<0,001)

При поиске ассоциации генотипов с гендерным показателем отмечено предрасполагающее влияние генотипа A/A на развитие вторичной хронической бронхолегочной патологии у лиц мужского пола, тогда как генотип G/G ассоциирован с развитием заболеваний среди девочек ($\chi^2=11,400$, p=0,004, OR=3,667 и OR=8,000, соответственно).

При анализе тяжести обострений в фокусе полиморфизма VDR были выявлены статистически значимые различия между генотипами у пациентов с первичными и вторичными хроническими заболеваниями легких ($\chi^2=6,475$, p=0,040 и $\chi^2=6,771$,

$p=0,034$ соответственно). Доказано, что генотип A\A является определяющим фактором к развитию тяжелого обострения у детей с ХЗЛ ($\chi^2=2,037$, $p=0,154$), в тоже время, генотип G\G: обладает предрасполагающим действием к развитию среднетяжелых обострений ($\chi^2=2,102$, $p=0,148$).

При изучении влияния генетического полиморфизма были выявлены ассоциации между характером микробного пейзажа дыхательных путей у обследованных пациентов второй группы с вариантными генотипами по полиморфизму BSM1 гена VDR ($\chi^2=10,376$, $p=0,035$). Мутантный генотип A\A является предрасполагающим в инфицировании грамотрицательной и смешанной флорой дыхательных путей детей с хронической патологией респираторного тракта ($\chi^2=9,908$, $p=0,008$ и $\chi^2=6,054$, $p=0,049$ соответственно для 1 и 2 групп).

В зависимости от длительности определения возбудителя в фокусе полиморфизма BSM1 гена VDR выявлена ассоциация генотипа A/A с хроническим характером высева ($\chi^2=6,054$, $p=0,049$) (таблица 3).

Таблица 3 – Распределение генотипов и вариантных аллелей полиморфизма BSM1 (283 G>A) гена VDR с учетом длительности высева патогенной микрофлоры у детей с ХЗЛ

Генотипы	Первичные ХЗЛ (n = 42)			Вторичные ХЗЛ (n = 56)		
	Персистирующая (n=26)	Хроническая инфекция (n=16)	χ^2 ; p	Персистирующая (n=20)	Хроническая инфекция (n=36)	χ^2 ; p
G/G	14 77,8%	4 22,2%	$\chi^2_{G\{G-A\}G-A/A}$ =9,908 p=0,008 df=2	10 55,6%	8 44,4%	$\chi^2_{G\{G-A\}G-A/A}$ =6,054 p=0,049 df=2
A/G	10 71,5%	4 28,5%		6 37,5%	10 62,5%	
A/A	2 20,0%	8 80,0%		4 18,2%	18 81,8%	
Аллели	n = 36	n = 20		n = 26	n = 46	
G	24 75,0%	8 25,0%	χ^2_{A-G} =2,724 p=0,099 df=1	16 47,1%	18 52,9%	χ^2_{A-G} =3,347 p=0,068 df=1
A	12 50,0%	12 50,0%		10 62,4%	28 73,6%	

Согласно дизайну исследования по данным КТ ОГК анализировались следующие характеристики: бронхоэктазы, «воздушные ловушки», распространенный пневмофиброз. Статистические различия определены, только по частоте встречаемости бронхоэктатических деформацией у детей с менделирующими заболеваниями, а именно, генотип G\G: интегрирован с низкой, в то время, как генотип A/A с высокой частотой данных изменений ($\chi^2=12,398$, $p=0,003$).

Несмотря на поиск ассоциаций коморбидных состояний с вариантами полиморфизмами BSM1 гена VDR, статистически значимые различия были получены исключительно у детей с первичными хроническими заболеваниями легких: выявлено предрасполагающее влияние генотипа A/A в развитии заболевания печени и поджелудочной железы ($\chi^2=11,0530$, $p=0,004$).

Диапазон ширины статистического распределения уровня сывороточного кальцидиола соответствовал нормальному. В связи, с чем использовались количественные переменные: среднего значения \pm стандартной ошибки среднего значения. Установлено влияние генотипов полиморфизма BSM1 гена VDR на уровень сывороточного кальцидиола. В обеих основных группах у детей с наличием мутантного аллеля A как в гетеро-, так и в гомозиготном состоянии, определялись показатели соответствующие дефицитным значениям сывороточного кальцидиола, тогда как у пациентов с мажорным генотип G\G показатели VD стремились к референтным. ($f_{эмп}=6,8741$, $p=0,002$) (рисунок 3).

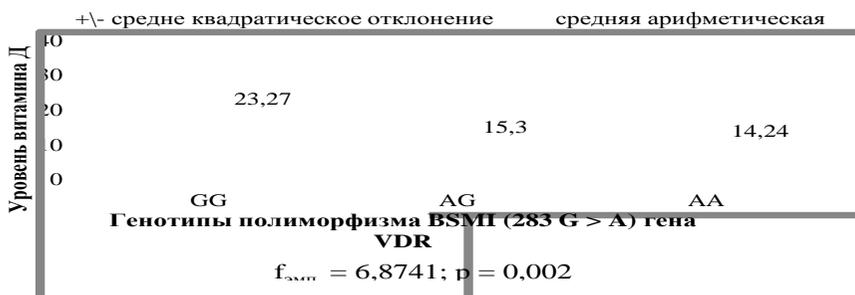


Рисунок 3 – Уровень VD в зависимости от генотипов полиморфизма BSM1 (283 G>A) гена VDR у обследуемой когорты.

Согласно проведенному статистическому анализу было установлено, что однонуклеотидный полиморфизм BSM1 гена VDR оказывает выраженное фенотипическое влияние на развитие и течение ХЗЛ у детей. Генотип А/А: ассоциирован с развитием хронической бронхолегочной патологии; оказывает предрасполагающее влияние на формирование вторичных хронических заболеваний у мальчиков; является упреждающим в развитии тяжелых обострений и контаминации грам- и смешанной флоры у пациентов со вторичными ХЗЛ; а так же способствует хроническому варианту инфекции, является предрасполагающим фактором в реализации заболеваний печени и поджелудочной железы у детей с первичными ХЗЛ, ассоциирован с дефицитными значениями сывороточного кальцидиола в основной когорте больных. Генотип G/G: интегрирован с развитием хронической бронхолегочной патологией у девочек второй группы, обладает предрасполагающим действием к среднетяжелым обострениям и контаминации благоприятной грамположительной флорой; ассоциирован с низкой частотой развития бронхоэктазов у детей с вторичными ХЗЛ и показателям сывороточного кальцидиола в интервале 20-30 нг/мл.

Определено предрасполагающие влияние генотипов полиморфизма FOKI гена VDR на заболевания легких у детей. Анализ свидетельствует, что с наибольшей частотой как в двух основных группах, так и в контрольной когорте определялся гетерозиготный генотип, включающий мутантный и дикий аллель F/f и гомозиготное состояние двух диких аллелей F/F, в тоже время, редким генотипом стал гомозиготный генотип по мутантному аллелю f/f. Причем в контрольной группе данный полиморфный вариант встречался статистически значимо чаще, чем в основной ($\chi^2=4,808$, $p=0,029$). При сравнении частоты дикого F и мутантного f аллеля в основных и контрольной группах различий не найдено ($\chi^2=1,025$, $p=0,599$). При анализе функциональных показателей по данным спирометрии и полиморфизм FOKI гена VDR различия были выявлены только во второй группе, а именно определено превалирование гомозиготного мажорного генотипа FF у детей с обструктивными и рестриктивными изменениями легкой степени ($\chi^2=12,735$, $p=0,002$), в то время как у носителей минор-

ного аллеля отмечались умеренные снижения показателей ЖЕЛ ($\chi^2=6,777$, $p=0,034$) и ОФВ1 ($\chi^2=12,735$, $p=0,002$,) во второй группе. Не выявлены ассоциации между полиморфизм FOKI гена VDR и такими характеристиками как гендерные различие ($p = 0.965$), кратность и тяжесть обострений ($p=0,629$ и $p=0,101$, соответственно), степень ДН ($p=0,15$), характер и длительность высева патогенной микрофлоры дыхательных путей ($p=0,232$ и $p=0,724$, соответственно), вариантными изменениями по данным КТ ОГК ($p>0,005$).

При анализе генотипов полиморфизма FOKI в контексте уровня сывороточного кальцидиола у обследуемой когорты больных статистически значимых различий не выявлено ($F_{эмп}=1,69286$, $p=0,19958$).

ВЫВОДЫ:

1. У детей с менделирующими заболеваниями легких наблюдается более агрессивный характер микрофлоры дыхательных путей и снижение функциональных показателей, но по кратности и тяжести обострений они достоверно уступают пациентам с первичными ХЗЛ.

У больных с наследственными бронхолегочными заболеваниями статистически значимо чаще диагностируется патология желудочно-кишечного тракта, тогда как у детей с хроническим бронхитом и облитерирующим бронхиолитом – неврологические заболевания в качестве коморбидных состояний.

2. Дефицит VD в сыворотке крови приводит к нарастанию кратности и тяжести обострений, грамотрицательному и смешанному профилю микробиоты дыхательных путей и достоверному снижению скоростных легочных показателей у детей с ХЗЛ независимо от этиопатогенетических механизмов формирования заболеваний.

3. Генотип A/A полиморфизма BSM1 (283 G>A) гена VDR является предрасполагающим к развитию ХЗЛ у детей. Определено упреждающее действие гомозиготного генотипа A/A на формирование менделирующих заболеваний у лиц мужского пола, повышение риска развития обострений тяжелой степени, контаминацию и хронический вариант высева

грамотрицательной и смешанной флоры в микробиоте дыхательных путей, а также низкие значения функциональных легочных показателей и дефицитным значениям кальцидиола в сыворотке крови у детей с ХЗЛ.

Генотип G/G полиморфизма BSM1 (283 G>A) гена VDR ассоциирован с развитием вторичных хронических заболеваний легких у девочек, со среднетяжелыми обострениями, грамположительной микрофлорой дыхательных путей, а так же высокими показателями сывороточного кальцидиола у детей с ХЗЛ. Гомозиготы по дикому аллелю G интегрированы с низкой частотой развития бронхоэктазов при вторичных ХЗЛ.

4. Доказана ассоциация минорного генотипа f/f полиморфизма FOK1 гена VDR с ХЗЛ у детей. У больных с вторичными ХЗЛ при генотипе F/F полиморфизма FOK1 гена VDR установлено более благоприятное течение бронхолегочного процесса, проявляющееся умеренным снижением функциональных показателей и низкой кратностью обострений. Гетерозиготный генотип F/f ассоциирован со значительными нарушениями скоростных показателей ФВД и высокой частотой патологий назофарингиальной зоны у детей с менделирующими заболеваниями легких.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразно мониторинг уровня кальцидиола в сыворотке крови у детей, страдающих ХЗЛ, с динамической коррекцией дозы до достижения референтных показателей для улучшения прогноза заболевания и качества жизни данной категории больных.

2. Учитывая влияние полиморфных вариантов BSM1 сVST7 G>A гена VDR на особенности течения и VD-статус у детей с ХЗЛ, представляется оправданным рекомендовать генотипирование на наличие неблагоприятных аллелей полиморфизма BSM1 с VST7 G>A гена VDR с целью объективизации прогноза заболевания и выработки персонализированных программ VD-терапии у данной категории больных.

3. Полученные данные по распределению полиморфизмов BSM1 сVST7 G>A и FOK1 гена VDR в популяции условно здоровых детей Астраханской области могут быть использованы для дальнейших эпидемиологических генетических исследований.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Аверина И.А. Течение хронических заболеваний легких у детей в призме полиморфизма FokI гена VDR / И.А. Аверина, Д.Ф. Сергиенко // **Фарматека**. – 2020. – Vol. 27. – №9. – С.81-85.
2. Вязовая И.В. Особенности течения хронических заболеваний легких у детей на современном этапе / И.В. Вязовая, С.Д. Ихсанов, И.А. Аверина // **Фарматека**. – 2020. – Vol.27. – №10. – С.100-105.
3. Аверина И.А. Влияние витамина D на течение хронических заболеваний легких у детей / И.А. Аверина, Д.Ф. Сергиенко // Научно-практический медицинский журнал **Фарматека**, г. Москва. – 2020. – Т.27. №14. – С. 81-86.
4. Аверина И.А. Уровень витамина D у пациентов с хронической респираторной патологией и у здоровых детей Астраханской области / И.А. Аверина, Д.Ф. Сергиенко // **Астраханский медицинский журнал**. – 2020. – Т.15. – №4. – С.15-23.
5. Аверина И.А. Хронические заболевания легких в контексте иммуногенетического влияния витамина D / И.А. Аверина, Д.Ф. Сергиенко, О.С. Дугужева, Р.М. Гаджиев // **Успехи современной науки**. – 2017. – Т.2. – №5. – С. 210-214.
6. Сергиенко Д.Ф. Effect of BSMI (283 G>A) polymorphism of the VDR gene on the course of the chronic lung diseases in children / Д.Ф. Сергиенко, С.А. Красовский, И.А. Аверина // *Archiv Euro-medica*. – 2020. – Vol.10. – № 2. – С.58-60.
7. Башкина О.А. Нарушение минеральной плотности костей у детей» / О.А. Башкина, И.А. Аверина // Материалы международной конференции Прикаспийских государств «Актуальные вопросы современной медицины». – 2016. – 06-07 октября. – С.12-14.
8. Сергиенко Д.Ф. Значение витамина D при хронических заболеваниях легких / Д.Ф. Сергиенко, И.А. Аверина // VIII научно-практическая конференция «Аллергические и иммунопатологические заболевания - проблема XXI века». – Санкт- Петербург. – 2016. – 16-17 декабря. – С.9-10.
9. Аверина И.А. Изменения показателей сывороточного 25(OH) D у детей с муковисцидозом / И.А. Аверина, Д.Ф. Серги-

енко // Сборник: «Актуальные вопросы современной медицины III Международной конференции Прикаспийских государств». – 2018. – С. 12-13.

10. Аверина И.А. Витамин D статус у детей Астраханской области / И.А. Аверина, Д.Ф. Сергиенко // Сборник тезисов научной конференции, посвященной Дню работников здравоохранения и медицинской промышленности Туркменистана 2020. – С. 708-709.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЖЕЛ	- жизненная емкость легких
ДН	- дыхательная недостаточность
КТ	- компьютерная томография
МВ	- муковисцидоз
ПДРФ	- полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФВД	- функция внешнего дыхания
ХЗЛ	- хронические заболевания легких
ХОБЛ	- хроническая обструктивная болезнь легких
VD	- витамин D
VDR	- витамин D рецептор

АВЕРИНА Ирина Анатольевна

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ВИТАМИН D-СТАТУСА У ДЕТЕЙ
С ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ

14.01.08 – Педиатрия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Подписано в печать
Тираж 100 экз. Заказ №

Издательство ФГБОУ ВО «Астраханский государственный
медицинский университет» Минздрава России
414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121