

УДК:616.248-053.2-073

Л. А. Іванова¹, Р. А. Волков²¹ Буковинський державний медичний університет;² Чернівецький національний університет

Фенотипові особливості бронхіальної астми у дітей залежно від поліморфізму генів глутатіон-S-трансфераз T1 та M1 (GSTT1 та GSTM1)

Ключові слова: бронхіальна астма, діти, поліморфізм, глутатіон-S-трансфераза.

Бронхіальна астма (БА) посідає в структурі патології людини одне із провідних місць. Згідно з сучасними епідеміологічними даними її поширеність в більшості країн світу серед дорослого населення становить 5–7 %, а в дитячій популяції – до 10 % [6].

Бронхіальна астма – одна з самих актуальних медико-соціальних проблем не тільки за поширеністю, але й за тяжкістю перебігу, часто інвалідизуючого характеру та низької якості життя у багатьох хворих. Це типове мультифакторне захворювання, в основі якого лежить складний характер взаємодії генетичних чинників та факторів зовнішнього середовища [2].

Враховуючи еколого-токсикологічну основу розвитку багатьох мультифакторних захворювань [8], у тому числі БА, доцільно вивчення причетності генів, патологічні ефекти яких на фенотиповому рівні проявляються при впливі факторів хімічної природи. До таких генів належать гени ферментів біотрансформації ксенобіотиків (ФБК), зокрема глутатіон-S-трансферази (GST).

Встановлено, що GST у людини кодується великою мультигенною родиною, що охоплює понад 20 генів [11, 16], функція багатьох з яких все ще потребує подальшого вивчення. Порівняно добре дослідженими є цитоплазматичні ізоформи GSTT1 та GSTM1, які беруть участь у детоксифікації багатьох токсинів, продуктів оксидативного стресу, канцерогенів та лікарських препаратів.

У популяціях людини виявлено поліморфізм у генах GSTT1 та GSTM1, який пов'язаний із делеціями значних фрагментів обох генів, що робить їх функціонально неповноцінними (нуль-алелі T1del та M1del). Доведено, що у осіб, які є гомозиготними по делеціям у генах GSTT1 або GSTM1, втрачається ферментативна активність відповідної ізоформи [15].

Із літературних джерел також відомі дослідження, присвячені вивченню зв'язку між поліморфізмом генів

GSTT1, GSTM1 та БА у дітей та дорослих [4, 10, 12]. Проте вони є неоднозначними і не враховують особливості різних фенотипів БА, що виникають в результаті взаємодії чинників зовнішнього середовища та генетичної схильності до розвитку даного захворювання. Так, на сьогоднішній день виділяють такі фенотипи БА:

- астма пізнього початку, для якої характерним є високий ризик персистування захворювання в дорослий вік;
- atopічна форма, при якій визначають спадкову схильність до atopії в поєднанні з підвищенням вмістом в організмі специфічного імуноглобуліну E;
- астма фізичного навантаження, тригерним фактором якої виступає фізична активність дитини;
- еозинофільна бронхіальна астма, при якій як ефективні клітини запалення дихальних шляхів виступають еозинофільні лейкоцити;
- тяжка бронхіальна астма, при якій вже при народженні дитини відмічається ремоделювання бронхів та їх гіперсприйнятливості;
- крім того, до особливого «гіперреактивного» фенотипу можна віднести таку форму бронхіальної астми, за якої гіперсприйнятливості бронхів значною мірою визначається генетичною компонентою, що не залежить від запалення [13, 14]. Все ж слід визнати, що наразі залишається відкритим питання щодо частоти виникнення фенотипів даного захворювання, так і взаємозв'язку їх з поліморфізмом генів ФБК.

Метою дослідження було з'ясувати вплив делецій у генах GSTT1 та GSTM1 на формування різних фенотипів бронхіальної астми у дітей шкільного віку.

Матеріали та методи дослідження

На базі пульмоалергологічного відділення обласної дитячої клінічної лікарні м. Чернівці обстежено 372 дитини, хворі на БА, серед яких 150 хворим проведено

генотипування GSTT1 та GSTM1. Середній вік дітей становив $(11 \pm 0,36)$ року, серед обстежених — 76,4 % хлопчиків. Усім дітям проведено комплексне обстеження, яке включало оцінку неспецифічної гіперсприйнятливості бронхів та гіперчутливості шкіри негайного типу до основних небактеріальних алергенів. Діагноз БА встановлювали з урахуванням міжнародних рекомендацій GINA за 2009 рік [13] та наказу МОЗ України [9]. Характер запалення в дихальних шляхах вивчали з урахуванням клітинного складу індукованого мокротиння. Неспецифічну гіперсприйнятливості бронхів оцінювали за допомогою спірографічної проби з гістаміном з урахуванням як гіперчутливості дихальних шляхів (PC20H), так і їх гіперреактивності за даними дозозалежної кривої (ДЗК). Лабільність бронхів вивчали у вигляді показника лабільності бронхів (ПЛБ), який являє собою оцінку ступеня їх спазму після дозованого фізичного навантаження (ІБС-індекс бронхоспазму) та бронходилатації після інгаляції сальбутамолу (ІБД-індекс бронходилатації).

Враховуючи існуючі уявлення про вірогідність існування різних фенотипів, які зумовлюють особливості перебігу БА у дітей, було виділено шість фенотипів захворювання у вказаній когорти пацієнтів.

Якщо захворювання у дитини вперше проявлялось у віці старше 6 років, даний фенотип визначали як астму пізнього початку [5]. При визначенні тяжкої астми враховували частоту появи симптомів протягом тижня та кількість госпіталізацій на рік [14]. Еозинофільний тип БА виділяли у дітей, в індукованому мокротинні яких вміст еозинофілів становив 3 % та більше [13]. Астма фізичного навантаження характеризувалася наявністю вказівки в анамнезі про розвиток бронхоспазму після фізичного навантаження, а при дослідженні показників лабільності бронхів індекс бронхоспазму (ІБС) становив 15 % та більше [5]. Гіперреактивною вважали форму астми у пацієнтів із наявністю підвищеної чутливості до гістаміну ($PC20H \leq 0,5$ мг/мл) при стійкій ремісії. Атопічна БА — наявність в анамнезі вказівки на атопію у родичів та позитивні шкірні проби з небактеріальними алергенами.

Генотипування по генах GSTT1 та GSTM1 було проведено для 150 хворих на БА дітей. Загальну геномну ДНК виділяли з крові згідно зі стандартним протоколом з використанням протейнази-К та додецилсульфату натрію як детергенту [1].

Виявлення делецій у генах GSTT1 та GSTM1 здійснювали методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Як позитивний контроль успішності ПЛР використовували ампліфікацію фрагментів гена BRCA1. Аналіз результатів ПЛР проводили методом електрофорузу у 2 % агарозному гелі [7]. Для візуалізації фрагментів ДНК гель забарвлювали етидієм бромідом та фотографували в ультрафіолетовому світлі на установці «GelDoc» 2000 (BioRad, США). Для визначення довжин отриманих фрагментів їх електрофоретичну рухливість порівнювали з рухливістю ДНК-маркера Gene Ruler DNA Leader Mix (Fermentas, Литва).

Очікувані довжини фрагментів ДНК (431 нп для GSTT1 та 120 нп для GSTM1) розраховували за допомогою

www.abdiibrahim.com.tr

Лікування астми та алергічного риніту



Вансейр, жувальні таблетки 4 мг*
 • Призначений для профілактики та тривалого лікування дітей віком 2-5 років із бронхіальною астмою.
 • Призначений для боротьби із денними та нічними симптомами у дітей віком 2-5 років із алергічним ринітом.

Вансейр, жувальні таблетки 5 мг**
 • Призначений для профілактики та тривалого лікування дітей віком 6-14 років із бронхіальною астмою.
 • Призначений для боротьби із денними та нічними симптомами у дітей віком 6-14 років із алергічним ринітом.

Вансейр, таблетки 10 мг, вкриті плівковою оболонкою***
 • Призначений для профілактики та тривалого лікування підлітків віком понад 15 років із бронхіальною астмою.
 • Призначений для боротьби із денними та нічними симптомами у підлітків віком понад 15 років та дорослих із алергічним ринітом.

*Регістраційне посвідчення UA/8807/01/01
 **Регістраційне посвідчення UA/8807/01/02
 ***Регістраційне посвідчення UA/8807/02/01

Для пацієнтів дитячого віку 2-5 років з алергічним ринітом
 Рекомендована добова доза: одна жувальна таблетка 4 мг, прийнята вранці або перед сном.

Для пацієнтів дитячого віку 6-14 років з алергічним ринітом
 Рекомендована добова доза: одна жувальна таблетка 5 мг, прийнята вранці або перед сном.

Для підлітків віком понад 15 років та дорослих з алергічним ринітом
 Рекомендована добова доза: одна таблетка 10 мг, прийнята вранці або перед сном.

Склад: монтелукаст натрію.

Фармакотерапевтична група. Протиастматичний засіб для системного застосування. Антагоністи лейкотриєнових рецепторів. Код АТХ R03D C03.

Показання. Профілактика астми та сезонного алергічного риніту у дітей та дорослих. Попередження денних та нічних симптомів захворювання та бронхоконструкції, спричиненої фізичним навантаженням, сезонні алергічні риніти, лікування астми у пацієнтів чутливих до ацетилсаліцилової кислоти.

Фармакологічні властивості. Монтелукаст після перорального прийому абсорбується швидко й майже повністю. Максимальна концентрація в плазмі досягається в середньому через 2 години після застосування таблетки натщесерце.

Побічні ефекти. В 1% пацієнтів спостігалась спрага, головний біль. Рідко реакції гіперчутливості.

Правила випуску. За рецептом.

Повна інформація міститься в інструкції для медичного використання препарату.

Інформація про лікарський засіб. Інформація для використання у професійній діяльності медичними і фармацевтичними працівниками.

Абді Ібрахім Ілч Санай А.Ш.
 Україна, 03113 Київ,
 проспект Перемоги 72 Б

ABDIIBRAHIM

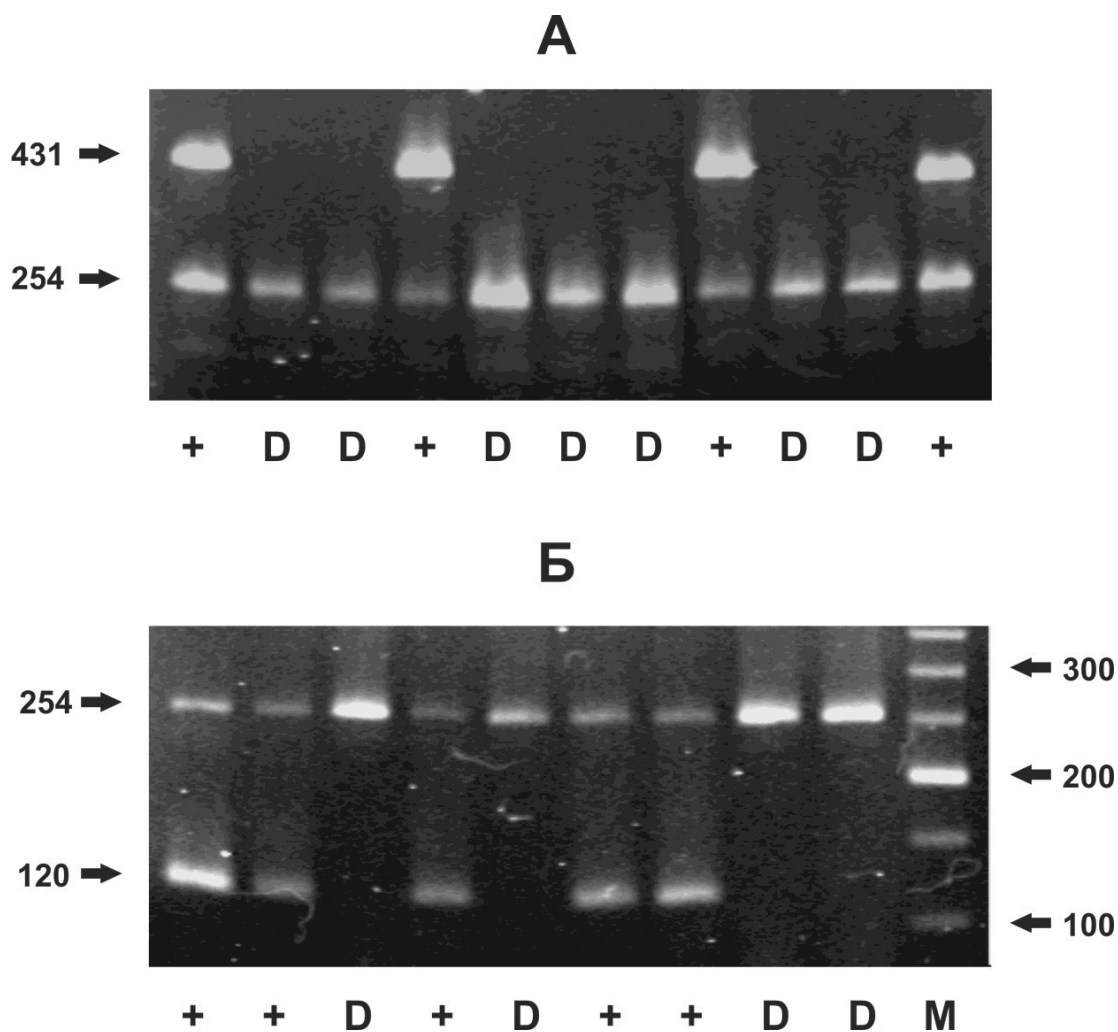


Рисунок. Результати електрофоретичного розділення ПЛР-фрагментів генів GSTT1 (А) та GSTM1 (Б)

Примітки: розмір фрагментів гена GSTT1 становить 431 нп, GSTM1 – 120 нп та BRCA1 (позитивний контроль ампліфікації) – 254 нп. Знаком + позначено генотипи T1+ та M1+, буквою D – генотипи T1del та M1del, а буквою М – фрагменти ДНК-маркера.

пакета програм комп'ютерної обробки даних «DNASTAR» із використанням послідовностей генів GSTT1 та GSTM1, які наявні у базі даних Genbank. Гомозиготні форми з делецією обох копій генів GSTT1 та GSTM1 ідентифікували за відсутністю відповідного фрагмента на електрофореграмі. Такі генотипи позначали як T1del та M1del. Відповідно, наявність цих фрагментів на електрофореграмах свідчила про гомо- або гетерозиготність по нормальній копії гена. Генотип таких пацієнтів позначали як T1+ та M1+ (рисунок).

Статистичну обробку одержаних результатів проводили на персональному комп'ютері з використанням пакета прикладних програм «Statistika 5.0».

Результати та їх обговорення

Встановлено, що один фенотип БА реєструвався у 26,3 % пацієнтів, поєднання двох фенотипів захворювання – у 43,5 %, поєднання трьох – у 21,8 %, чотирьох – у 8,1 % осіб.

Астма пізнього початку зареєстрована у 208 (55,9 %) обстежених пацієнтів. Середній вік початку захворювання в них становив $(9,0 \pm 0,9)$ року. У віці 6–8 років

захворювання почалося у 48,1 % пацієнтів, 9–12 років – 37,0 %, старше 13 років – 14,9 % дітей.

Тяжка БА виявлена у 103 (27,7 %) обстежених пацієнтів. Середня частота появи симптомів захворювання протягом тижня у них становила $(5,1 \pm 2,25)$, а частота госпіталізацій за рік – $(3,06 \pm 0,25)$. Частка дітей, у яких симптоми захворювання реєструвалися 1–2 рази на тиждень, становила 55,6 %. У 33,3 % обстежених пацієнтів симптоми астми з'являлися 3–4 рази протягом тижня, а в 11,1 % – 5 та більше разів. Встановлено, що майже половина (47,0 %) пацієнтів з тяжкою астмою потребували госпіталізації 3–4 рази протягом року. 1–2 рази впродовж року лікувалися у стаціонарі 40,8 % дітей, а більше 5 разів – 12,2 % дітей.

Еозинофільну форму астми виділено у 66 (17,7 %) пацієнтів. Частка еозинофілів в індукованому мокротинні цих дітей становила $(12,7 \pm 1,67)$ %. Доведено, що більше 6 % еозинофілів у мокротинні зареєстровано в 61,7 % обстежених пацієнтів, більше 12 % – у 40 % дітей. У кожної п'ятої дитини в цій групі частка еозинофілів в індукованому мокротинні становила 20 % та більше.

Частоти різних генотипів GSTT1 та GSTM1 у дітей, хворих на БА

Таблиця

Фенотипи астми	Кількість хворих, N	Розподіл генотипів GSTT1 та GSTM1							
		T1+ M1+		T1del M1+		T1+ M1del		T1del M1del	
		А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
Пізня	67	36	53,7	6	8,9	18	26,9	7	10,5
Атопічна	51	23	45,1	5	9,8	18	35,3	5	9,8
Фізичної напруги	51	19	37,2	10	19,8	18	35,3	4	7,8
Еозинофільна	46	21	45,6	7	15,2	13	28,3	5	10,9 ¹
Гіперреактивна	28	12	42,9	4	14,3	8	28,6	4	14,2 ²
Тяжка	72	31	43,0	6	8,3	25	34,7	10	13,9 ³

Примітки: А – абсолютна кількість пацієнтів з певним генотипом GST; Б – % відносно загальної кількості пацієнтів з певним фенотипом БА. Частота генотипу достовірно відрізняється ($p < 0,05$) у хворих на еозинофільну та неоеозинофільну (¹), гіперреактивну та негіперреактивну (²), тяжку та нетяжку (³) форми БА.

Атопічну форму БА діагностовано у 97 (26,1 %) обстежених хворих. Індекс атопії в даній групі дітей становив ($0,15 \pm 0,013$), а шкірні проби виявилися позитивними до всіх алергенів у ($81,5 \pm 12,9$) % випадків. Показано, що в 12,96 % випадків атопічної астми позитивною була шкірна проба з одним алергеном, а в 7,4 % – з двома. Індекс атопії більше 0,15 нами зареєстровано у 29,1 % випадків, а більше 0,25 – у 16,4 % хворих з даним фенотипом астми.

У 105 (28,2 %) обстежених пацієнтів діагностована астма фізичної напруги. У хворих цієї групи в 67,7 % випадків в анамнезі була вказівка на появу клінічних ознак бронхоспазму після фізичного навантаження. Індекс бронхоспазму в межах 15–20 % виявився у 38,5 % хворих даної групи, 21–25 % – у 26,1, вище 26 % – у 35,4 пацієнтів.

Доведено, що гіперреактивна БА була присутня у 46 (12,36 %) обстежених хворих. Показник РК20Н у цій групі дітей становив ($0,24 \pm 0,03$) мг/мл. У 57,9 % обстежених пацієнтів даної групи показник РК20Н становив менше 0,2 мг/мл.

За результатами генотипування встановлено, що генотип T1+M1+ зареєстровано у 69 (46,0 %) дітей, T1delM1+ – у 19 (12,7 %) пацієнтів, T1+M1del – у 48 (32,0 %) хворих та комбінація T1delM1del – у 14 (9,3 %) обстежених пацієнтів. Це означає, що частота алеля T1del у дослідженій групі дітей становить 20,1 %, а M1del – 37,8 %. Раніше при вивченні поширеності поліморфізму генів GSTT1 та GSTM1 в українській популяції було встановлено, що у здорових новонароджених частота алеля T1del становить у ($20,0 \pm 6,3$) %, а GSTM1 – у ($47,5 \pm 7,9$) % [3]. Зіставлення цих даних із нашими результатами показує відсутність достовірної різниці у поширеності делецій генів GSTT1 та GSTM1 між здоровими та хворими на БА дітьми.

При вивченні частоти алелів T1del та M1del у дітей з різними фенотипами БА нами були отримані результати, представлені в таблиці.

Отримані нами дані дають підставу стверджувати, що генотип T1delM1+ в 1,5–2,4 разу частіше реєструється при астмі фізичної напруги, еозинофільній та гіперреактивній формі захворювання. Генотип T1+M1del найчастіше зустрічається у хворих на астму фізичного навантаження, атопічну та тяжку, хоча різниця між різними фенотипами у цьому випадку була значно меншою, ніж у попередньому. Одночасна втрата генів GSTT1 та GSTM1 (генотип T1delM1del) частіше реєструвалася при гіперреактивній, тяжкій та еозинофільній формах захворювання.

Крім того, встановлено, що генотип T1delM1del у хворих з тяжкою (13,9 %) та гіперреактивною (14,2 %) БА зустрічався вірогідно частіше, ніж у їх однолітків, що хворіють на не гіперреактивну та середньотяжку астму – 3,6 % та 5,6 % відповідно ($p < 0,05$).

Таким чином, у дітей шкільного віку за різних фенотипів БА (як і у здорових дітей) найбільш часто зустрічалися генотипи T1+M1+ та T1+M1del. Генотип T1delM1del, який призводить до одночасної втрати активності двох ізоформ GST, хоча і зустрічався лише у 9,3 % обстежених нами пацієнтів, але був частіше зареєстрований у хворих на тяжку та гіперреактивну форми БА. Так, тяжку форму БА виявлено у 10 з 14 носіїв цього генотипу (71,4 %), тоді як у носіїв генотипу T1+M1+ – лише у 31 з 69 (44,9 %) пацієнтів.

Отримані дані дозволяють стверджувати, що визначення генотипів GST у хворих на БА надасть можливість прогнозувати подальший перебіг захворювання та розробити індивідуалізовані підходи до лікування.

Висновки

1. Дітям, що страждають на бронхіальну астму, притаманні фенотипові особливості перебігу захворювання, які слід враховувати при обґрунтуванні індивідуалізованого лікування.

2. Генотип T1delM1+ найбільш часто реєструється при астмі фізичної напруги, еозинофільній та гіперреактивній

формах захворювання, а генотип T1delM1del — при гіперреактивній, тяжкій та еозинофільній формах захворювання.

3. Одночасна відсутність у пацієнтів обох ізоформ GST (генотип T1delM1del) суттєво збільшує імовірність розвитку тяжкої форми БА.

Література

1. Выделение ДНК из крови // Практическая молекулярная биология. — Режим доступа : <http://molbiol.edu.ru/>.
2. Дедков, А. А. Исследование полиморфизма ILE105VAL гена GSTP1 с развитием атопической бронхиальной астмы у детей в Курской области [Текст] / А. А. Дедков, А. Д. Богомазов, В. П. Иванов [и др.] // Человек и его здоровье. — 2011. — № 1. — С. 31–35.
3. Знаменська, Т. К. Аналіз поліморфізму генів GSTT1, GSTM1 у новонароджених, які перенесли перинатальну асфіксію [Текст] / Т. К. Знаменська, Н. Г. Горовенко, В. І. Похилько [та ін.] // Педіатрія, акушерство та гінекологія. — 2009. — Т. 71, № 5. — С. 28–29.
4. Иванов, В. П. Анализ ассоциации делеционных полиморфизмов генов глутатион-трансфераз GSTT1 та GSTM1с предрасположенностью к бронхиальной астме и особенности ее клинических проявлений в Курской популяции [Текст] / В. П. Иванов, А. В. Полоников, А. М. Солодилова [и др.] // Человек и его здоровье. — 2005. — № 3. — С. 49–55.
5. Лапшин, В. Ф. Астма-фенотипы в детском возрасте [Текст] / В. Ф. Лапшин, Т. Р. Уманец // Здоров'я України. — 2009. — № 4/1. — С. 12–14.
6. Либбердовская, Е. Д. Фенотипическая характеристика больных с бронхиальной астмой [Текст] / Е. Д. Либбердовская, И. И. Черкашина, С. Ю. Никулина [и др.] // Сибирский мед. журн. — 2008. — № 1. — С. 38–40.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М. : Мир, 1984. — 480 с.
8. Полоников, А. В. Эколого-токсикологическая концепция мультифакторных заболеваний: от понимания этиологии до клинического применения [Текст] / А. В. Полоников, В. П. Иванов, М. А. Солодилова // Мед. генетика. — 2008. — № 11. — С. 3–10.
9. Протокол діагностики та лікування бронхіальної астми в дітей: наказ МОЗ України від 27.12.2005 р. № 767.
10. Тяжка, О. В. Вплив поліморфних варіантів генів GSTT1 та GSTM1 на перебіг алергічної патології у дітей [Текст] / О. В. Тяжка, Н. Г. Горовенко, Ю. О. Савенко [та ін.] // Проблеми спадкової та мультифакторної патології: науково-практична конференція з міжнародною участю: Мат. конф. — К., 2012. — С. 108–109.
11. Beckett, G. J. Glutathione S-transferases: biomedical applications [Text] / G. J. Beckett, J. D. Hayes // Adv. Clin. Chem. — 1993. — Vol. 30. — P. 281–380.
12. Carrol, W. D. Maternal glutathione S-transferase GSTP1 genotype is a specific predictor of phenotype in children with asthma [Text] / W. D. Carrol, F. Lenney // Pediatr. Allergy Immunol. — 2005. — Vol. 1, № 16. — P. 32–39.
13. Global initiative for asthma [Text] // Pocket guide for asthma management and prevention. — 2009. — 30 p.
14. Global initiative for asthma [Text] // Pocket guide for asthma management and prevention. — 2004. — 30 p.
15. Pemble, S. Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism [Text] / S. Pemble, K. R. Shroeder, S. P. Meyer [et all.] // Biocem. J. — 1994. — Vol. 300. — P. 271–276.
16. Wilce, M. C. Structure and function of glutathione S-transferases [Text] / M. C. Wilce, M. W. Parker // Biochim. Biophys. Acta. — 1994. — Vol. 1205 (1). — P. 1–18.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗ T1 И M1 (GSTT1 та GSTM1)

Л. А. Иванова, Р. А. Волков

Резюме. На базе пульмоаллергологического отделения областной детской клинической больницы г. Черновцы обследовано 372 ребенка, больных бронхиальной астмой, из которых 150 больным проведено генотипирование глутатион-S-трансфераз T1 и M1. В работе показано, что детям, которые болеют бронхиальной астмой, присущи фенотипические особенности течения заболевания, которые нужно учитывать при обосновании индивидуализированного лечения. Доказано, что генотип T1delM1+ наиболее часто регистрируется при астме физического напряжения, эозинофильной и гиперреактивной формах заболевания, а генотип T1delM1del — при гиперреактивной, тяжелой и эозинофильной формах заболевания. Одновременное отсутствие у пациентов обеих изоформ глутатион-S-трансфераз (генотип T1delM1del) существенно увеличивает вероятность развития тяжелой формы БА.

Ключевые слова: бронхиальная астма, дети, полиморфизм, глутатион-S-трансфераза.

PHENOTYPIC PECULIARITIES OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN DEPENDING UPON GENES' POLYMORPHISM OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE T1 AND M1 (GSTT1 AND GSTM1)

L. A. Ivanova, R. A. Volkov

Summary. 372 children with bronchial asthma were examined at the department of pulmonary diseases and allergology of the Chernivtsi regional clinical hospital. Genotyping of glutathione S-transferase T1 and M1 was done in 150 patients. The study shows that phenotypic peculiarities in the course of disease are common to children with bronchial asthma and they are to be considered when the individualized therapy is specified. It is proved that genotype T1delM1+ is most commonly registered with activity-induced asthma, eosinophilic and hyperreactive form of the disease, whereas genotype T1delM1del — with hyperreactive, severe and eosinophilic form of the disease. Simultaneous absence of the both isoforms of glutathione S-transferase (genotype T1delM1del) remarkably increases the plausibility of the severe form of bronchial asthma development.

Key words: Bronchial asthma, children, polymorphism, glutathione S-transferase.