

УДК 616.248-053.2-079:575.204.2

Л. А. Іванова

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Поліморфізм генів глутатіон-S-трансферази T1, M1 та неспецифічна гіперсприйнятливості бронхів при еозинофільній бронхіальній астмі у дітей

Ключові слова: діти, бронхіальна астма, гени системи біотрансформації ксенобіотиків.

Бронхіальна астма (БА) — одне з найбільш поширених захворювань людини у всіх вікових групах, тяжкі форми якого часто призводять до інвалідизації та зниження якості життя пацієнтів, що створює значну медико-соціальну проблему. Це типове мультифакторне захворювання, в основі якого лежить складний характер взаємодії генетичних чинників та факторів зовнішнього середовища [1].

Профілактика БА побудована з урахуванням досягнень сучасної алергології, але все ж характеризується доволі низькою ефективністю. Слабкі сторони сучасних лікувально-профілактичних комплексів, представлених у вигляді узгоджувальних протоколів та рекомендацій, значною мірою пов'язані з існуванням різних варіантів БА та різних фенотипів захворювання. Це вимагає індивідуального підходу до лікування БА. З цієї позиції, комплексне урахування показників гіперсприйнятливості дихальних шляхів та характеру запалення, які багато в чому визначають поліморфізм БА, може вважатися перспективним щодо вдосконалення індивідуальних лікувально-профілактичних заходів.

Враховуючи еколого-токсикологічну основу розвитку багатьох мультифакторних захворювань [2], в тому числі БА, представляється доцільним 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 більше 20 генів

[3, 4], 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 окислювального стресу, канцерогенів та лікарських препаратів.

У популяціях людини широко поширений поліморфізм по 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 [5, 6].

З літературних джерел відомі дослідження, присвячені вивченню зв'язку між поліморфізмом генів GSTT1, GSTM1 та БА у дітей та дорослих [7–9]. Проте вони є неоднозначними та не враховують особливості різних фенотипів БА, що виникають в результаті взаємодії чинників зовнішнього середовища та генетичної схильності до розвитку даного захворювання. Зокрема, наразі залишається відкритим питання щодо фенотипових особливостей даного захворювання та їх взаємозв'язку з поліморфізмом генів ФБК.

Мета дослідження — з'ясувати взаємозв'язок між наявністю делецій у генах GSTT1 та GSTM1 та неспецифічною гіперсприйнятливостю бронхів у дітей, хворих на еозинофільну БА.

Матеріали та методи дослідження

В умовах пульмо-алергологічного відділення обласної дитячої клінічної лікарні м. Чернівці обстежено 114 дітей

шкільного віку, хворих на БА. Середній вік пацієнтів становив $(11,1 \pm 0,3)$ року; серед обстежених було 79,4 % хлопчиків. Всім дітям проведено комплексне обстеження, що включало оцінку неспецифічної гіперсприйнятливості бронхів. Діагноз БА встановлювали з урахуванням міжнародних стандартів GINA 2009 [10] та наказу МОЗ України [11]. Враховуючи оприлюднені дані про вірогідність існування різних фенотипів залежно від типу запалення дихальних шляхів, які зумовлюють особливості перебігу БА в дітей, виділено 2 фенотипи захворювання у вказаній когорті пацієнтів [10, 12–14]. Еозинофільний фенотип БА визначався в тому випадку, коли у хворих в мокротинні, яке отримували після інгаляції гіпертонічного розчину NaCl, реєстрували 3 % і більше еозинофільних лейкоцитів (I клінічна група). Нееозинофільний характер запалення бронхіального дерева (II клінічна група) діагностували при відносному вмісті у цитогамі клітинного осаду менше 3 % еозинофілів або за їх відсутності [15].

Серед обстежених пацієнтів еозинофільну астму було діагностовано у 68 хворих. Середній вік дітей I клінічної групи становив $(11,4 \pm 0,8)$ року, частка мешканців міста – 45,5 %, частка хлопчиків – 67,6 %. Другу клінічну групу (нееозинофільна астма) сформували 46 хворих, середній вік яких становив $(10,9 \pm 0,5)$ року, серед них хлопчиків було 67,4 % ($p > 0,05$), а мешканців міста – 39,1 % ($p > 0,05$).

Генотипування по генах GSTT1 та GSTM1 було проведено для 88 хворих на БА дітей в лабораторії кафедри молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету ім. Ю. Федьковича (зав. д-р. біол. наук, проф. Р. А. Волков). Загальну геномну ДНК виділяли з крові згідно зі стандартним протоколом з використанням протеїнази K та додецилсульфату натрію як детергента [16].

Виявлення делецій у генах GSTT1 та GSTM1 здійснювали методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Аналіз результатів ПЛР проводили методом електрофорезу у 2 % агарозному гелі [17]. Очікувані довжини фрагментів ДНК (431 нп для GSTT1 та 120 нп для GSTM1) розраховували за допомогою пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR із використанням послідовностей генів GSTT1 та GSTM1, які наявні у базі даних Genbank. Гомозиготні форми із делецією обох копій генів GSTT1 та GSTM1 ідентифікували за відсутністю відповідного фрагменту на електрофореграми. 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+.

Неспецифічну гіперсприйнятливості бронхів оцінювали за допомогою спірографічної проби з гістаміном з урахуванням як гіперчутливості дихальних шляхів (PK20Г), так і їх гіперреактивності за даними дозозалежної кривої (ДЗК) [18]. Лабільність бронхів вивчали у вигляді показника лабільності бронхів (ПЛБ), який є оцінкою їх спазму після дозованого фізичного навантаження (ІБС-індекс бронхоспазму) та бронходилатації після інгаляції салбутамолу (ІБД-індекс бронходилатації) [18].

Отримані результати дослідження аналізували методом біостатистики за допомогою пакету прикладних програм «STATISTICA 7.0» StatSoft Inc. та Excel XP для Windows на персональному комп'ютері. Для визначення вірогідності різниці показників у порівнюваних групах застосовували коефіцієнт Ст'юдента. Статистично значимими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Зважаючи на той факт, що БА – типове мультифакторне захворювання, в розвитку якого суттєву роль відіграють як фактори зовнішнього середовища, так і генетична схильність до його розвитку, представлялося доцільним вивчити поліморфізм генів глутатіон-S-трансфераз T1 та M1 у хворих з різним типом запалення дихальних шляхів (табл. 1).

Отримані результати генотипування дають підставу стверджувати, що генотип T1delM1+ частіше (15,5 %) реєструється при еозинофільній БА, ніж при нейтрофільному типі запалення дихальних шляхів (11,6 %). Генотип T1+M1del частіше реєструвався у дітей з нееозинофільним фенотипом захворювання (32,6 %), ніж у їх однолітків, що хворіють на еозинофільну БА (28,9 %). Генотип T1delM1del, який призводить до одночасної втрати активності двох ізоформ GST, з однаковою частотою реєструвався у хворих з різним типом запалення дихальних шляхів. При цьому тяжка форма захворювання виявлена у 4 із 5 носіїв генотипу T1delM1del (80 %) у пацієнтів з еозинофільною астмою та у 2 із 5 носіїв (40 %) з нейтрофільним типом запалення дихальних шляхів. Водночас, у носіїв генотипу T1+M1+ тяжка форма захворювання діагностована у 12 із 21 (57,1 %) пацієнтів з еозинофільною БА та у 8 із 19 (42,1 %) – при нееозинофільному типі запалення дихальних шляхів. Таким чином, у хворих з еозинофільним фенотипом БА, які мають генотип T1delM1del, захворювання частіше перебігало у важкій формі.

В цілому, слід зазначити, що практично у половини хворих обох груп мала місце делеція генів глутатіон-S-трансфераз.

Враховуючи наявність делецій у генах ферментів біотрансформації ксенобіотиків у обстежених дітей, можна було припустити уповільнення в них процесів детоксикації, що призводить до зміни неспецифічної гіперсприйнятливості бронхів.

Доведено, що при еозинофільному фенотипі БА частка дітей, що захворіли у віці старше 6 років, становила $(51,2 \pm 5,4)$ %, а при нееозинофільній астмі – $(52,6 \pm 5,7)$ %, $p > 0,05$. Водночас, у дітей із «раннім початком» БА (до 3 років включно) дещо частіше реєструвався еозинофільний фенотип захворювання – в $(32,1 \pm 5,2)$ % випадків. Натомість, у хворих з нееозинофільним типом БА «ранній початок» захворювання реєструвався в $(26,3 \pm 5,0)$ % спостережень ($p > 0,05$). Незважаючи на те, що легкий та важкий перебіг захворювання реєструвався дещо частіше при еозинофільному фенотипі БА, частка дітей із середньотяжким перебігом захворювання вірогідно більша при нееозинофільному типі запалення дихальних шляхів $(55,3 \pm 5,7)$ % порівняно з еозинофільним фенотипом $(39,3 \pm 5,3)$, $p < 0,05$.

Таблиця 1

Частоти різних генотипів GSTT1 та GSTM1 у обстежених дітей

Фенотипи астми	Кількість хворих, N	Розподіл генотипів GSTT1 та GSTM1							
		T1+ M1+		T1del M1+		T1+ M1del		T1del M1del	
		A	Б	A	Б	A	Б	A	Б
Еозинофільний	45	21	46,6	7	15,5	13	28,9	5	11,1
Нееозинофільний	43	19	44,2	5	11,6	14	32,6	5	11,6

Примітки: А – абсолютна кількість пацієнтів з певним генотипом GST; Б – відсоток відносно загальної кількості пацієнтів з певним фенотипом БА.

При дослідженні мокротиння встановлено, що частка еозинофілів у пацієнтів I клінічної групи становила $(12,7 \pm 1,7) \%$, а в групі порівняння – $(1,57 \pm 0,1) \%$.

У таблиці 2 наведено результати вивчення показників гіперсприйнятливості бронхів при еозинофільній та неоеозинофільній астмі у дітей.

Незважаючи на те, що показник лабільності бронхів суттєво не відрізнявся в групах порівняння, все ж мала місце тенденція до підвищення індексу бронходилатації серед хворих з неоеозинофільною астмою та індексу бронхоспазму у дітей з еозинофільною астмою. Так, індекс бронходилатації менше 10,0 % реєстрували у 56,0 % хво-

рих I клінічної групи та у 40,0 % дітей II групи. Показник гіперчутливості бронхів ПК20Г менше 1,0 мг/мл зустрічався частіше у хворих з еозинофільною астмою (60,9 %) порівняно з пацієнтами, тип запального процесу в бронхах яких визначався як неоеозинофільний (47,0 %). Показник гіперреактивності бронхів за даними дозозалежної кривої більше 2,5 у.о. у хворих I клінічної групи реєструвався у 32,5 % випадках проти 18,1 % – в II групі.

Крім того, було вивчено залежність показників неспецифічної гіперсприйнятливості бронхів при еозинофільній астмі від наявності у хворого делецій у генах глутатіон-S-трансфераз T1 та M1 (табл. 3).

Таблиця 2

Показники гіперсприйнятливості бронхів у дітей груп порівняння

Фенотипи бронхіальної астми	Показники лабільності бронхів, %			Показники гіперсприйнятливості бронхів	
	Індекс бронходилатації	Індекс бронхоспазму	Показник лабільності бронхів	Показник гіперчутливості, ПК20Г, мг/мл	Показник гіперреактивності, ДЗК, у.о.
Еозинофільна (n=68)	$12,9 \pm 1,4$	$10,8 \pm 1,8$	$24,6 \pm 2,7$	$1,55 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,1$
Нееозинофільна (n=46)	$17,5 \pm 2,9$	$8,8 \pm 1,2$	$24,6 \pm 3,4$	$2,2 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,1$
Pt	НВ	НВ	НВ	НВ	НВ

Примітка: НВ – не визначали.

Таблиця 3

Показники гіперсприйнятливості бронхів у дітей, хворих на еозинофільну астму, залежно від наявності делецій у генах GSTT1 та GSTM1

Генотип GSTT1 та GSTM1	Показники лабільності бронхів, %			Показники гіперсприйнятливості бронхів	
	Індекс бронходилатації	Індекс бронхоспазму	Показник лабільності бронхів	Показник гіперчутливості, ПК20Г, мг/мл	Показник гіперреактивності, ДЗК, у.о.
T1+M1+ (n=21)	$12,5 \pm 2,4$	$10,9 \pm 2,5$	$21,6 \pm 3,5$	$0,25 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$
T1+M1del; T1delM1+; T1delM1del (n=25)	$11,4 \pm 2,0$	$14,7 \pm 2,9$	$25,4 \pm 4,1$	$1,3 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,2$
Pt	НВ	НВ	НВ	<0,05	НВ

Примітка: НВ – не визначали.

На підставі отриманих даних можна стверджувати, що у хворих на еозинофілну астму, які є носіями дефектних алелів генів *GSTT1* та *M1* у гомозиготному стані, реєструвалася тенденція до підвищення лабільності бронхів за рахунок більш вираженого бронхоспазму, а показник гіперреактивності бронхів виявився достовірно вищим, ніж у дітей з функціонально повноцінними алелями цих генів. Отже, генетично зумовлена відсутність активності окремих ферментів системи біотрансформації ксенобіотиків, зокрема *GSTT1* та *M1*, може бути причиною більш високої лабільності бронхів.

Отримані результати досліджень дозволяють стверджувати, що визначення генотипів *GST* у хворих на еозинофілну БА з урахуванням їх гіперсприйнятливості бронхів дозволить прогнозувати подальший перебіг захворювання та розробити індивідуалізовані підходи до лікування.

Висновки

1. Генотип *T1delM1+* частіше реєструється при еозинофілній БА, а генотип *T1+M1del* — у хворих з неоеозинофілним фенотипом захворювання.
2. Генотип *T1delM1del* з однаковою частотою реєстрували у хворих з різним типом запалення дихальних шляхів.
3. Серед хворих на еозинофілну астму мала місце тенденція до підвищення індексу бронхоспазму, а серед хворих з неоеозинофілним фенотипом — індексу бронходилатації.
4. У хворих на еозинофілну астму, які є носіями дефектних алелів генів *GSTT1* та *M1* у гомозиготному стані, реєструвалася тенденція до підвищення лабільності бронхів за рахунок більш вираженого бронхоспазму, а показник гіперреактивності бронхів виявився достовірно вищим, ніж у дітей з функціонально повноцінними алелями цих генів.

Список літератури

1. 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 // Человек и его здоровье. — 2011. — № 1. — С. 31–35.
2. 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.
3. Тяжка, О. В. Вплив поліморфних варіантів генів *GSTT1* та *GSTM1* та *GSTP1* на перебіг алергічної патології у дітей [Текст] / О. В. Тяжка, Н. Г. Горовенко, Ю. В. Савенко // Проблеми спадкової та мультифакторної патології: науково-практична конференція з міжнародною участю: Мат. конф. — К., 2012. — С. 108–109.
4. 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.
5. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion [Text] / J. Seidegard, W. R. Vorachek, R. W. Pero, R. W. Pearson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1988. — Vol. 85. — P. 7293–7297.
6. Human glutathione S-transferase Theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism / S. Pemble, K. R. Schroeder, S. R. Spence [et al.] [Text] // Biochem. J. — 1994. — Vol. 300. — P. 271–276.

7. Анализ ассоциации делеционных полиморфизмов генов глутатионтрансфераз *GSTT1* та *GSTM1* с предрасположенностью к бронхиальной астме и особенности ее клинических проявлений в Курской популяции / В. П. Иванов, А. В. Полоников, А. М. Солодилова [и др.] [Текст] // Человек и его здоровье. — 2005. — № 3. — С. 49–55.

8. Beckett, G. J. Glutathione S-transferases: biomedical applications / G. J. Beckett, J. D. Hayes [Text] // Adv. Clin. Chem. — 1993. — Vol. 30. — P. 281–380.

9. Carroll, W. D. Maternal glutathione S-transferase *GSTP1* genotype is a specific predictor of phenotype in children with asthma [Text] / W. D. Carroll, F. Lenney // Pediatr. Allergy Immunol. — 2005. — Vol. 1, № 16. — P. 32–39.

10. Global initiative for asthma // Pocket guide for asthma management and prevention. — 2009. — 30 p.

11. Протокол діагностики та лікування бронхіальної астми в дітей: Наказ МОЗ України від 27.12.2005 р. № 767.

12. Безруков, Л. О. Хронічне запалення дихальних шляхів та атопія — характерні особливості бронхіальної астми в дітей [Текст] / Л. О. Безруков, О. К. Колоскова // Здоровье ребенка. — 2008. — № 1 (10). — С. 42–45.

13. Лапшин, В. Ф. Астма-фенотипы в детском возрасте [Текст] / В. Ф. Лапшин, Т. Р. Уманец // Здоров'я України. — 2009. — № 4/1. — С. 12–14.

14. Indirect airway challenges [Text] / G. F. Joos, B. O'Connor, S. D. Anderson [et al.] // Eur. Respir. J. — 2003. — Vol. 21. — P. 1050–1068.

15. Douwes, J. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms [Text] / J. Douwes, P. Gibson, J. Pekkanen, N. Pearce // Thorax. — 2004. — Vol. 57. — P. 643–648.

16. Выделение ДНК из крови. Практическая молекулярная биология [Электронный ресурс]. — Режим доступа : <http://mol-biol.edu.ru/>.

17. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование [Текст] / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. — М.: Мир, 1984. — 480 с.

18. Спирометрия и пикфлоуметрия при бронхиальной астме у детей (практика оценки и мониторинга) [Текст] / Под ред. И. М. Воронцова. — СПб.: ГПМА, 2007. — 68 с.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ T1, M1 И НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ГИПЕРВОСПРИИМЧИВОСТЬ БРОНХОВ ПРИ ЭОЗИНОФИЛЬНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У ДЕТЕЙ

Л. А. Иванова

Резюме

С целью изучения взаимосвязи между наличием делеций в генах *GSTT1* и *GSTM1* и неспецифической гипервосприимчивостью бронхов у детей, больных эозинофильной бронхиальной астмой (БА), в условиях пульмо-аллергологического отделения областной детской клинической больницы г. Черновцы комплексно обследовано 114 пациентов школьного возраста. Эозинофильная астма (I клиническая группа) была диагностирована у 68 больных. Вторую клиническую группу (неэозинофильная астма) сформировали 46 пациентов. Показано, что генотип *T1delM1+* чаще регистрировался при эозинофильной БА, а генотип *T1+M1del* — у больных с нейтрофильным фенотипом заболевания. В то же время, генотип *T1delM1del* с одинаковой частотой регистрировался у больных с разным типом воспаления дыхательных путей, а у пациентов с эозинофильной БА ассоциировал с тяжелым течением заболевания. У больных с эозинофильной астмой, которые являются носителями дефектных аллелей генов *GSTT1* и *M1* в гомозиготном состоянии, регистрировалась тенденция к повышению лабільности бронхов за счет более выраженного бронхоспазма, а показатель гиперреактивности бронхов у них был достоверно выше, чем у детей с функционально полноценными алелями этих генов.

Таким образом, генетически обусловленное отсутствие активности отдельных ферментов системы биотрансформации ксенобиотиков, в частности *GSTT1* и *M1*, может быть причиной

более высокой лабильности бронхов. Определение генотипов глутатион-S-трансфераз у больных с эозинофильной БА с учетом их гипервосприимчивости бронхов позволит прогнозировать дальнейшее течение заболевания и разработать индивидуализированные подходы к лечению.

Ключевые слова: дети, бронхиальная астма, гены системы биотрансформации ксенобиотиков.

Научно-практический журнал «Астма и аллергия», 2015, № 2

Л. А. Иванова

д-р мед. наук, профессор

ГУ «Буковинский государственный медицинский университет»

58002, Украина, г. Черновцы, Театральная площадь, 2,

тел.: +38(037)255-37-54

e-mail: lorina.ivanova@gmail.com

**GENE POLYMORPHISM OF GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE
T1, M1 AND NON-SPECIFIC HYPERRESPONSIVENESS
OF BRONCHUSES UNDER EOSINOPHILIC BRONCHIAL
ASTHMA IN CHILDREN**

L. A. Ivanova

Summary

To establish the relationship between the presence of deletions in the genes *GSTM1*, *GSTT1* and non-specific bronchial hyperresponsiveness in, suffered from eosinophilic asthma, in pulmoallergological department of Chernivtsi Regional Clinical Hospital were examined 114 school age patients. Eosinophilic asthma (I clinical group) was diagnosed in 68 patients. 46 patients were formed the II clinical group (uneosinophilic asthma). Was established that genotype *T1delM1+* often recorded in eosinophilic bronchial asthma and genotype *T1+M1del* + often

recorded in patients with uneosinophilic phenotype of disease. However, genotype *T1delM1del* with equal frequency was met in patients with different types of airway inflammation, also in patients with eosinophilic asthma was associated with severe variant of disease. In patients with eosinophilic asthma, who were carriers of the defective alleles of genes *GSTT1* and *M1* in the homozygous state, was recorded a tendency to increase bronchial lability by more expressive bronchospasm and bronchial hyperreactivity rate was significantly higher than in children with functional full alleles of these genes.

So genetically caused lack of activity of some enzymes of xenobiotics biotransformation, including *GSTT1* and *M1*, can cause a higher bronchial lability.

Thus, identification of genotypes of glutathione-S-transferases in patients with eosinophilic asthma considering airway hyperresponsiveness will predict the future course of the disease and develop individualized treatment approaches.

Key words: children, bronchial asthma, genes of biotransformation system of xenobiotics.

Theoretical and practical J. «Asthma and Allergy», 2015, 2

L. A. Ivanova,

PhD., MD., Professor

SI «Bukovinian State Medical University»

58002, Ukraine, Chernivtsi,

Theatre Square, 2,

tel.: +38(037)255-37-54

e-mail: lorina.ivanova@gmail.com