

## ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ЭКОГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ТЕЧЕНИЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

**Колоскова Елена Константиновна**

Доктор медицинских наук,  
заведующий кафедры педиатрии и детских инфекционных болезней  
Буковинский государственный медицинский университет

**Билоус Татьяна Михайловна**

кандидат медицинских наук,  
доцент кафедры педиатрии и детских инфекционных болезней  
Буковинский государственный медицинский университет

**Билык Галина Анатольевна**

аспирант кафедры педиатрии и детских инфекционных болезней  
Буковинский государственный медицинский университет

**Билык Сергей Викторович**

кандидат медицинских наук  
Центр травматологии и ортопедии

### FEATURES OF INFLUENCE OF ECOGENETIC FACTORS ON THE FLOW OF BRONCHIAL ASTHMA IN SCHOOL-AGE CHILDREN

*Koloskova E.K. Doctor of medical sciences, professor, head of the department Department of Pediatrics and Pediatric Infectious Diseases Bukovinian State Medical University*

*Bilous T.M. Candidate of medical sciences, associate professor Department of Pediatrics and Pediatric Infectious Diseases Bukovinian State Medical University*

*Bilyk G. A. PhD student Department of Pediatrics and Pediatric Infectious Diseases Bukovinian State Medical University*

*Bilyk S.V. Candidate of medical sciences Center of traumatology and orthopaedy*

#### АННОТАЦИЯ

На базе областной детской клинической больницы г. Черновцы (Украина) проведено комплексное клинико-инструментальное обследование 30 больных школьников в межприступном периоде бронхиальной астмы (БА). По результатам молекулярно-генетического исследования генов семейства глутатион-S-трансферазы, обнаружена роль определенных экогенетических факторов на течение патологии. Наличие признаков делеционного полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1 ассоциировалось с фенотипом астмы «раннего начала» и тяжелым течением заболевания. У детей без делеционного полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1 преобладали тенденции к позднему дебюту и легкому течению БА.

#### ABSTRACT

On the base of the Chernivtsi regional children's hospital (Ukraine) carried out comprehensive clinical and instrumental examination of 30 school-age children with attack-free interval of bronchial asthma. According to the results of molecular genetic investigation of gene family of glutathione-S-transferase, discovered the role of certain factors on ecogenetic for pathology. Existence of GSTT1 gene deletion polymorphism and GSTM1, associated with the phenotype of asthma, "early start" and severe disease. In children without deletion polymorphism of GSTM1 and GSTT1 genes there was tendency for late debut and mild asthma.

*Ключевые слова: бронхиальная астма, делеционный полиморфизм генов, экогенетические факторы, школьники.*

*Keywords: bronchial asthma, gene deletion polymorphism, ecogenetic factors, school-age children.*

Введение. Бронхиальная астма относится к числу полигенно унаследованной патологии, в реализации которой решающая роль принадлежит факторам внешней среды. В настоящее время показано, что многие гены могут взаимодействовать между собой при БА или атопии, повышая или снижая риск развития заболевания.

В частности, полиморфизм генов, кодирующих ферменты II фазы детоксикации, влияет на функциональность данных ферментов в легких и других органах, повышает генетическую предрасположенность к окислительному стрессу и БА [1-2]. Однако, в многоцентровом исследовании, проведенном в Испании (AMICS), к которому привлекли более 400 детей, связь генов GSTM1 и GSTT1 не подтвердилась, а GSTP1 генотип ассоциировал с свистящими хрипами с соотношением шансов 2,3. Сейчас для генов GSTM1 и GSTT1 найдены нулевые аллели, которые не имеют активного продукта гена, причем в Германии нулевой генотип GSTM1 случается в 51,6% населения, а GSTT1

- в 17,8% [3]. Отдельными работами продемонстрировано повышенный риск развития БА под действием табачного дыма при нулевых генотипах GSTM1 или GSTT1 [4]. В Саутгемптонском исследовании, в котором обследовали 341 семью, не обнаружено влияния генов GSTM1 и GSTT1 на лечение и течение БА или бронхообструкции, но отмечена связь нулевого генотипа GSTT1 с увеличением тяжести бронхиальной астмы [5]. В исследовании, проведенном в Дании, выявлено определенное влияние GSTM1 на развитие БА, а также отсутствие такого влияния для GSTP1, и в то же время значительная связь атопии с нулевым геном GSTT1, что свидетельствует о возможном риске для астмы полиморфизма этих генов [6].

Вместе с тем, постоянно причинами недостаточного контроля является влияние внешних факторов, например, неправильная техника использования ингалятора или ложная первичная оценка тяжести астмы, влияние табачного дыма, сопутствующая аллергическая патология,

индивидуальные (в т.ч. генетические) особенности ответа на терапию, низкий комплаенс [7, 8]. Исходя из этого, изучение особенностей течения заболевания у детей с учетом результатов молекулярно-генетического обследования, позволит предоставить всестороннюю характеристику вклада изученных генетических факторов и факторов окружающей среды в персистенции астмы в детском возрасте.

Цель исследования. Для улучшения контролируемости бронхиальной астмы у детей школьного возраста исследовать влияние на её течение экогенетических факторов на основании результатов комплексного клинико-инструментального обследования.

Материал и методы. Проведенное комплексное клинико-инструментальное обследование 30 больных школьников в межприступном периоде БА. В состав 1 подгруппы вошли 16 школьников, больных БА, с генотипом GSTT1 + M1 +, средний возраст которых достигал  $12,5 \pm 0,81$  (95% ДИ 10,78-14,22) года, а доля мальчиков составляла 75,0%. Пациенты с признаками делеционного полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1 сформировали 2 подгруппы сравнения. Количество таких детей составляла 14 больных, мальчиков среди них было 71,43% ( $P > 0,05$ ), а средний возраст составлял  $10,43 \pm 0,79$  (95% ДИ 8,72-12,3) года ( $P > 0,05$ ). Генотип представителей 2 подгруппы определялся как GSTT1 + M1-, GSTT1-M1 + и GSTT1-M1-.

Средняя продолжительность заболевания БА у детей подгрупп сравнения не отличалась и составляла в 1 подгруппе  $6,18 \pm 1,05$  года, а в 2 подгруппе -  $5,07 \pm 0,79$  года ( $P > 0,05$ ). По возрасту, в котором дебютировала БА, дети созданных подгрупп распределились следующим образом: до достижения трехлетнего возраста бронхиальной астмой заболело 25,0% представителей 1 подгруппы и 28,57% больных подгруппы сравнения, в возрасте от 3 до 6 лет - 6,25% и 14,29% больных соответственно, а в возрасте старше 6 лет - 68,75% детей без делеционного полиморфизма и 57,14% больных с генотипом как GSTT1 + M1-, GSTT1-M1 + или GSTT1-M1- (во всех случаях  $P > 0,05$ ).

По частоте отдельных форм БА в подгруппах сравнения статистически достоверных различий не установлено. Так, в 1 подгруппе смешанная форма БА случалась в 37,5%

детей, атопическая - в 62,5% пациентов. В 2 подгруппе такое распределение оказался следующим: 42,86% и 57,14% наблюдений (во всех случаях ( $P > 0,05$ )). Таким образом, по основным клиническим признакам созданы подгруппы сравнения достоверно не отличались, что позволяло избежать системной погрешности при проведении дальнейшего анализа.

С целью выявления делеций в генах семейства глутатион-S-трансфераз, а именно GSTT1 и GSTM1, проводили исследования проб капиллярной крови методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) на кафедре молекулярной генетики и биотехнологий Черновицкого национального университета им. Ю. Федьковича (зав. - д.биол.н., проф. Р.А. Волков) согласно стандартной методики [9, 10, 11]. Гомозиготные формы с делецией обеих копий генов GSTT1 и GSTM1 идентифицировали при отсутствии соответствующего фрагмента на электрофореграмме и обозначали как T1- и M1- (генотип GSTT1-M1). Соответственно, наличие таких фрагментов на электрофореграммах свидетельствовало о гомо- (GSTT1 + M1 +), или гетерозиготность по нормальной копии гена (генотипы GSTT1 + M1- или GSTT1-M1 +).

Статистический анализ осуществляли с помощью программы Statistica-v.6.0 на компьютере типа IBM. При нормальном распределении и больших выборках использовали параметрические методы анализа, а в малых выборках - непараметрические. При проведении популяционного анализа оценивали атрибутивный (AP) и относительный риск (OR), а также соотношение шансов (CS) с вычислением доверительных интервалов для относительного риска и отношения шансов (95% ДИ).

Результаты и их обсуждение. Распределение детей обследованных подгрупп по тяжести течения БА приведены в табл.1, из которой следует, что достоверных различий в подгруппах сравнения по характеру персистенции заболевания не установлено. Вместе с тем, прослеживается четкая тенденция к преобладанию легкого течения БА у детей без полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1, зато у больных с генотипом GSTT1 + M1-, GSTT1-M1 + или GSTT1-M1-заболевания у трети пациентов имеет тяжелое течение.

Таблица 1

Распределение пациентов подгрупп сравнения по тяжести бронхиальной астмы (%)

Подгруппы	Количество дітей	Легкая персистирующая	Среднетяжелая	Тяжелая персистирующая
1 подгруппа	16	18,75	56,25	25,0
2 подгруппа	14	7,14	57,14	35,71
P	>0,05	>0,05	>0,05	

Примечание: P - критерий различий Стьюдента

По возрасту, в котором дебютировала БА, дети созданных подгрупп распределились следующим образом: до достижения трехлетнего возраста (астма раннего начала) БА заболело 25,0% представителей 1 подгруппы и 28,57% больных подгруппы сравнения, в возрасте от 3 до 6 лет - 6,25% и 14,29% больных соответственно, а в возрасте старше 6 лет (астма позднего начала) - 68,75% детей без делеционного полиморфизма и 57,14% больных с генотипом

GSTT1 + M1-, GSTT1-M1 + или GSTT1-M1- (во всех случаях  $P > 0,05$ ). Несмотря на отсутствие статистически достоверных различий по возрасту начала заболевания, следует отметить имеющуюся тенденцию к преобладанию случаев дебюта БА в дошкольном возрасте среди представителей 2 подгруппы сравнения, что, возможно, свидетельствует о запоздалой диагностики заболевания в раннем возрасте, а также позволяет предположить тенденцию к преобла-

данию долю так называемого фенотипа астмы «позднего начала» среди больных 1 подгруппы.

По частоте сопутствующих аллергических заболеваний в клинических подгруппах сравнения значимых различий не установлено, поскольку они случались у детей без делеционного полиморфизма в 43,75% случаев, а в подгруппе сравнения - в 50,0% наблюдений ( $P > 0,05$ ).

Общеизвестно, что среди основных внешних факторов, влияющих на риск развития БА в детском возрасте, выделяют аллергены, инфекции, курение родителей, а также неблагоприятные показатели социально-экономического статуса семей. В частности, рождение ребенка в период года, когда отмечается разгар цветения растений, постоянно ассоциирует с риском формирования астма-фенотипа [12].

Так, 40,0% детей 1 подгруппы и 53,85% больных с признаками делеционного полиморфизма изученных генов родились в период с апреля по сентябрь месяцы ( $P > 0,05$ ), то есть в период максимального накопления в воздухе пыльцевых аллергенов. Показано, что делеционный полиморфизм генов GSTT1 и GSTM1 повышал шансы формирования БА у детей, рожденных в теплое время года: СШ = 1,75 (95% ДИ 1,0-3,07), ОР = 1,32 (95% ДИ 1,0-1,78) и АР = 13,5%. Вместе с тем, наличие обострений БА в весеннее время года (апрель-май) ассоциировала с отсутствием делеций в изученных генах II фазы биотрансформации ксенобиотиков: СШ = 2,75 (95% ДИ 1,39-5,45), ОР = 1,55 (95% ДИ 1,0-2,66) и АР = 24,3%.

Инфекционный индекс, равный 1, определялся в 37,5% детей 1 подгруппы и в 28,57% больных 2 подгруппы сравнения, а инфекционный индекс, составил 2 - в 18,75% и 7,15% пациентов соответственно, в остальных школьников инфекционный индекс равен нулю.

В созданных подгруппах сравнения были сопоставимы показатели социально-экономического статуса семей, где воспитывались больные дети. Так, в 1 подгруппе в 35,71% случаев оба родителя имели постоянное место трудоустройства, а в 2 подгруппе таких семей было 30,77% ( $P > 0,05$ ). Зато оба родителя не работали в 35,71% случаев в 1 подгруппе и в 38,46% наблюдений ( $P > 0,05$ ) в 2 подгруппе сравнения. Воспитывались в неполных семьях, либо были сиротами, 7,14% детей первой и 7,69% больных второй подгруппы ( $P > 0,05$ ).

Установлено, что в 1 подгруппе обследованных пациентов пассивное курение наблюдалось только в 2 случаях из табакокурения матери или отца (по 7,69% соответственно), а отсутствие данного неблагоприятного внешнего фактора в окружении больного ребенка отмечалось в 84,62% случаев. В 2 подгруппе сравнение не имели контак-

та с табачным дымом 90,91% больных и 1 пациент воспитывался в семье, где курила мать (9,09%).

Нами сделано предположение, что у больных БА детей при отсутствии в них делеционного полиморфизма генов GSTT1 и GSTM, наличие «пассивного курения» будет способствовать развитию обострений заболевания. Так, показатели клинико-эпидемиологического риска развития обострения БА у больных 1 подгруппы, воспитывались в условиях контакта с табачным дымом были следующими: СШ = 2,76 (95% ДИ 1,39-5,48), ОР = 1,56 (95% ДИ 0,9-2,6) и АР = 24,5%.

Среди факторов, провоцирующих обострение бронхиальной астмы, выделяют специфические (аллергены) и неспецифические (метеорологические факторы, респираторные заболевания, эмоциональные стрессы, физические нагрузки) триггеры, а также их комбинации. Так, у представителей 1 клинической подгруппы специфические провокационные факторы (ингаляционные и медикаментозные аллергены) отмечали в 60,0%, неспецифические - в 10,0% и их комбинацию - еще в 30,0% пациентов. В 2 подгруппе сравнения провоцировали приступы в 69,12% случаев специфические триггеры, в 7,69% больных - респираторные заболевания или медикаментозные препараты, и в таком же проценте случаев - физические факторы и комбинация специфических и неспецифических факторов. Показано, что в 1 подгруппе случались признаки гиперчувствительности преимущественно к бытовым аллергенам (35,71%), пищевых и бытовых - в 7,14% больных, в остальных случаях причинно значимый аллерген связывали с употреблением медикаментов. В 2 подгруппе сравнения бытовые аллергены случались незначительно чаще - в 57,14% детей ( $P > 0,05$ ), комбинация пищевых и бытовых - вдвое чаще (в 14,28% наблюдений,  $P > 0,05$ ), и в 7,14% случаев - гиперчувствительность к медикаментам; у 2 детей аллергены установить не удалось. Таким образом, выявления гиперчувствительности к бытовым аллергенам ассоциировало с наличием делеционного полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1, в частности: СШ = 3,33 (95% ДИ 1,85-6,0), ОР = 1,88 (95% ДИ 1,45 -2,43) и АР = 29,2%.

Показатели контроля БА в межприступном периоде у детей в зависимости от наличия или отсутствия в них делеционного полиморфизма изученных генов свидетельствовали о тенденции к лучшей контролируемости заболевания у детей без делеционного полиморфизма изученных генов, а анализ базисной противовоспалительной контролирующей терапии, которую получали представители клинических подгрупп сравнения, приведен в таблице 2.

Таблица 2

Пошаговая базисная терапия БА у детей клинических групп сравнения (в %)

Клинические подгруппы	Количество больных	Ступенька 1	Ступенька 2	Ступенька 3	Ступенька 4
1 подгруппа	16	20,9	20,3	52,9	5,9
2 подгруппа	14	15,0	34,7	33,4	16,9
P		>0,05	=0,05	<0,05	=0,05

Примечание: P - критерий различий Стьюдента

Итак, у каждого второго ребенка с сохраненной функциональной активностью изученных генов и каждый третий пациента с делеционным полиморфизмом базисная терапия отвечала 3-й строчке по рекомендациям GINA, хотя в 1,5 раза чаще у представителей 2 подгруппы использовались низкие дозы ИГКС или антагонисты лейкотриеновых рецепторов в виде монотерапии и в 2 раза чаще - активное противовоспалительное лечение в пределах средних или высоких доз ИГКС в комбинации с 2 препаратами других групп ( $\beta$ 2-агонисты пролонгированного действия, модификаторы лейкотриенов и / или пролонгированные теофиллины) (Ступенька 4). Следует заметить, что совместную с  $\beta$ 2-агонистами длительного действия терапию получали 14,92% больных без полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1 и каждый четвертый пациент (25,0%,  $P = 0,05$ ) группы сравнения.

Выводы. Таким образом, по показателям комплексного обследования больных БА детей, в зависимости от результатов молекулярно-генетического исследования генов семейства глутатион-S-трансферазы, обнаружена роль определенных экогенетических факторов на течение патологии, что позволило установить характерные отличия при сравнении альтернативных подгрупп в периоде клинического благополучия. Так, наличие признаков делеционного полиморфизма генов GSTT1 и GSTM, ассоциировала с фенотипом астмы «раннего начала», тяжелым течением заболевания. В анамнезе жизни таких детей реже случались детские инфекционные заболевания, а риск формирования астма-фенотипа ассоциировал с рождением ребенка в период максимального накопления пыльцы растений в воздухе во время их цветения. Характерной чертой данных пациентов является преобладание гиперчувствительности к бытовым аллергенам. При наличии генотипа GSTT1 + M1-, GSTT1-M1 + или GSTT1-M1- лечения преимущественно находится в рамках 2 и 4 ступеней (по GINA), а у каждого четвертого больного применяются комбинации с  $\beta$ 2-агонистами длительного действия, доза которых была выше, однако контроль над заболеванием у таких детей был хуже.

В отношении детей без делеционного полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1, обследованных в период клинического благополучия, то у них преобладали тенденции позднего дебюта и легкого течения БА. Риск возникновения приступов БА у представителей II клинической подгруппы повышали низкие показатели социально-экономического статуса семей, где воспитывались больные дети, контакт с табачным дымом в семье и отсутствие сезонного характера обострений заболевания. У больных БА пациентов школьного возраста генотипа GSTT1 + M1 + в комплексном базисном противовоспалительном лечении астмы чаще используются ингаляционные глюко-

кортикостероиды соответственно 3 ступени терапии в режиме средних и высоких доз, и вдвое чаще - антагонисты лейкотриеновых рецепторов.

#### Литература

1. Glutathione S transferase deficiency and passive smoking increase childhood asthma / M. Kabesch, C. Hoefler, D. Carr [et al.] // *Thorax*. – 2004. – Vol. 59 (7). – P. 569-573.
2. Enhancement of systemic and sputum granulocyte response to inhaled endotoxin in people with the GSTM1 null genotype / M.A. Dillon, B. Harris, M.L. Hernandez [et al.] // *Occup. Environ. Med.* – 2011. – Vol. 68 (10). – P. 783-785.
3. Genetic variants of glutathione S-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: a HuGE systematic review and meta-analysis // D.L. White, D. Li, Z. Nurgalieva [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* – 2008. – Vol. 167 (4). – P. 377-389.
4. Interactions between GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and smoking and intake of fruit and vegetables in relation to lung cancer / M. Sørensen, O. Raaschou-Nielsen, C. Brasch-Andersen [et al.] // *Lung Cancer*. – 2007. – Vol. 55 (2). – P. 137-144.
5. Impact of glutathione-S-transferase gene polymorphisms on enzyme activity, lung function and bronchial asthma susceptibility in Egyptian children / R.A. Karam, H.F. Pasha, A.S. El-Shal [et al.] // *Gene*. – 2012. – Vol. 497 (2). – P. 314-319.
6. Acute Effects of Walking Environment and GSTM1 Variants in Children With Asthma / P. Newcomb, A. Hunt, P. Rast [et al.] // *Biol. Res. Nurs.* – 2012. – Vol. 14, N. 1. – P. 55-64.
7. Achieving asthma control in practice: Understanding the reasons for poor control // J. Haughney, D. Price, A. Kaplan [et al.] // *Respiratory Medicine*. – 2008. – Vol. 102. – P. 1681-1693.
8. Прогнозирование риска развития неконтролируемого течения бронхиальной астмы у детей / А.А. Сависько, М.М. Батюшин, А.А. Лебеденко [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 6. – С. 154-157.
9. Выделение ДНК из крови / *Практическая молекулярная биология* // Режим доступа: <http://molbiol.edu.ru>.
10. Beckett G.J. Glutathione S-transferases: biomedical applications / G.J. Beckett, J.D. Hayes // *Adv. Clin. Chem.* – 1993. – Vol. 30. – P. 281-283.
11. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – Москва: Мир, 1984. – 480 с.
12. Becker A. Prevention strategies for asthma-primary prevention / A. Becker [et al.] // *JAMC*. – 2005. – Vol. 173, N. 6. – P. S20-24.