

УДК 616.248-053.2:616.2-002

**Колоскова О.К.¹, Волков Р.А.², Галущинська А.В.¹, Іванова Л.А.¹,
Микалюк Л.В.¹**

**ХАРАКТЕР ЗАПАЛЕННЯ БРОНХІВ У ДІТЕЙ, ЯКІ СТРАЖДАЮТЬ
НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ, ЗА ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ GSTT1 ТА
GSTM1**

*¹Кафедра педіатрії та дитячих інфекційних хвороб Буковинського
державного медичного університету, Чернівці,
Театральна пл., 2, 58002*

*²Кафедра молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького
національного університету, Чернівці, Коцюбинського 2, 58012*

UDC 616.248-053.2:616.2-002

**Koloskova O.K.¹, Volkov R.A.², Galushchinska A.V.¹, Ivanova L.A.¹,
Mykalyuk L.V.¹**

**NATURE OF BRONCHITIS IN CHILDREN SUFFERING FROM
ASTHMA, WITH POLYMORPHISM OF GENES GSTT1 AND GSTM.**

*1 Department of Pediatrics and Children's Infections Diseases Bukovinian State
Medical University, Chernivtsi, Teatralna ploshcha, 2, 580022*

*2 Department of Molecular Genetics and Biotechnology Chernivtsi National
University, Chernivtsi, Kotsyubinskogo 2, 58000*

*Генетична природа мультифакторних захворювань, таких як бронхіальна
астма, одне з найактуальніших питань сучасної медицини. В роботі*

досліджено вплив генів системи детоксикації ксенобіотиків GST на характер запалення дихальних шляхів при бронхіальній астмі. Встановлено підвищений ризик формування нейтрофільного варіанту запалення респіраторного тракту за наявності делеційного поліморфізму GSTT1 та GSTM1 у дітей шкільного віку, які хворіють бронхіальною астмою.

Ключові слова: бронхіальна астма, характер запалення дихальних шляхів, поліморфізм генів GSTT1 та GSTM1.

The genetic nature of multifactorial diseases, such as asthma, is one of the most actual issues in modern medicine. The work investigates influence of xenobiotics GST system detoxication genes on the nature of bronchitis among patients with asthma. The increased risk of neutrophilic variant of inflammation of the respiratory tract within the presence of deletion polymorphism GSTT1 and GSTM1 was found among the school age children suffering from bronchial asthma.

Key words: bronchial asthma, type of bronchial inflammation, polymorphism of gene GSTT1 and GSTM1

Бронхіальна астма (БА) – мультифакторне захворювання, на розвиток якого впливає комплекс чинників зовнішнього та внутрішнього середовища. Однією з основних патогенетичних ланок даної хвороби є хронічне запалення дихальних шляхів, яке відзначається своєю гетерогенністю (еозинофільний і нееозинофільний варіант) та потребує індивідуалізованого підходу до лікування [1]. Формування запального процесу в повною мірою визначається генетичною компонентою, яка, зокрема, модифікує здатність дихальних шляхів захищати себе від вдихуваних патогенних речовин з навколишнього середовища [2]. Виявлення генів схильності, які впливають на характер запалення бронхів, набуває великого значення для вибору індивідуалізованого лікування хворих БА. Серед генів-кандидатів увагу привертають гени суперсімейства глутатіон-S-трансфераз, які контролюють синтез ферментів 2 фази детоксикації ксенобіотиків, оскільки саме вони беруть участь в

метаболізмі запалення, оксидативному стресі та знешкодженні різних за своєю природою екзогенних сполук [3].

Встановлено, що GST у людини кодується великою мультигенною родиною, представленою більше ніж 20 генами [4,5], функція багатьох з яких потребує подальшого вивчення. Порівняно добре дослідженими є цитоплазматичні ізоформи GSTT1 та GSTM1, які беруть участь у детоксикації багатьох токсинів, продуктів оксидативного стресу, канцерогенів та лікарських препаратів. У популяціях людини вирізняються генетичним поліморфізмом 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 за делеціями у генів GSTT1, або GSTM1 втрачається ферментативна активність відповідної ізоформи [6,7].

Вплив генетичної компоненти, зокрема – делецій у генах GSTT1 та GSTM1, на характер запалення бронхіального дерева при БА у дітей є недостатньо вивченим.

Мета – дослідити характер запалення бронхів у дітей, хворих на БА, при поліморфізмі генів біотрансформації ксенобіотиків GSTT1 та GSTM1.

Матеріали і методи: обстежено 102 дитини шкільного віку хворих на БА, яким проведений цитологічний аналіз мокротиння, що отримували методом індукції з використанням серійних розведень гіпертонічних розчинів (3%, 5%, 7%) натрію хлориду за методом Pavord I.D. у модифікації Pizzichini M.M. Еозинофільний характер запалення дихальних шляхів верифікували за наявності в мукоспінні 3% і більше еозинофільних лейкоцитів. Усім хворим проведене генотипування за генами GSTT1 та GSTM1[8]. Виявлення делецій у генах GSTT1 та GSTM1 здійснювали методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [9].

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 електрофореграмі. Такі генотипи позначали як T1del та M1del. Відповідно, наявність даних фрагментів на електрофореграмах свідчила про гомо- або гетерозиготність по нормальній копії гену. Генотип таких пацієнтів позначали як T1+ та M1+ (рис. 1).

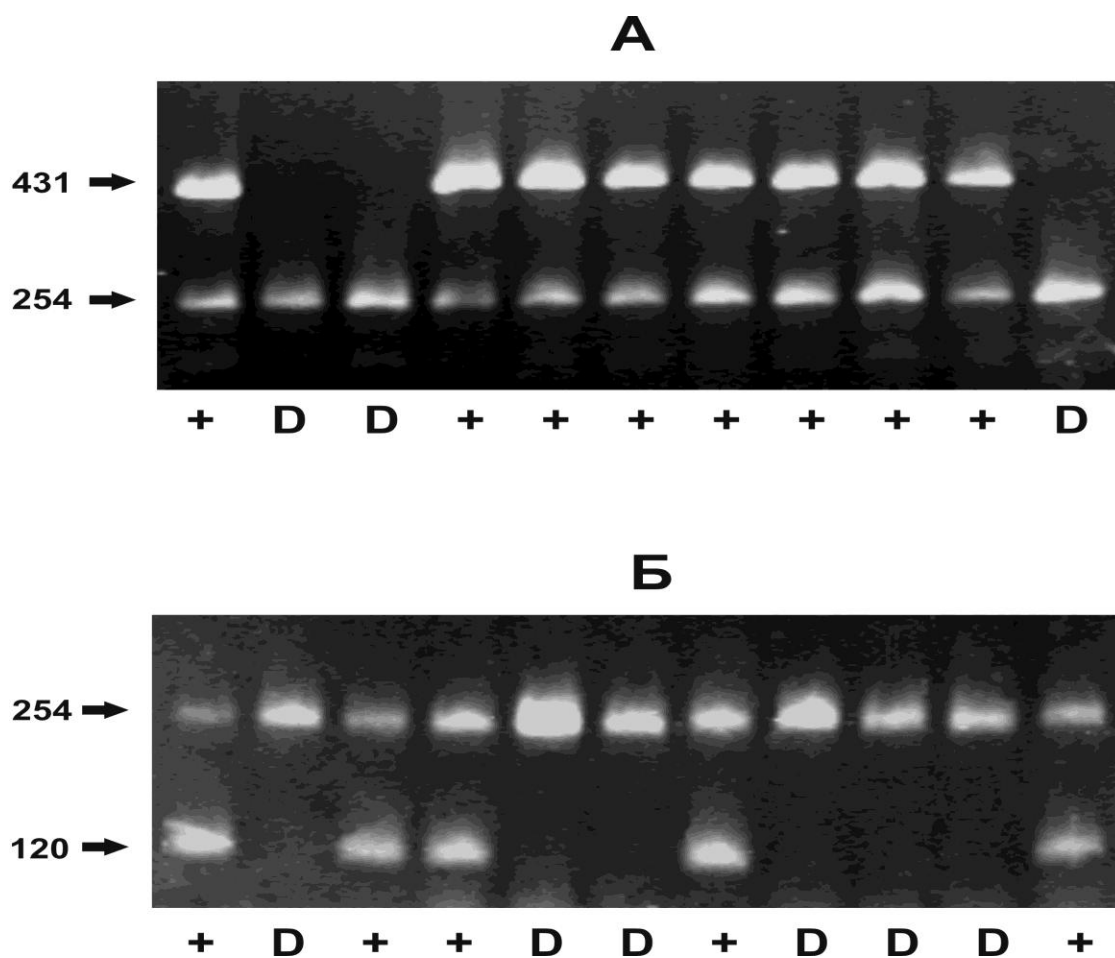


Рисунок 1. Результати електрофоретичного розділення ПЛР-фрагментів генів GSTT1 (А) та GSTM1 (Б). Розмір фрагментів гену GSTT1 становить 431 нп, GSTM1 - 120 нп та BRCA1 (позитивний контроль ампліфікації) – 254 нп. Знаком + позначено генотипи T1+ та M1+, а буквою D – генотипи T1del та M1del.

За результатами генотипування з обстежених дітей сформовано 2 клінічні групи спостереження. Першу склали 49 хворих, у яких ферментна активність GSTT1 та GSTM1 була збережена, оскільки вони мали як мінімум по одній копії непошкоджених алелів відповідних генів (генотип T1+M1+). Другу групу сформували 53 дитини, у яких відсутня активність однієї з досліджуваних ізоформ GST (GSTT1 або GSTM1), або одночасно обох ізоформ внаслідок делеції обох копій відповідних генів (генотипи T1delM1+, T1+M1del та T1delM1del). За основними клінічними ознаками групи порівняння співставні.

Одержані результати дослідження аналізували з використанням параметричних та непараметричних методів обчислення, враховуючи оцінку вірогідності різниці показників за коефіцієнтом Ст'юдента. Діагностичну цінність тесту визначали з урахуванням його специфічності (СТ) та чутливості тесту (ЧТ). Про вірогідність реалізації події свідчила величина відносного (ВР) та атрибутивного (АР) ризиків.

Результати та їх обговорення: аналіз дослідження цитологічного складу мокротиння у дітей хворих на БА залежно від генотипу GSTT1 та GSTM1 представлений у **табл. 1**.

Таблиця 1

Цитологічний склад мукоспіну в дітей клінічних груп порівняння

Клінічні групи (залежно від поліморфізму генів GST)	Кількість дітей, n	Клітинний склад мокротиння (%)				
		нейтрофіли	лімфоцити	еозинофіли	макрофаги	злущений епітелій
1 (T1+M1+)	49	54,7±3,9	10,0±2,3	7,8±2,3	24,7±3,3	43,8±3,7
2 (T1+M1del; T1delM1+; T1delM1del)	53	68,1±6,2	9,1±1,6	6,6±1,7	21,4±2,5	38,9±3,1
P	>0,05					

Відсоткове співвідношення клітин мукоспіну не є сталою величиною, оскільки залежить від багатьох факторів (прийому стероїдних препаратів, наявності запального процесу в бронхолегеневій системі та ін.). Отримані дані дають підставу вважати, що незважаючи на відсутність різниці за середніми показниками клітинного складу мокротиння у групах порівняння, за наявності генетичного дефекту (делецій) в структурі досліджуваних генів встановлено тенденцію до підвищеного ризику формування нейтрофільного характеру запалення дихальних шляхів (ХЗДШ). Так, серед дітей з наявним дефектом обох генів GST (генотип T1delM1del) кількість хворих із відсотковим вмістом нейтрофілів > 50% становила 72% проти 55% дітей у групі з генетично повноцінними генами GST. Отже можна припустити, що характер запалення бронхів в обстежених дітей визначався не тільки поліморфізмом досліджуваних генів детоксикації, а й іншими неврахованими факторами[2,3].

Генотипування хворих на БА дітей, виявило наступний розподіл варіантів GSTT1 та GSTM1 залежно від характеру запалення дихальних шляхів: кількість дітей з генотипом T1+M1+ у групі з еозинофільним ХЗДШ становила 23 пацієнта, у групі з нееозинофільним ХЗДШ – 26 осіб. Делеції генів GSTT1 та GSTM1 (генотипи T1delM1+, T1+M1del та T1delM1del) у групах з різним ХЗДШ зустрічались також у майже однакової кількості дітей: при еозинофільній БА делеції було виявлено у 23 осіб, а у пацієнтів з нееозинофільною БА – в 30 дітей. Незважаючи на відсутність достовірних відмінностей за частотою нормального та нефункціональних генотипів GST у групах з різними варіантами запалення бронхів, виявлено тенденцію до підвищеного ризику розвитку нейтрофільного ХЗДШ за наявності делецій у генах GSTT1 та GSTM1 (BP=1,34, 95%ДІ:0,28-6,3; AP=0,18), причому посттестова ймовірність розвитку нейтрофільного ХЗДШ збільшується на 17%. Враховуючи високу специфічність тесту (СТ = 92%) можна вважати, що наявність делецій в генах детоксикації доцільно використовувати для підтвердження нейтрофільного варіанту запалення бронхів у хворих БА. Проте

низька чутливість даного тесту (ЧТ = 17%), не дозволяє використовувати його для виключення даного фенотипу захворювання.

Дослідження генетичної схильності до різних варіантів запалення бронхіального дерева у дітей, що страждають на БА, виявило тенденцію до підвищеного ризику набуття нейтрофільного ХЗДШ за наявності дефекту в системі генів біотрансформації 2 фази детоксикації ксенобіотиків. Це, вірогідно, свідчить про те, що зниження адаптації організму, зокрема, місцевого захисту в бронхах від екзо- та ендогенних чинників, активує клітини дихальних шляхів, які приймають участь в елімінації чужорідних антигенів, а саме - нейтрофілів, які і визначають неозинофільний фенотип БА [10,11]. При цьому можна припустити, що експресія генів GSTT1 та GSTM1 є не єдиним вирішальним фактором у формуванні даної ознаки, а створює передумови для розвитку запального процесу бронхів, характер якого для кожного хворого на БА є індивідуальним [12].

Висновки:

1. Встановлено однаковий розподіл між нормальними та нефункціональними генотипами GST у дітей, які страждають на бронхіальну астму (48% осіб, дефект генів у яких відсутній, та 52% пацієнтів з наявністю мутації).
2. Не виявлено розбіжностей у частоті виявлення делецій генів GST у групах з еозинофільним та неозинофільним варіантом запалення бронхів (43% дітей з еозинофільним ХЗДШ та 57% з нейтрофільним ХЗДШ).
3. У хворих з генотипом T1delM1del встановлено підвищений ризик формування нейтрофільного ХЗДШ за наявності в мокротинні > 50% нейтрофілів (BP=1,34, 95%ДІ:0,28-6,3; AP=0,18).

4. Наявність делецій генів детоксикації ксенобіотиків GSTT1 і GSTM1 можна використовувати для підтвердження нейтрофільного варіанту запалення бронхів у дітей, хворих БА.

Література:

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. – National Institutes of Health National Heart and Lung and Blood Institute: Resived, - 2010. – 112 p.
2. Асанов А.Ю. Генетические основы бронхиальной астмы / А.Ю. Асанов, Л.С. Намазова // Педиатрическая фармакология. – 2008-Том 5. - № 4. Ст. 31-37.
3. Брагина Е.Ю. Полиморфизм генов биотрансформации ксенобиотиков GSTT1, GSTM1, CYP2E1 и CYP2C19 у больных atopической бронхиальной астмой / Е.Ю. Брагина // Бюллетень СО РАМН. – 2005- №3.- С.121-125.
4. Beckett GJ, Hayes JD (1993). Glutathione S-transferases: biomedical applications. Adv. Clin. Chem. Vol. 30. P. 281–38.
5. Wilce MC, Parker MW (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. Biochim. Biophys. Acta Vol. 1205 (1), P. 1–18.
6. Seidegard J., Vorachek W.R., Pero R.W., Pearson W.R. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1988. - Vol. 85, P. 7293-7297.
7. Pemble S., Schroeder K.R., Spencer S.R., Meyer D.J., Hallier E., Bolt H.M., Ketterer B., Taylor J.B. Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. // Biochem. J. – 1994. – V. 300, P. 271-276.
8. Выделение ДНК из крови. // Практическая молекулярная биология. <http://molbiol.edu.ru/>

9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Москва: Мир, 1984. - 480 с.

10. Дедков А.А. Структурный полиморфизм кандидатных генов при аллергических заболеваниях (бронхиальная астма, аллергический ринит, атопический дерматит) у детей / А.А. Дедков // Автореферат. – 2012.

11. Saadat M. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase T1, M1 and asthma, a meta-analysis of the literature (abstract) / M. Saadat // J. Biol Sci. – 2007- №10.- Vol.4183-9.

12. Large-Scale Consortium-Based Genomwide Association Study of Asthma // N Engl J Med. - 2010.- № 363.- P. 1211-21.

References:

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. – National Institutes of Health National Heart and Lung and Blood Institute: Revised, - 2010. – 112 p.
2. Asanov A. Генетические основы бронхиальной астмы / А. Асанов, ЛС Намазова // Педиатрическая фармакология. - 2008 - Volume 5. - № 4. Dg. 31-37.
3. Bragin E.Y Polymorphism biotransformation genes ksenobyotikov GSTT1, GSTM1, CYP2E1 and CYP2C19 in patients atopicheskoy bronhialnoy asthma / EY Bragin // Bulletin SB RAMS. - 2005 - № 3. - S.121-125.
4. Beckett GJ, Hayes JD (1993). Glutathione S-transferases: biomedical applications. Adv. Clin. Chem. Vol. 30. P. 281–38.
5. Wilce MC, Parker MW (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. Biochim. Biophys. Acta Vol. 1205 (1), P. 1–18.
6. Seidegard J., Vorachek W.R., Pero R.W., Pearson W.R. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1988. - Vol. 85, P. 7293-7297.

7. Pemble S., Schroeder K.R., Spencer S.R., Meyer D.J., Hallier E., Bolt H.M., Ketterer B., Taylor J.B. Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. // Biochem. J. – 1994. – V. 300, P. 271-276.
8. Videlenie DNK is krvi. // Prakticheskaya molekulyarnaya biologiya. <http://molbio1.edu.ru/>
9. Manyatys T., Fritsch E., Sembruk J. Molekulyarnoe klonyrovanye. Moscwa: Mir, 1984. - 480 p.
10. Dedkov A.A. Strukturniy polymorphism kandidatnih genov pri alergicheskikh zabolevaniyah (bronhialnaya astma, alergicheskiy rinit, atopicheskiy dermatit) u detey / A.A. Dedkov // Avtoreferat. - 2012.
11. Saadat M. Genetic polimorfisms of glutathione S-transferase T1, M1 and asthma, a meta-analysis of the literature (abstract) / M. Saadat // J. Biol Sci. – 2007- №10.- Vol.4183-9.
12. Large-Scale Consortium-Based Genomwide Association Study of Asthma // N Engl J Med. - 2010.- № 363.- P. 1211-21.