



УДК 616.248-053.2-097:577.1

МИКАЛЮК Л.В.

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

ФАРМАКОГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ДЕЗОБСТРУКТИВНОЇ ТЕРАПІЇ НАПАДІВ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ В ШКОЛЯРІВ

Резюме. На підставі комплексного обстеження 215 дітей шкільного віку, які страждають від бронхіальної астми, встановлено, що клінічні прояви тяжкості бронхообструктивного синдрому під час загострення захворювання не залежать від особливостей ацетиляторного статусу, проте гомозиготність за обома алелями гена глутатіонтрансферази ($GSTT1+M1+$) асоціюється з більшою тяжкістю нападів, а відсутність Т-алеля в дітей із повільним ацетиляторним фенотипом — із більш частим використанням системних глюкокортикостероїдів та децю кращими результатами дезобструктивної терапії. Генотип $GSTT1+M1+$ у хворих із прискореними процесами ацетилювання суттєво підвищував ризик недостатньої ефективності дезобструктивної терапії (відношення шансів 12,4; відносний ризик — 6,4, абсолютний ризик — 50 %).

Ключові слова: діти, бронхіальна астма, гени глутатіонтрансферази.

Вступ

Перші генетичні пошуки можливостей оптимізації лікування бронхіальної астми (БА) відносяться до 1996 року [3]. Відтоді проведені масштабні дослідження зв'язку захворювання та його фенотипів із генотиповими особливостями організму [10], що дозволили виявити ряд відповідальних генів, зокрема ADAM33, DPP10, GPRA, HLA-G, RNF11, PTGDR, PLAUR, и PCDH1 [4, 5, 9, 11, 12]. На особливу увагу заслуговує при цьому дослідження участі ферментативної системи метаболізму та біотрансформації ксенобіотиків (алергенів, лікарських препаратів), оскільки поліморфізм генів даної системи, що зумовлює індивідуальні особливості чутливості до різних груп препаратів, проявів їх побічних ефектів, вивчений недостатньо.

Відомо, що глутатіонтрансфераза відіграє важливу роль у захисті клітин організму від пошкоджувального впливу продуктів перекисного окиснення, у тому числі вільних радикалів [8]. Рядом досліджень показано, що індивідуальні генетичні особливості діяльності глутатіонтрансферази можуть змінювати сприйнятливості клітин організму до патогенного впливу пероксидних радикалів [7], що з клінічної точки зору проявляється тяжчим і тривалішим перебігом захворювань, торпідністю до лікування, що, у свою чергу, набуває значної агресивності. Так, у роботі I. Romieu та співавт. [6] показано, що «нульовий» поліморфізм гена $GSTM1$ асоціюється з накопиченням біомаркерів оксидативного стресу,

проявляється статистично значущим зниженням показників форсованого видиху на рівні бронхів різного діаметра і, таким чином, є обґрунтуванням для призначення антиоксидантних препаратів.

Робочою гіпотезою нашого дослідження було припущення, що в дітей, хворих на бронхіальну астму, із генетично зумовленими особливостями детоксикаційних процесів (залежно від ацетиляторного фенотипу та поліморфізму генів $GSTM1$ і $GSTT1$) ефективність дезобструктивної терапії нападів буде різною, що дозволить шляхом створення індивідуалізованих рекомендацій покращити результати лікування.

Мета роботи: на підставі комплексного клінічно-інструментального, у тому числі молекулярно-генетичного, аналізу вивчити результати дезобструктивної терапії нападів бронхіальної астми у пацієнтів шкільного віку для оптимізації тактики полегшувальної терапії і покращення прогнозу.

Матеріал і методи

Проаналізовано результати лікування нападного періоду бронхіальної астми у 215 дітей шкільного віку. Дезобструктивна терапія проводилася в умовах пульмо-алергологічного відділення ОДКЛ м. Чернівців. При надходженні хворих до стаціонару тяжкість бронхообструктивного синдрому (БОС) під

© Микалюк Л.В., 2013

© «Здоров'я дитини», 2013

© Заславський О.Ю., 2013

час періоду загострення захворювання оцінювали за бальною шкалою [1] таким чином, що зростання оцінки вираженості БОС за бальною шкалою відображало посилення його проявів. Поряд із клінічним проведено комплексне параклінічне обстеження, що, зокрема, охоплювало спірографію, а також визначення ацетиляторного фенотипу та молекулярно-генетичне дослідження генів GSTT1 та GSTM1. Тип ацетилювання визначали у всіх хворих за допомогою фотоелектрокалориметричного методу за методикою Пребстинга і Гаврилова в модифікації Тимофєєвої [2] з використанням як тест-препарату сульфадимезину в дозі 10 мг/кг перорально. Уміст в сечі хворих ацетилюваного сульфадимезину менше 75 % оцінювали як повільний тип ацетилювання, а понад 75 % — як швидкий варіант.

Визначення делецій у genaх GSTT1 та GSTM1 було проведено методом мультиплексною полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР) 75 пацієнтам, відібраним випадковим методом. Як позитивний контроль успішності ПЛР використовували ампліфікацію фрагментів гена BRCA1. Аналіз результатів ПЛР проводили методом електрофорезу у 2% агарозному гелі. Для візуалізації фрагментів ДНК гель забарвлювали етидієм бромідом та фотографували в ультрафіолетовому світлі на установці GelDoc 2000 (BioRad, США). Для визначення довжини отриманих фрагментів їх електрофоретичну рухливість порівнювали з рухливістю ДНК-маркера GeneRuler DNA Leader Mix (Fermentas, Литва).

Очікувану довжину фрагментів ДНК (431 нп для GSTT1 та 120 нп для GSTM1) розраховували за допомогою пакета програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR із використанням послідовностей генів GSTT1 та GSTM1, що наявні у базі даних Genbank. Гомозиготні форми із 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+.

Отримані результати дослідження аналізувалися методом біостатистики та клінічної епідеміології, а також за допомогою пакета програм Statistica 7.0 StatSoft Inc. та Excel XP для Windows на персональному комп'ютері з використанням параметричних і непараметричних методів обчислення.

Дослідження проведено з дотриманням біоетичних вимог у паралельних клінічних групах порівняння, сформованих за принципом простої рандомізації, методом «випадок — контроль» із дотриманням основних вимог до нього.

Одержані результати та їх обговорення

Для вивчення особливостей відповіді на дезобструктивну терапію хворих на бронхіальну астму дітей шкільного віку залежно від швидкості їх ацети-

ляторних процесів обстежених хворих розподіляли на дві клінічні групи. Першу (I) утворили 112 пацієнтів, які належали до так званих повільних ацетиляторів (із часткою ацетилюваної фракції сульфадимезину в сечі менше 75 %), середній вік їх становив $12,9 \pm 0,3$ року, а частка хлопчиків сягала 70,5 %. Решта 103 хворі (їх вік становив $11,9 \pm 0,3$ року ($P > 0,05$), а частка хлопчиків — 71,8 % ($P > 0,05$)) увійшли до складу другої (II) групи, оскільки вони мали швидкий ацетиляторний фенотип. За основними клінічними характеристиками групи були порівнянними. Так, у I групі кожна друга дитина мешкала у сільських районах, а у II групі таких хворих було 56,3 %. Збігалися у групах порівняння й частки окремих форм захворювання: зокрема, змішана форма БА траплялась у 58,6 % хворих першої і 57,8 % дітей другої групи ($P > 0,05$), atopічна — відповідно у 41,4 і 42,2% спостережень ($P > 0,05$).

За тяжкістю перебігу БА діти клінічних груп порівняння розподілялися так: серед «повільних ацетиляторів» дітей із легким персистуючим перебігом захворювання було 12,5 %, середньо-тяжким — 50,0 % і з тяжким персистуванням — 37,5 % спостережень. У II клінічній групі такі ознаки відмічені відповідно у 14,6; 48,5 і 33,0 % спостережень (у всіх випадках $P > 0,05$). Разом із тим слід зауважити, що 3,9 % дітей із швидким ацетиляторним фенотипом надійшли з діагнозом загострення інтермітуючого перебігу БА, а серед хворих I групи такі випадки не траплялись.

За віком дебюту захворювання вірогідних відмінностей у групах порівняння не встановлено. Так, початок захворювання в ранньому віці (до 3 років життя) відмічався у 26,8 % хворих першої і 29,1 % дітей другої групи ($P > 0,05$); дебют у віці 3–6 років траплявся відповідно у 19,6 та 14,6 % випадків ($P > 0,05$), а астма пізнього початку (після 6-річного віку) зареєстрована в 53,6 % хворих із повільним та у 56,3 % дітей зі швидким ацетиляторним фенотипом ($P > 0,05$).

Клінічна оцінка вираженості бронхообструктивного синдрому, проведена упродовж тижня стаціонарного лікування, у клінічних групах порівняння практично збігалася (табл. 1).

Проте відмічено, що у хворих I клінічної групи після стабілізації стану показники пікової об'ємної швидкості (ПОШ) видиху, що перевищували 90 % вікової норми, мали місце лише у $6,4 \pm 4,3$ % випадків, а серед «швидких ацетиляторів» вони траплялися удвічі частіше — $13,3 \pm 5,2$ % спостережень ($P > 0,05$), що, мабуть, відбивало уповільнені темпи метаболізму медикаментозних засобів полегшувальної терапії та, ймовірно, більш торпідний характер перебігу БОС у дітей.

Не встановлено статистично вірогідних відмінностей у показниках тяжкості нападного періоду у дітей із алейним поліморфізмом генів глутатіон-трансферази (GSTT1 і GSTM1). Разом із тим ефективність лікування виявилася найкращою в дітей із генотипом GSTT1+Mdel (середній бал БОС на 7-й день стаціонарного лікування становив $2,6 \pm 0,2$

Таблиця 1. Клінічна оцінка вираженості БОС (у балах) упродовж стаціонарного лікування ($M \pm m$)

Клінічна група (кількість хворих)	Тяжкість бронхообструкції (у балах), $M \pm m$						
	1-й день	2-й день	3-й день	4-й день	5-й день	6-й день	7-й день
I (n = 112)	12,8 ± 0,6	11,7 ± 0,6	9,4 ± 0,5	7,4 ± 0,4	5,7 ± 0,3	4,5 ± 0,3	3,3 ± 0,2
II (n = 103)	12,6 ± 0,6	11,4 ± 0,6	8,9 ± 0,5	6,9 ± 0,4	5,7 ± 0,3	4,7 ± 0,3	3,7 ± 0,3
P	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Таблиця 2. Показники пікової об'ємної швидкості видиху у хворих клінічних груп порівняння за наявності генотипу GSTT1+M1+ (%)

Показники ПОШ видиху	I група (n = 43)	II група (n = 32)	P
> 80 % від норми	50,0	23,5	< 0,05
60–79 % від норми	41,7	23,6	0,05
< 60 % від норми	8,3	52,9	< 0,001

бала) порівняно з пацієнтами із GSTT1+M1+ генотипом ($3,4 \pm 0,2$ бала, $P = 0,05$), у яких напади астми вирізнялися більшою резистентністю до призначеної стандартної дезобструктивної терапії. Непрямим підтвердженням цього була наявність статистично вірогідного зворотного кореляційного зв'язку поліморфізму генів глутатіонтрансферази у вигляді делецій T1 і M1 алелів із тяжкістю БОС на 6-й ($r = -0,8$, $P = 0,04$) і 7-й день госпіталізації ($r = -0,5$, $P = 0,05$). Установлено наявність кореляції даних мутацій із частотою використання в комплексній терапії антигістамінних препаратів III покоління ($r = 0,6$, $P = 0,02$). Разом із тим у I клінічній групі характер кореляції поліморфізму генів глутатіонтрансферази (у вигляді делецій T1 і M1 алелів) із показниками пікової об'ємної швидкості видиху в післянападному періоді свідчив про гіршу ефективність дезобструктивної терапії при накопиченні генетичних мутацій ($r = 0,5$, $P = 0,014$), тому дозволяв стверджувати, що їх поєднання з повільним ацетиляторним фенотипом, що визначає I фазу детоксикації антигенів, погіршує ефективність стандартної дезобструктивної терапії.

Слід відзначити, що хворим із повільним ацетиляторним фенотипом та генотипом GSTTdelM1+ частіше призначали системні глюкокортикостероїдні препарати ($62,5 \pm 4,5$ % випадків) порівняно з представниками II клінічної групи з аналогічного гетерозиготністю гена глутатіонтрансферази (50,0 % спостережень, $P = 0,05$). Це відображало тяжчий перебіг БОС у представників I групи з мутацією T-алеля гена глутатіонтрансферази. Пацієнти з генотипом GSTTdelM1+ під впливом більш потужної терапії демонстрували такі показники ПОШ у післянападному періоді: понад 80 % від вікової норми — 30,8 % хворих, у межах 60–79 % — 38,5 % та менше 60 % — у 30,7 % випадків. У хворих на бронхіальну астму з генотипом GSTT1+Mdel зазначені показники пікової об'ємної швидкості видиху відмічені відповідно у 19,2; 42,3 та 38,5 % спостережень (в усіх випадках $P > 0,05$).

Особливості розподілу результатів ПОШ у представників клінічних груп порівняння без мутацій гена GSTT1+M1+ наведені в табл. 2.

Отже, всупереч клінічній одноманітності тяжкості перебігу нападного періоду бронхіальної астми в дітей із різним ацетиляторним фенотипом, швидкий його варіант за відсутності делецій у генах GSTM асоціювався із гіршими результатами стандартної дезобструктивної терапії (за даними спірографії), що, можливо, пояснювалося більш ліберальним призначенням системних глюкокортикостероїдів пацієнтам I групи. Показники клінічно-епідеміологічного ризику низьких (менше 60 % від нормативу) показників ПОШ у хворих із швидкими процесами ацетилювання порівняно з представниками I групи за відсутності алельних мутацій гена глутатіонтрансферази становили: відношення шансів — 12,4 (95% ДІ 1,3–118,3), відносний ризик — 6,4 (95% ДІ 3,6–11,2), абсолютний ризик — 50 %. Посттестова ймовірність позитивного результату збільшувалася на 18,1 %, а негативного — зменшувалася на 35,2 %.

Отже, на підставі проведеного комплексного дослідження встановлені індивідуальні, зокрема генетично обумовлені характером детоксикаційних процесів та активністю глутатіонтрансфераз, клінічно-інструментальні особливості ефективності стандартної дезобструктивної терапії нападного періоду бронхіальної астми у хворих шкільного віку.

Висновки

1. Клінічні прояви вираженості бронхообструктивного синдрому під час нападів бронхіальної астми не залежать від ацетиляторного фенотипу, і ефективність дезобструктивної терапії у пацієнтів із різною швидкістю ацетилювання вірогідно не відрізняється.

2. Відсутність делецій генів глутатіонтрансферази, а саме генотип GST1+M1+, асоціюється з клінічно більш тяжким перебігом бронхіальної обструкції під час нападів і меншою ефективністю дезобструктивної терапії.

3. Більшість пацієнтів (62,5 %) із генотипом GSTTdelM1+ для купірування нападу астми потребують уведення системних глюкокортикостероїдів, і майже у третини з них показники пікової об'ємної швидкості видиху перевищують 80 % від вікової норми наприкінці лікування.

4. Недостатня ефективність дезобструктивної терапії має місце у хворих із швидким ацетиляторним фенотипом і генотипом GSTT1+M1+, причому показники ризику низьких результатів (< 60 %) пікової об'ємної швидкості видиху становлять: відношення шансів — 12,4 (95% ДІ 1,3–118,3), відносний ризик — 6,4 (95% ДІ 3,6–11,2), абсолютний ризик — 50 % зі зростанням позитивної посттестової ймовірності позитивного результату на 18,1 % і зменшенням негативного — на 35,2 %.

Список літератури

1. Диагностика и лечение острых пневмоний и ОРВИ, осложненных БОС у детей раннего возраста / [Л.А. Безруков и соавт.]; под ред. А.Ф. Мозалевского. — Черновцы, 1989. — 23 с.
2. Першин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии — М.: Медицина, 1971. — С. 454-457.
3. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma / S.E. Daniels, S. Bhattacharrya, A. James [et al.] // *Nature*. — 1996. — Vol. 383. — P. 247-250.
4. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness / E.P. Van, R.D. Little, J. Dupuis [et al.] // *Nature*. — 2002. — Vol. 418. — P. 426-430.
5. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma / E. Bouzigon, E. Corda, H. Aschard [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 2008. — Vol. 359. — P. 1985-1994.

6. Genetic polymorphism of GSTM1 and antioxidant supplementation influence lung function in relation to ozone exposure in asthmatic children in Mexico City / I. Romieu, J.J. Sienna-Monge, M. Ramirez-Aguilar [et al.] // *Thorax*. — 2004. — Vol. 59. — P. 8-10.

7. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review / S.C. Cotton, L. Sharp, J. Little [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* — 2000. — Vol. 151. — P. 7-32.

8. Hayes J.D. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance / J.D. Hayes, D.J. Pulford // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* — 1995. — Vol. 30. — P. 445-600.

9. Identification of PCDH1 as a novel susceptibility gene for bronchial hyperresponsiveness / G. Koppelman, D. Meyers, T. Howard [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2009. — Vol. 180. — P. 929-935.

10. Metaanalysis of 20 genome-wide linkage studies evidenced new regions linked to asthma and atopy / E. Bouzigon, P. Forabosco, G.H. Koppelman [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2010. — Vol. 18. — P. 700-706.

11. PLAUR polymorphisms are associated with asthma, PLAUR levels and lung function decline / S.J. Barton, G.H. Koppelman, J.M. Vonk [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2009. — Vol. 123. — P. 1406-1415.

12. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma / Y. Zhang, N.I. Leaves, G.G. Anderson [et al.] // *Nat. Genet.* — 2003. — Vol. 34. — P. 181-186.

Отримано 08.12.12 □

Микалюк Л.В.

Буквинский государственный медицинский университет,
г. Черновцы

ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕЗОБСТРУКТИВНОЙ ТЕРАПИИ ПРИСТУПОВ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ШКОЛЬНИКОВ

Резюме. На основании комплексного обследования 215 детей школьного возраста, страдающих бронхиальной астмой, установлено, что клинические проявления тяжести бронхообструктивного синдрома во время обострения заболевания не зависят от особенностей ацетиляторного статуса, однако гомозиготность по обоим аллелям гена глутатионтрансферазы (GSTT1+M1+) ассоциируется с более выраженной тяжестью приступов, а отсутствие Т-аллеля у детей с медленным ацетиляторным фенотипом — с более частым использованием системных глюкокортикостероидов и несколько лучшими результатами дезобструктивной терапии. Генотип GSTT1+M1+ у больных с быстрыми процессами ацетилирования существенно повышает риск недостаточной эффективности дезобструктивной терапии (отношение шансов 12,4, относительный риск — 6,4, абсолютный риск — 50 %).

Ключевые слова: дети, бронхиальная астма, гены глутатионтрансферазы.

Mikaluk L.V.

Bukovinian State Medical University, Ukraine

PHARMACOGENETIC ASPECTS OF AIRWAYS' OBSTRUCTION RELIEF THERAPY OF BRONCHIAL ASTHMA ATTACKS IN SCHOOLCHILDREN

Summary. On the base of a complex examination of 215 schoolchildren who suffer bronchial asthma, there have been established that clinical manifestations of severity of bronchial obstructive syndrome during disease exacerbation do not depend on acetylating status. However, a homozygosity on both alleles of the glutathione transferase gene (GSTT1+M1+) has been connected to greater severity of asthma attacks, while a lack of the T-allele in children with slow acetylating phenotype has been associated with more frequent use of systemic corticosteroids and somewhat better results of airways obstruction relief therapy. Occurrence of GSTT1+M1+ genotype in patients with accelerated processes of acetylation significantly increased the risk of the inefficiency of bronchial obstruction relief therapy (odds ratio 12.4, relative risk — 6.4, the absolute risk — 50 %).

Key words: children, bronchial asthma, gene glutathione transferase.