

in 150 children, aged from 6 months to 3 years: 50 infants with chronic nonspecific nonulcerative colitis (CNNC), 50 infants with functional constipation and 50 infants with functional diarrhea. Results. The study presents significant disorders of the glycoprotein's structure of the intestinal mucosa in children with CNNC. There was increased the content of free, protein- and glycolinked sialic acid, 7.4 ± 2.25 , 5.4 ± 0.2 and 3.7 ± 0.3 mmol /mg of protein respectively (normal value – 5.3 ± 0.2 , 3.7 ± 0.3 and 1.9 ± 0.1). The concentration of total fucose in children with CNNC was about 3.0 times higher than that in healthy children ($P < 0.05$). The level of free fucose in children with CNNC was 68.5% as compared to 50.2% in the control group. At the same time, there was a decline in sulfoglycoproteins, 0.67 ± 0.19 mmol/mg of protein as compared to 1.64 ± 0.23 mmol/mg of protein. The same trend was observed in functional bowel diseases, but disorders of mucosal barrier were less marked compared to HNNK.

Conclusions. Changes in the structure of mucosal barrier in the chronic inflammatory process in the gut is one of the pathogenetic mechanisms of the formation and manifestation of the disease, and in functional diseases - risk factors for deeper lesions in the intestinal mucosa.

Key words: infants, chronic nonspecific nonulcerated colitis, functional diarrhea, functional constipation, mucins.

© Л.В. МИКАЛЮК, 2013

Л.В. Микалюк

ЕФЕКТИВНІСТЬ СТАРТОВОЇ ДЕЗОБСТРУКТИВНОЇ ТЕРАПІЇ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДІТЕЙ ЗАЛЕЖНО ВІД ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ ГЛЮТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗ GSTT₁ ТА GSTM₁

Буковинський державний медичний університет МОЗ України,
м. Чернівці

Вступ. Сімейству глутатіон-S-трансфераз належить значна роль у розвитку і перебігу багатьох захворювань, проте значення поліморфізму генів, що їх кодують, вивчене недостатньо.

Мета. Вивчити особливості лікування нападів бронхіальної астми в школярів залежно від поліморфізму генів GSTT₁ та GSTM₁ для оптимізації полегшувальної терапії.

Методи. Комплексно обстежено 150 хворих на астму школярів.

Результати. При делеційному поліморфізмі генів GSTT₁ та GSTM₁ тяжкий перебіг захворювання мало у 71,4% випадків, а гіперсприйнятливості бронхів до гістаміну – найвиразнішою (PC20H – $0,14 \pm 0,05$ мг/мл). Дезобструктивна терапія була більш активною, а показники ризику використання системних глюкокортикостероїдів такі: відношення шансів – 28,2 (95% ДІ 3,7-214,1), атрибутивний ризик – 21%.

Висновки. Делеційний поліморфізм генів GSTT₁ та GSTM₁ асоціює з більш тяжким перебігом бронхіальної астми в школярів, зокрема її нападів, а такі хворі вимагають більш активної терапії.

Ключові слова: діти, астма, глутатіон-S-трансферази, генетичний поліморфізм.

ВСТУП

Останніми роками науковцями, які представляють різні галузі медицини, глибоко та всебічно вивчається антиоксидантна система, функція якої полягає у

підтримці на сталому рівні концентрації вільних радикалів та видаленні їх надлишку. Основою даної системи захисту є глутатіон та ферменти його метаболізму, зокрема, глутатіонпероксидаза (GPO), глутатіонтрансфераза (GST), глутатіонредуктаза (ГР) і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (Г6ФДГ) [1]. Відомо також, що основною функцією глутатіон-S-трансферази є відновлення гідроперекису до спиртів, також вона виявляє високу активність щодо продуктів окисної модифікації нуклеїнових кислот і частково представлена у ядрі клітин. GST беруть активну участь у знешкодженні токсичних полютантів (у т.ч. тяжких металів), разом із каталазою, супероксиддисмутазою та GPO захищають клітину від наслідків окисного стресу [1, 5].

Накопичено великий досвід проведених досліджень ролі окремих ізоформ глутатіон-трансфераз, зокрема, цитоплазматичних (GSTT₁ та GSTM₁), які є відповідальними за детоксикацію різноманітних продуктів обміну, у т.ч. медикаментів. Відомо, що дані ферменти попереджують генотоксичні і канцерогенні ефекти, є частиною інтегральної біохімічної захисної системи організму, яка знешкоджує ліпофільні, мутагенні, токсичні, канцерогенні сполуки.

За кодування активності різних класів глутатіон-трансфераз у людини відповідають не менше 20 різних генів [6, 8], розташованих переважно на 1,11 і 22 хромосомах. На підставі характеристики первинної структури, імунохімічних властивостей суперсімейство ізоформ глутатіон-S-трансферази поділяється на 6 класів: альфа (α), мію (μ), пі (π), тета (θ), каппа (κ) і мікросомальну лізоформу, кожній з яких притаманний власний поліморфізм. Вважають, що гени глутатіон-S-трансферази залучені до патогенезу багатьох захворювань, виступають як модифікатори та чинники ризику (схильності), у першу чергу, при патології, пов'язаній із несприятливими впливами навколишнього середовища [4, 7].

Разом із тим, особливості перебігу бронхіальної астми та результати її лікування у дітей залежно від поліморфізму генів глутатіон-S-трансфераз (зокрема, GSTT₁ та GSTM₁) наразі вивчені недостатньо.

Мета. Вивчити особливості лікувальної тактики у нападному періоді бронхіальної астми в школярів залежно від поліморфізму генів глутатіон-S-трансфераз (GSTT₁, GSTM₁) для оптимізації полегшувального лікування захворювання.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Із дотриманням принципів біоетики методом випадкової виборки в умовах пульмо-алергологічного відділення ОДКЛ м. Чернівці обстежено когорту зі 150 хворих на бронхіальну астму (БА) дітей шкільного віку. Усім дітям проводилося комплексне клінічно-лабораторне обстеження, яке передбачало загально клінічні, спірографічні, імунологічні та молекулярно-генетичні дослідження. Зокрема, виявлення делецій у генах глутатіон-трансфераз (GST), а саме GSTT₁ та GSTM₁, здійснювали методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). В якості позитивного контролю успішності ПЛР використовували ампліфікацію фрагментів гену BRCA1. Аналіз результатів ПЛР проводили методом електрофорезу у 2% агарозному гелі (Маниатис и др., 1984). Для визначення довжини отриманих фрагментів їх електрофоретичну рухливість порівнювали з рухливістю ДНК-маркера Gene Ruler DNA Leader Mix (Fermentas, Литва). Гомозиготні форми із делецією обох копій генів GSTT₁ та GSTM₁ ідентифікували за відсутності відповідного фрагменту на електрофореграмі. Такі

генотипи позначали як $T_1\text{del}$ та $M_1\text{del}$. Відповідно, наявність таких фрагментів на електрофореграмах свідчила про гомо- або гетерозиготність по нормальній копії гену. Генотип таких пацієнтів позначали як $T1+$ та $M1+$.

Залежно від наявності делецій $GSTT_1$ та/або $GSTM_1$ обстежених дітей розподіляли на 2 клінічні групи порівняння. Першу (I) сформували 69 пацієнтів (46,0%), які мали щонайменше одну копію непошкоджених алелів відповідних генів, тобто їх генотип визначався як $GSTT_1+M_1+$, а до складу другої (II) групи порівняння увійшов 81 підліток (54,0%) із генетичною делецією обох копій однієї або обидвох ізоформ глутатіон-трансферази (генотипи $GSTT_1\text{del}M_1+$, $GSTT_1+M_1\text{del}$ та $GSTT_1\text{del}M_1\text{del}$).

За основними клінічними характеристиками групи порівняння були зіставлюваними. Так, частка хлопчиків у I групі становила 69,12% (дівчаток відповідно було 30,88%), а у II групі сягала 65,43% (дівчаток – 34,57%, $p>0,05$). Кожний другий хворий I групи мешкав у сільській місцевості, а у II групі таких випадків було 56,79%. Середній вік пацієнтів груп порівняння також збігався і становив у I групі $10,72\pm 0,39$ років, а у II групі – $10,75\pm 0,33$ року ($p>0,05$). Легкий персистувальний перебіг астми траплявся у 7,25% дітей I та у 3,63% дітей II клінічної групи, середньотяжкий – відповідно у 49,28% та 46,91%, і тяжкий – у 43,48% та 49,38% спостережень (в усіх випадках $p>0,05$).

Усім дітям проведено комплексне клінічно-параклінічне обстеження, що включало крім загальноприйнятих методик обстеження визначення неспецифічної гіперсприйнятливості бронхів до прямого бронхоспазмогенного стимулу (гістаміну) із визначенням його мінімальної концентрації, яка провокує зменшення ФОВ1 на 20% (ПК20Г).

Визначення ступеня тяжкості БА, рівню контролю над захворюванням, а також обсягу лікування здійснювали за наказом МОЗ України №767 від 25.12.2005 р. «Про затвердження Протоколів діагностики та лікування алергологічних хвороб у дітей» [3] відповідно до рекомендацій Глобальної стратегії лікування і профілактики БА (GINA-2006 та її наступних версій) [2].

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

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Установлені особливості клінічного перебігу бронхіальної астми в дітей клінічних груп порівняння свідчили на користь того, що при виникненні одночасних мутацій у зазначених вище генах ферментів II фази детоксикації захворювання перебігає вірогідно тяжче. Зокрема, якщо у I та II групах клінічних відмінностей за тяжкістю перебігу астми не встановлено, то у дітей з алельним набором $GSTT_1\text{del}M_1\text{del}$ легкого персистування захворювання не відмічалось взагалі, середньо тяжке хвороба мала місце у 28,57% випадків (проти 49,28% у I клінічній груп, $p>0,05$), а тяжка форма реєструвалася у 71,43% спостережень (проти 43,48% у дітей з генотипом GTT_1+M_1+ , $p<0,05$).

Астма раннього початку (до досягнення трирічного віку) траплялася у 36,23% хворих I та у 40,24% представників II клінічної групи ($p>0,05$), а фенотип астми пізнього

початку (у віці старше 6 років) незначно переважав у дітей основної групи (49,28% проти 34,17%, $p=0,05$). Можливо, це пояснювалося запізнілою діагностикою захворювання в представників I клінічної групи, зумовленою легшим (чи атипичним) перебігом епізодів бронхообструктивного синдрому, що перешкоджало своєчасному встановленню діагнозу бронхіальної астми.

Висунуте припущення частково підтверджувалося тим, що в хворих із генотипом $GSTT_1+M_1+$ змішаний варіант перебігу астми мав місце у 53,03% випадків, натомість у дітей групи порівняння – у 45,57% спостережень ($p>0,05$), а у пацієнтів із генотипом $GSTT_1delM_1del$ – лише у 21,43% випадків (порівняно з I групою $P<0,05$). Атопічний варіант захворювання мав місце в середньому у 47,0% випадків у I групі, у 54,43% спостережень у II групі ($p>0,05$), а серед хворих із генотипом $GSTT_1delM_1del$ – у 78,57% випадків (порівняно з I групою $p<0,05$).

Разом із тим, у клінічних групах порівняння не встановлено статистично вірогідних відмінностей за такими показниками індивідуального алергологічного анамнезу як наявність супутньої алергічної патології у дітей, відмітки про клінічні прояви «ексудативно-катарального діатезу» та штучний характер вигодовування на 1 році життя (табл.1).

Таблиця 1

Особливості індивідуального алергологічного анамнезу (%)

Групи хворих	Кількість дітей	Клінічні прояви ЕКД на 1 році життя	Штучне вигодовування на 1 році життя	Наявність супутньої алергічної патології
I група	68	47,76	56,25	44,78
II група	82	46,15	56,76	49,37
p		$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$

Примітка: ЕКД – ексудативно-катаральний діатез; P – критерій Ст'юдента.

Отже, попри тяжчий перебіг і більш ранній початок захворювання, у цілому алергологічний статус пацієнтів із поліморфізмом генів глутатіон-трансфераз T_1 і M_1 не відрізнявся. Так, серед хворих із генотипом $GSTT_1delM_1del$ частка хворих із ознаками ЕКД становила 57,14%, на штучному вигодовуванні на 1 році життя – 69,23%, а із супутньою алергопатологією – 42,88% (в усіх випадках $P>0,05$). З цього можна зробити висновок про те, що або вивчені делеції відповідних глутатіон-трансфераз незначно трансформують атопічну налаштованість дитячого організму, відбиваючись лише на посиленні алергічного запалення у дихальних шляхах, або функція даних трансфераз протезується іншими ферментами детоксикаційного каскаду.

Проведений аналіз особливостей показників неспецифічної гіперсприйнятливості бронхів до прямого бронхоспазмогенного стимулу – гістаміну, - дозволив встановити особливості, що полягали у найменш виразній чутливості дихальних шляхів у дітей із функціонально повноцінними генами глутатіон-трансфераз (генотип $GSTT_1+M_1+$), в яких показник $ПК_{20}Г$ становив $5,0\pm 0,2$ мг/мл, та найвиразніших її показниках у хворих із виявленими делеціями генів (генотип $GSTT_1delM_1del$), в яких $ПК_{20}Г$ сягав лише $0,14\pm 0,05$ мг/мл ($p<0,05$).

Усім дітям під час приступу проводилося регламентоване вітчизняними протоколами і міжнародними узгоджувальними документами полегшувальне лікування, що передбачало призначення глюкокортикостероїдів (інгаляційних та/або системних), бета2-агоністів, препаратів теофілінового ряду, інфузійну терапію. Для формалізації оцінки активності терапії ми використали бальну оцінку, позначивши 1 балом монотерапію інгаляційними бета₂-агоністами, 2 балами – ентральне призначення цих засобів, чи еуфіліну, або використання інгаляційних глюкокортикостероїдів, у 3 бали – інфузійну терапію з чи без еуфіліну, системні глюкокортикостероїди. У таблиці 2 наведена сума балів активності медикаментозної терапії дітей із загостренням бронхіальної астми упродовж 6 днів стаціонарного лікування.

Таблиця 2

Активність медикаментозної терапії у дітей груп порівняння
(у балах) (M±m)

Групи хворих	Кількість дітей	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день
I група	68	7,2±1,0	6,6±0,9	5,6±0,8	4,2±0,5	4,2±0,5	3,8±0,5
II група	82	9,0±0,8	9,0±0,8	6,5±1,4	5,0±1,2	5,0±1,2	5,0±1,2
	p	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Отримані дані ще раз підтвердили наявність тенденції до більш тяжкого перебігу бронхіальної астми в пацієнтів II клінічної групи, що дозволяє розглядати хворих із наявними делеціями вивчених генів глутатіон-трансферази як групу ризику щодо тяжкого нападу захворювання, що вимагає індивідуалізованого підходу до складання лікувальної тактики приступного періоду. Слід зауважити, що за виразністю бронхообструктивного синдрому (БОС) (оціненого в балах) вірогідної різниці у оцінці його тяжкості у клінічних групах порівняння при поступленні до стаціонару не встановлено. Так, тяжкість БОС у 1 день лікування у I клінічній групі в середньому оцінювалася у 11,7±1,8 балу, а у II групі – у 11,0±2,1 балу (p>0,05). Проте, частота використання системних глюкокортикостероїдів у перший день стаціонарного лікування у I групі становила 77,8%, а у II – 100% випадків, а інгаляційні глюкокортикостероїди отримували 100% хворих II групи і 88,8% представників I групи. Інфузійної терапії потребували лише 22,2% дітей I та 100% хворих II клінічної групи (p<0,05), причому 2/3 хворих із делеційним поліморфізмом генів глутатіон-S-трансфераз отримували препарати теофілінового ряду та стільки ж – антибактеріальні засоби, на противагу представникам I клінічної групи, де частота використання даних лікарських засобів становила 55,6% та 66,7% випадків.

Отже, за наявності делеційного поліморфізму генів, що кодують ферменти II фази детоксикації ксенобіотиків, період загострення бронхіальної астми вимагає більш активного лікування, зокрема, з точки зору призначення глюкокортикостероїдних препаратів системної дії. Так, відносний ризик потреби у такій терапії становив 1,3 (95% ДІ: 0,2-8,7), показник співвідношення шансів – 28,2 (95% ДІ: 3,7-214,1), атрибутивний ризик – 21%.

ВИСНОВКИ

- За наявності делеційного поліморфізму генів глутатион-S-трансфераз GSTT₁M₁ бронхіальна астма у хворих шкільного віку перебігає тяжче, навіть за відсутності розбіжностей в індивідуальному алергологічному анамнезі дітей.
- Функціонально неповноцінні гени GSTT₁M₁ асоціюють із виразнішою неспецифічною гіперсприйнятливістю бронхів до гістаміну.
- У дітей, які є гомозиготними із делецією обох копій генів GSTT₁ та GSTM₁, нападний період бронхіальної астми перебігає важче, та у 28 разів є вищими шанси отримувати системні глюкокортикостероїдні препарати в комплексі стартової дезобструктивної терапії.

Література

1. Борвинская Е.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н. Глутатион-s-трансферазы рыб – потенциальные эколого-биохимические индикаторы антропогенного воздействия на водную среду (обзор). Труды Карельского научного центра РАН. 2009, 3: 8–19.
2. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы. Под ред. Чучалина А.Г. М.: Издательский дом «Атмосфера». 2007.
3. Наказ МОЗ України №767 від 27.12.2005 р. «Про затвердження Протоколів діагностики та лікування алергологічних хвороб у дітей»: Режим доступу http://moz.gov.ua/ua/portal/dn_20051227_767.html.
4. СерEDA Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М. Ферменты метаболизма эстрогенов и рецепторы как факторы риска развития и прогноза при раке молочной железы. Онкология. 2004, 1: 35-42.
5. Перетока Е.С., Герасименко М.Н., Дерговец Д. Исследование состояния глутатионового звена у больных раком почки. Молодёжь и наука: Сборник материалов VII Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных, посвященной 50-летию первого полета человека в космос [Электр. ресурс]. Красноярск: Сибирский федеральный ун-т, 2011. Режим доступа: <http://conf.sfu-kras.ru/sites/mn2011/section14.html>.
6. Beckett G.J., Hayes J.D. Glutathione S-transferases: biomedical applications. Adv. Clin.Chem. 1993, 30: 281-283.
7. Saadat M., Ansari-Lari M. Genetic polymorphism of glutathione-S-transferase T1, M1 and asthma, a meta-analysis of the literature. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2007, 10 (23): 4183-4189.
8. Wilce M.C., Parker M.W. Structure and function of glutathione S-transferases. Biochem. Biophys. Acta. 1994, 1205 (1): 1-18.

Л.В. Микалюк

Эффективность стартовой дезобструктивной терапии
бронхиальной астмы у детей в зависимости от полиморфизма
генов глутатион-S-трансфераз GSTT₁ и GSTM₁

Буковинский государственный медицинский университет
МЗ Украины, Черновцы

Введение. Семейству глутатион-S-трансфераз принадлежит весомая роль в развитии и течении многих заболеваний, однако значение полиморфизма генов, которые их кодируют, изучено недостаточно.

Цель. Изучить особенности лечения приступов бронхиальной астмы у школьников в зависимости от полиморфизма генов GSTT₁ и GSTM₁ для оптимизации облегчающей терапии.

Методы. Комплексно обследованы 150 страдающих астмой школьников.

Результаты. При делеционном полиморфизме генов GSTT₁ и GSTM₁ тяжёлое течение заболевания отмечалось у 71,4% случаев, а гипервосприимчивость бронхов к гистамину – наиболее выраженной (PC₂₀H – 0,14±0,05 мг/мл). Дезобструктивная терапия была более активной, а показатели риска использования системных глюкокортикостероидов такими: отношение шансов – 28,2 (95% ДИ 3,7-214,1), атрибутивный риск – 21%.

Выводы. Делеционный полиморфизм генов GSTT₁ и GSTM₁ ассоциирует с более тяжёлым течением бронхиальной астмы у школьников, в частности её приступов, а такие больные требуют более активной терапии.

Ключевые слова: дети, астма, глутатион-S-трансферазы, генетический полиморфизм.

L.V. Mykaliuk

The efficiency of starting desobstructive therapy of children's bronchial asthma depending on the gene polymorphism of glutathione-S- transferases (GSTT1 and GSTM1)

Bukovina state medical university of MP of Ukraine, Chernovcy

Introduction. The family of glutathione-S-transferases has an important role in the development and clinical course of many diseases, but the significance of genes polymorphisms, that encode them, has been studied insufficiently.

Purpose. To study the features of treating bronchial asthma attacks in school-age children depending on gene polymorphism (GSTT1 and GSTM1) for optimizing the relief therapy.

Methods. 150 school-age children with bronchial asthma underwent a complex examination.

Results. 71.4% of the patients had a severe clinical course, bronchial hypersensitivity to histamine was the most expressive (PC₂₀H – 0.14±0.05 mg/ml) if it was present the deletion of gene polymorphism (GSTT1 and GSTM1). The desobstructive therapy was the most active and the risk indicators of using the systemic hormones were as follow: OR – 28.2 (95%CI 3.7-214.1), AR – 21%.

Conclusions: The deletion of gene polymorphism (GSTT1 and GSTM1) is associated with the most severe clinical course of bronchial asthma in school-age children, in particular, its attacks, and these patients need more active therapy.

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