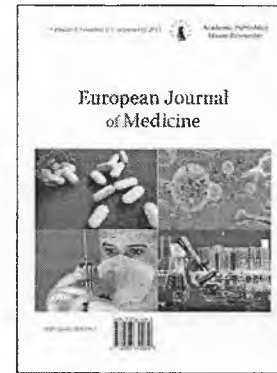


Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*



Published in the Russian Federation
European Journal of Medicine
Has been issued since 2013.
ISSN: 2308-6513
E-ISSN: 2310-3434
Vol. 5, No. 3, pp. 149-154, 2014

DOI: 10.13187/ejm.2014.5.149
www.ejournal5.com



UDC 616

Indices of Exhaled Breath Condensate in Children With Bronchial Asthma Under the Deletion Polymorphism of Genes GSTT1 and GSTM1

¹Olena C. Koloskova

²Tetiana M. Bilous

³Lyudmyla V. Mikaluk

¹⁻³Bukovinian State Medical University, Ukraine
Department of Pediatrics and children infectious diseases

Abstract

It has been performed complex examination of 150 school-aged children with bronchial asthma, which included a study of exhaled breath condensate and a determination of deletions in the genes of glutathione-S-transferase (GSTM1 and GSTT1). A greater activity of bronchial inflammation manifested by increased activity of oxidative stress with the accumulation of products of oxidative modification of proteins in exhaled breath condensate has been noticed during asthma exacerbation in children with deletion polymorphism of genes GSTT1 and GSTM1 compared with patients without those genetic changes.

Keywords: exhaled breath condensate; children; bronchial asthma.

Введение

Несмотря на то, что сейчас ключевой особенностью бронхиальной астмы (БА) признана бронхиальная гиперреактивность, которая включает хроническое воспаление дыхательных путей, гиперсекрецию слизи, ремоделирование бронхов [1, 2], развитие клинически значимых фенотипов астмы зависит, в первую очередь, от генетических и экологических факторов. Так, считается, что астма вызвана сочетанием нескольких генетических и экологических факторов, которые следует учитывать при изучении ее патогенеза, и именно этим взаимодействием факторов можно объяснить неоднородность заболевания, которое особенно выражено проявляется у детей [3, 4]. Следует отметить, что дети более чувствительны к воздействию загрязнения окружающей среды, видимо, за счет незавершенного развития легочной системы. Лишь в отдельных исследованиях изучали влияние ксенобиотиков на дыхательную систему детей школьного возраста, и в единичных - у детей младшего возраста [5]. Частым источником окислителей для легких являются активные формы кислорода и азота, которые образуются из активированных бронхиальных эпителиальных и воспалительных клеток при вдыхании загрязняющих соединений, в частности, табачного дыма, озона, диоксида серы и т.д. [6, 7] Хотя кислород жизненно необходим для нашего организма, его излишки могут вызвать окислительный стресс, который является проявлением дисбаланса между активными формами кислорода и антиоксидантами. Источники активных форм кислорода могут быть как экзогенные, так и

эндogenous: экзогенные образуются из выхлопных газов дизельных двигателей, табачного дыма, а эндогенные синтезируются собственными клетками при воспалительных процессах [8]. Активные формы кислорода могут повреждать эпителий дыхательных путей, вызывать их воспалительную инфильтрацию, нарушать слизистый секрет, функцию гладких мышц, что в дальнейшем приводит к обструкции бронхов и гиперреактивности [9].

В последние годы интерес к исследованиям взаимодействия генотипа и факторов окружающей среды растет и одновременно возникает вопрос об оценке загрязнения окружающей среды и возможности его уменьшения, особенно при реализации целевых мероприятий здравоохранения [10, 11]. Актуальным остается оценка влияния генов, персональных факторов и факторов риска окружающей среды, которые, наслаиваясь друг на друга, способствуют развитию, персистенции и прогрессированию БА.

Именно 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. GSTs катализируют детоксикацию гидроперекисей, осуществляют детоксикацию электрофильных веществ, связывая их с глутатионом и уменьшая вредное воздействие активных форм кислорода на важные протеиновые компоненты клеток [12, 13]. Изучение ассоциации полиморфизма генов GST с бронхиальной астмой показало, что нулевой генотип GSTM1 и GSTT1 способствует развитию бронхиальной астмы и может выступать генетическим фактором риска данного заболевания [14, 15]. Распространенность делеции GSTM1 и GSTT1 увеличивается у пациентов с БА, что позволило сделать вывод об увеличении риска БА и снижении функции легких при наличии полиморфизма данных генов [16, 17]. Однако все же большинство исследований проведены у взрослых пациентов, а в Украине подобные исследования не проводились.

Цель исследования. Изучить показатели конденсата выдыхаемого воздуха у детей, больных бронхиальной астмой, в зависимости от наличия делеционного полиморфизма генов глутатион-S-трансферазы T1 и M1.

Материалы и методы

Для достижения цели исследования и решения поставленных задач методом простой случайной выборки создана когорта из 150 детей школьного возраста, больных бронхиальной астмой, которым проведено комплексное клиничко-параклиническое обследование в условиях аллергологического отделения ОДКБ г. Черновцы (Украина). Определение делеций в генах глутатион-S-трансферазы GSTT1 и GSTM1 проведено методом мультиплексной полимеразной цепной реакции, в качестве положительного контроля успешности реакции использовали амплификацию фрагментов гена BRCA1. Для визуализации фрагментов ДНК гель окрашивали этидия бромидом и фотографировали в ультрафиолетовом свете на установке GelDoc 2000 (BioRad, США). Для определения длины полученных фрагментов их электрофоретическую подвижность сравнивали с подвижностью ДНК-маркера Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas, Литва). Ожидаемые длины фрагментов ДНК (431 нп для GSTT1 и 120 нп для GSTM1) рассчитывали с помощью пакета программ компьютерной обработки данных DNASTAR с использованием последовательностей генов GSTT1 и GSTM1, имеющих в базе данных Genbank. Гомозиготные формы с делецией обеих копий генов GSTT1 и GSTM1 идентифицировали при отсутствии соответствующего фрагмента на электрофореграмме и обозначали как T1- и M1-. Наличие этих фрагментов на электрофореграммах свидетельствовало о гомо- или гетерозиготности по нормальной копии гена и генотип таких пациентов обозначали как T1+ и M1+.

В общей когорте генотип GSTT1+M1+ отмечено у 69 больных (46,0 %), генотип GSTT1-M1+ - у 19 (12,7 %), GSTT1+M1- - у 48 детей (32,0 %) и GSTT1-M1- у 14 пациентов (9,3 %). Исходя из полученных результатов, всех обследованных больных разделили на две клинические группы. Первую (I) клиническую группу составили 69 детей, больных бронхиальной астмой, у которых не отмечено делеционного полиморфизма изученных генов, поэтому генотип определяли как GSTT1+M1+. Средний возраст составил 10,7±0,35 года, мальчиков было 48 (69,9 %). В состав второй (II) группы сравнения вошел 81 больной, у которого определился делеционный полиморфизм изученных генов ферментов детоксикации в гомо- и гетерозиготном вариантах, что выражалось генотипом

GSTT1-M1-, GSTT1-M1+ и GSTT1-M1-. Мальчиков в данной группе было 53 (65,4 %), средний возраст больных составил $10,7 \pm 0,33$ года. Не выявлено различий по месту жительства обследованных детей: в пределах города проживало 34 представителя I клинической группы (49,3 %) и 35 больных II группы (43,2 %, $P > 0,05$).

Конденсат выдыхаемого воздуха получали в послеприступном периоде с помощью спроектированного конденсора (патент №45346 UA МПК А61В 5/08). В конденсате выдыхаемого воздуха определяли: содержание общего протеина по методу Lowry, содержание альдегид- и кетопроизводных 2,4-динитрофенилгидразонов (АКДФГ) основного и нейтрального характера по методике Е.Е. Дубининой и соавт.; протеолитическую активность по лизису азоальбумина, азоказеина и азоколлагена по К.Н. Веремеенко и соавт.; активность каталазы по Королюк М.А. и соавт., содержание метаболитов оксида азота по Н.Л. Емченко (1994) в модификации А.И. Гоженко (2002).

Исследование проведено с соблюдением биоэтических требований в параллельных клинических группах сравнения, сформированных по принципу простой рандомизации, методом "случай-контроль", с соблюдением основных требований к нему. Полученные результаты исследования анализировались методом биостатистики и клинической эпидемиологии, а также с помощью пакета программ "STATISTICA 7.0" StatSoft Inc. и Excel XP для Windows на персональном компьютере с использованием параметрических и непараметрических методов вычисления. Диагностическую ценность показателей оценивали по чувствительности теста (ЧТ), специфичности (СТ), предсказуемой ценности положительного (ПЦПР) и негативного результата (НЦНР), отношением правдоподобия (ОП), соотношением шансов, абсолютного риска и посттестовой вероятности события.

Результаты

Тяжесть течения бронхиальной астмы у детей групп сравнения в клинических группах сравнения в среднем совпадала. Так, в первой клинической группе легкое, средней тяжести и тяжелое персистирующее течение заболевания встречалось в 7,2 %, 49,3 % и 43,5 % пациентов соответственно. Во второй клинической группе сравнения интермиттирующее течение заболевания зарегистрировано у 1 ребенка (1,2 %), легкое персистирование астма имела у 2 больных (2,5 %), а среднетяжелое и тяжелое – соответственно в 46,9 % и 49,4 % наблюдений ($p > 0,05$).

Проанализировано содержание метаболитов оксида азота (МОА) в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) детей с БА в зависимости от особенностей результатов молекулярно-генетического анализа полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1. Так, у обследованных детей I группы содержание метаболитов МОА в КВВ составило в среднем $40,5 \pm 4,02$ мкмоль/л, у пациентов II группы сравнения – $42,1 \pm 3,82$ мкмоль/л ($P > 0,05$). Несмотря на отсутствие существенных различий в средних показателях в группах детей, содержание метаболитов монооксида азота более 45,0 мкмоль/л в I группе случалось только в 25,0 % случаев, а в подгруппе сравнения – в 40,0 % наблюдений. Наличие делеционного полиморфизма изученных генов ассоциирует с риском выразительного местного воспалительного процесса в бронхах (с содержанием метаболитов МОА более 45,0 мкмоль/л): СШ – 2,0 (95 % ДИ: 0,5–8,5), АР-17 %. В свою очередь, использование данного биохимического показателя повышало посттестовую вероятность наличия делеционного полиморфизма изученных генов на 11,5 %.

Поскольку у детей при обострении БА вследствие избыточного образования свободно-радикальных соединений может усиливаться окислительная модификация протеинов, определено содержание таких их продуктов как альдегидо- и кетопроизводные 2,4-динитрофенилгидразонов основного и нейтрального характера (табл. 1).

Таблица 1

**Содержание общего протеина и продуктов его окислительной модификации
в конденсате выдыхаемого воздуха обследованных детей (M±m)**

Клинические группы	Общий протеин, г/л	Продукты окислительной модификации протеинов	
		основного характера, Е 430 ммоль/г протеина	нейтрального характера, Е 370 ммоль/г протеина
I группа	4,39±0,43	36,68±4,13	4,50±0,47
II группа	3,65±0,59	75,98±18,86	7,93±1,81
P	>0,05	<0,05	<0,05

Выявленные изменения в КВВ, вероятно, отражали интенсивные процессы окислительной модификации протеинов у детей с делеционным полиморфизмом генов GSTT1 и GSTM1, видимо, вследствие нарушения процессов детоксикации и элиминации эндогенных продуктов окислительного стресса. Показано, что генотип GSTT1+M1-, GSTT1-M1+ или GSTT1-M1- повышал риск увеличения продуктов окислительной модификации протеинов в виде АКДНФГ основного характера более 4,5 Е370 ммоль/г протеина: СШ=8,0 (95 % ДИ: 0,5-127,9), AP=46,7 %.

Известно, что в ходе окислительного стресса усиленная окислительная модификация протеинов инициирует повреждения биосубстратов и коферментов, вызывающее высвобождение внутриклеточных протеаз, причем при нарушении регуляции активности протеаз при воспалительном процессе интенсивность протеолиза протеинов повышается. Исходя из этого, предполагали изменения в показателях протеолитической активности в КВВ у обследованных детей (табл. 2).

Таблица 2

**Показатели протеолитической активности в конденсате выдыхаемого воздуха
детей клинических групп сравнения (M±m)**

Клинические группы	Протеолитическая активность, мл/час		
	по лизису азоальбумина	по лизису азоказеина	по лизису азокола
I группа	1,59±0,06	1,45±0,07	0,24±0,04
II группа	1,48±0,14	1,44±0,09	0,21±0,03
P	>0,05	>0,05	>0,05

Несмотря на отсутствие статистически достоверных отличий, отмечено, что у детей без делеционного полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1 есть тенденция к более активным процессам протеолиза протеиновых соединений.

Следует отметить, что тенденция к усилению окислительной модификации протеинов у детей, больных БА при отсутствии делеционного полиморфизма изученных генов системы биотрансформации ксенобиотиков, происходила на фоне снижения активности каталазы по сравнению с пациентами, имевшими генотип GSTT1+M1-, GSTT1-M1+ или GSTT1-M1-. Так, у пациентов I группы активность каталазы в КВВ составляла в среднем 42,4±9,56 мкмоль/мин×мг протеина, а у больных II группы – 53,8±14,82 мкмоль/мин×мг протеина (P>0,05). Несмотря на выявленные тенденции в средних показателях активности каталазы, качественный анализ распределения результатов показал, что уровень активности данного ключевого фермента антиоксидантной системы, не превышал 50,0 мкмоль/мин×мг протеина, причем в 2,4 раза повышал шансы наличия делеционного полиморфизма генов детоксикации: СШ – 2,4 (95 % ДИ: 0,58–9,93), AP – 22 %, ЧТ – 85,7 % (95 % ДИ: 67,33–95,97 %), СТ – 28,57 % (95 % ДИ: 11,28–52,18), ПЦПР – 61,54 % (95 % ДИ: 44,62–76,64 %), отношение правдоподобия – 1,2 и посттестовая вероятность – 54,5 %.

Выводы

У детей с делеционным полиморфизмом генов GSTT1 и GSTM1 по сравнению с пациентами без такого во время обострения бронхиальной астмы в конденсате выдыхаемого воздуха отмечается большая активность воспаления бронхов, проявляющееся повышением активности процессов окислительного стресса с накоплением продуктов окислительной модификации протеинов.

Примечания:

1. Grootendorst D.C. Mechanisms of bronchial hyperreactivity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease / D.C. Grootendorst, K.F. Rabe // *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2004. Vol. 1. P. 77-87.
2. Predictive value of respiratory symptoms and bronchial hyperresponsiveness to diagnose asthma in New Zealand / D. Sistek, K. Wickens, R. Armstrong [et al.] // *Respir. Med.* 2006. Vol. 100. P. 2107-2111.
3. Kauffmann F. Gene-environment interactions in asthma and allergic diseases: challenges and perspectives // F. Kauffmann, F. Demenais // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012. Vol. 130 (6). P. 1229-1240.
4. Phenotype definition, age and gender in the genetics of asthma and atopy / R.W.B. Bottema, N.E. Reijmerink, G.H. Koppelman [et al.] // *Immunology and Allergy Clinics of North America.* 2005. Vol. 25. P. 621-639.
5. Associations between multiple environmental exposures and glutathione S-transferase P1 on persistent wheezing in a birth cohort / K.T. Schroer, J.M. Myers, P.H. Ryan [et al.] // *J. Pediatr.* 2009. Vol. 154 (3). P. 401-408.
6. Glutathione S-transferase, incense burning and asthma in children / I-J. Wang, C-H. Tsai, C-H. Chen [et al.] // *ERJ.* 2011. Vol. 37, N. 6. P. 1371-1377.
7. Glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) and theta 1 (GSTT1) genetic polymorphisms and atopic asthma in children from Southeastern Brazil / C.S.P. Lima, I.A. Néri, G.J. Lourenço [et al.] // 2010. Vol. 33 (3). P. 438-441.
8. Henricks P.A. Reactive oxygen species as mediators in asthma / P.A. Henricks, F.P. Nijkamp // *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2001. Vol. 14 (6). P. 409-420.
9. Glutathione S-transferase genotype increases risk of progression from bronchial hyperresponsiveness to asthma in adults / M. Imboden, T. Rochat, M. Brutsche [et al.] // *Thorax.* 2008. Vol. 63. P. 322-328.
10. Glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma / L. Tamer, M. Calikoğlu, N.A. Ates [et al.] // *Respirology.* 2004. Vol. 9 (4). P. 493-498.
11. London S.J. Gene-air pollution interactions in asthma / S.J. London // *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2007. Vol. 4 (3). P. 217-220.
12. Oxidative stress and its determinants in the airways of children with asthma / R. Dut, E.A. Dizdar, E. Birben [et al.] // *Allergy.* 2008. Vol. 63, Iss. 12. P. 1605-1609.
13. Glutathione-S-transferase genes and asthma phenotypes: a Human Genome Epidemiology (HuGE) systematic review and meta-analysis including unpublished data / C. Minelli, R. Granell, R. Newson [et al.] // *Int. J. Epidemiol.* 2010. Vol. 39 (2). P. 539-562.
14. Studies on the genetic diathesis of asthma bronchial / Y.Q. Zhang, B.Y. Sun, J.J. Dai [et al.] // *Yi Chuan.* 2004. Vol. 26(2). P. 147-150.
15. Possible gene dosage effect of glutathione-S-transferases on atopic asthma: using real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers / C. Brasch-Andersen, L. Christiansen, Q. Tan [et al.] // *Hum. Mutat.* 2004. Vol. 24 (3). P. 208-214.
16. The GSTP1 gene is a susceptibility gene for childhood asthma and the GSTM1 gene is a modifier of the GSTP1 gene / F. Kamada, Y. Mashimo, H. Inoue [et al.] // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2007. Vol. 144 (4). P. 275-286.
17. Ivaschenko T.E. Glutathione-S-transferase micro and theta gene polymorphisms as new risk factors of atopic bronchial asthma / T.E. Ivaschenko, O.G. Sideleva, V.S. Baranov // *J. Mol. Med.* 2002. Vol. 80. P. 39-43.

УДК 616.248-053.2:612.231:575.113

**Показатели конденсата выдыхаемого воздуха у детей
с бронхиальной астмой при наличии делеционного полиморфизма
генов GSTT1 и GSTM1**

¹ Елена Константиновна Колоскова

² Татьяна Михайловна Белоус

³ Людмила Викторовна Микалюк

¹⁻³ Буковинский государственный медицинский университет, Украина
Кафедра педиатрии и детских инфекционных болезней
E-mail: tanja.vorotnjak@gmail.com

Аннотация. Обследовано 150 детей школьного возраста с бронхиальной астмой, которым определяли наличие делеций в генах глутатион-S-трансферазы GSTT1 и GSTM1, показатели конденсата выдыхаемого воздуха. Отмечено, что у детей с делеционным полиморфизмом генов GSTT1 и GSTM1 по сравнению с пациентами без такого во время обострения бронхиальной астмы в конденсате выдыхаемого воздуха отмечается большая активность воспаления бронхов, проявляющееся повышением активности процессов окислительного стресса с накоплением продуктов окислительной модификации протеинов.

Ключевые слова: бронхиальная астма; дети; глутатион-S-трансфераза.