

Л.О. Безруков, О.К. Колоскова, Т.М. Білоус  
Буковинський державний медичний університет

## Активність запалення бронхів у дітей, хворих на бронхіальну астму, залежно від делеційного поліморфізму генів GSTM1, GSTT1

На даний час виявлено та вивчено близько 200 генів, пов'язаних із розвитком бронхіальної астми (БА), причому в основному це гени схильності до atopії та бронхіальної гіперреактивності. В інших роботах виокремлено такі групи генів, як гени факторів антигенного розпізнавання та гуморальної імунної відповіді (HLA-DRB, MGF), гени факторів запалення (LTC4S, NOS, HRF), гени рецепторів цитокінів й агентів запалення (GRL, ADRB2), гени внутрішньоклітинних сигнальних молекул (STAT6, NFYB, NFKB1) і гени біотрансформації ксенобіотиків (NAT2, NAT9, GSTM, GSTT, CYP1A) [2, 4, 6]. Саме внаслідок модуляції запалення генами бронхіальної тканини, особливо генами-модифікаторами розвитку БА, може формуватися хронічне запалення дихальних шляхів та їх ремоделювання [1]. Зокрема, за недостатнього функціонування антиоксидантних систем ксенобіотики, пошкоджуючи епітелій дихальних шляхів, порушують функціонування слизового секрету, призводять до обструкції бронхів та їх гіперреактивності. Активні форми кисню та інші патогенні чинники зазвичай знешкоджуються системою біотрансформації ксенобіотиків, проте поліморфізм генів, що кодує ферменти даної системи, може сприяти розвитку схильності дитини до постійного токсичного стресу. Так, гени сімейства ферментів глутатіон-S-трансфераз (GSTT1 і GSTM1), які залучені до патогенезу багатьох захворювань, виступають як модифікатори та чинники ризику (схильності) при патології, пов'язаній із несприятливими впливами навколишнього середовища [10].

Вивчення асоціації поліморфізму генів GST з БА, проведене у Китаї, виявило, що нульовий генотип GSTM1 та GSTT1 сприяє розвитку БА та може виступати генетичним фактором ризику даного захворювання [9]. В Японії проведені подібні дослідження та

відмічено схильність дітей до розвитку БА при нульовому генотипі GSTM1 та GSTP1 [12]. Разом з тим, у дорослих GSTM1- та GSTP1-алелі були пов'язані з хронічним обструктивним захворюванням легень (ХОЗЛ) та БА, що підтверджує роль даних локусів у патогенезі бронхіальної обструкції у похилому віці [11].

Оскільки GSTM1 знешкоджує електрофільні речовини шляхом їх каталізу з глутатіоном, у GSTM1-нульових осіб метаболіти токсикантів не виводяться з організму та можуть призвести до пошкодження клітин і формування окисного стресу [7]. До того ж GSTM1 може керувати окисним стресом через регуляцію внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, які взаємодіють з сигнальними кіназами [8] та цистеїновими протеїнами [3]. За результатами окремих робіт виявлено зв'язок нульового генотипу GSTM1 з підвищеним ризиком atopії, що пояснюється впливом ксенобіотиків на опасисті клітини з їх подальшою дегрануляцією, що може провокувати бронхообструкцію та ремоделювання бронхів [5]. Разом із тим, особливості перебігу БА та активність запального процесу бронхів у дітей залежно від поліморфізму генів глутатіон-S-трансфераз (зокрема, GSTT1 та GSTM1) наразі вивчені недостатньо.

**Мета дослідження:** вивчити показники конденсату видихуваного повітря (КВП) у дітей, хворих на БА, із наявністю чи відсутністю делеційного поліморфізму генів GSTM1, GSTT1.

### Матеріали і методи дослідження

Для досягнення мети роботи у дітей шкільного віку методом генетично-молекулярного аналізу встановлено наявність поліморфізму генів сімейства глутатіон-S-трансферази – GSTT1 та GSTM1. У загальній когорті зі 150 школярів генотип GSTT1+M1+ відмічено у 69 хворих (46,0%), генотип GSTT1–M1+ – у 19 (12,7%), GSTT1+M1– – у 48 дітей (32,0%) та

GSTT1–M1 – у 14 пацієнтів (9,3%). Виходячи з отриманих результатів, усіх обстежених хворих поділили на дві клінічні групи: 1-шу (основну) клінічну групу склали 69 дітей, хворих на БА, в яких не відмічено делеційного поліморфізму вивчених генів, тому генотип визначали як GSTT1+M1+. Середній вік становив 10,71 року, хлопців було 48, дівчаток – 21. До складу 2-ї групи (порівняння) увійшов 81 хворий, в якого траплявся делеційний поліморфізм вивчених генів ферментів детоксикації у гомо- та гетерозиготному варіантах, що виражалося генотипом GSTT1+M1–, GSTT1–M1+ та GSTT1–M1–. Хлопчиків у даній групі було 53 (65,43%), дівчаток – 28 (34,57%), середній вік хворих становив  $10,75 \pm 0,33$  року (95% ДІ: 10,09–11,42). За основними клінічними характеристиками групи були порівнянними.

Комплекс досліджень КВП включав визначення загального протеїну за методом О.Н. Lowry; вмісту альдегідо- і кетопохідних 2,4-динітрофенілгідразонів (АКДНФГ) основного і нейтрального характеру за методикою О.Є. Дубініної та співавт.; протеолітичної активності за лізисом азоальбуміну, азоказеїну та азоколагену за К.Н. Веремеєнко та співавт., вмісту метаболітів монооксиду азоту (МОА) за методикою Н.Л. Ємченко; сумарної, ферментативної та неферментативної, фібринолітичної активності за методикою О.Л. Кухарчука. Отримані результати дослідження аналізували за допомогою пакету програм «STATISTICA 7.0» StatSoft Inc. з використанням параметричних і непараметричних методів обчислення, а також методів біостатистики та клінічної епідеміології. Діагностичну цінність показників оцінювали за чутливістю, специфічністю (СТ), передбачуваною цінністю позитивного (ПЦПР) і негативного результату (ПЦНР), відношенням правдоподібності (ВП), співвідношенням шансів (СШ), абсолютним ризиком (АР), посттестовою вірогідністю (ПВ).

### Результати дослідження та їх обговорення

Проаналізовано вміст метаболітів МОА в КВП дітей, хворих на БА, залежно від особливостей результатів молекулярно-генетичного аналізу поліморфізму генів GSTT1 та GSTM1. Так, в обстежених дітей 1-ї групи вміст метаболітів МОА в КВП у середньому становив  $40,56 \pm 4,02$  (min 17,3; max 71,2) мкмоль/л, у пацієнтів 2-ї групи (групи порівняння) –  $42,08 \pm 3,82$  (min 16,2; max 74,1) мкмоль/л ( $p > 0,05$ ). Попри відсутність суттєвих розбіжностей у середніх показниках у групах дітей, вміст метаболітів МОА  $> 45,0$  мкмоль/л у 1-й групі траплявся лише у 25,0% випадків, а у групі порівняння – у 40,0% спостережень. Отже, наявність делеційного поліморфізму вивчених генів асоціює з ризиком виразнішого місцевого запального процесу в бронхах (зі вмістом метаболітів МОА  $> 45,0$  мкмоль/л): СШ – 2,0 (95% ДІ: 0,5–8,5), ВР – 1,3 (95% ДІ: 0,5–3,6), АР – 17%. У свою чергу, використання даного біохімічного показника підвищувало ПВ наявності делеційного поліморфізму вивчених генів на 11,54% при позитивному результаті.

Беручи до уваги, що у дітей при загостренні БА внаслідок надлишкового утворення вільно-радикальних сполук може посилюватися окислювальна модифікація протеїнів, визначено вміст таких їх продуктів, як АКДНФГ основного й нейтрального характеру (табл. 1).

Виявлені зміни в КВП, ймовірно, відображали інтенсивніші процеси окислювальної модифікації протеїнів у дітей із делеційним поліморфізмом генів GSTT1 та GSTM1, мабуть, внаслідок порушення процесів детоксикації та елімінації ендогенних продуктів окисного стресу. Показано, що генотип GSTT1+M1–, GSTT1–M1+ або GSTT1–M1– підвищував ризик зростання маркерів окислювальної модифікації протеїнів (визначені за вмістом таких її продуктів, як АКДНФГ основного характеру),  $> 4,5$  Е370 ммоль/г білка: СШ – 8,0 (95% ДІ: 0,5–127,9), ВР – 2,4 (95% ДІ: 0,4–15,15), АР – 46,7%.

Як відомо, у ході окисного стресу посилена окислювальна модифікація протеїнів ініціює пошкодження біосубстратів і коферментів, що спричиняє вивільнення внутрішньоклітинних протеаз, причому при порушенні регуляції активності протеаз за запального процесу інтенсивність протеолізу протеїнів підвищується. Виходячи з цього, можна було припустити зміни в показниках протеолітичної активності у КВП в обстежених дітей (табл. 2).

Отже, попри відсутність статистично вірогідних відмінностей, виявлено, що в дітей без делеційного поліморфізму генів GSTT1 та GSTM1 спостерігається тенденція до дещо активніших процесів протеолізу

Таблиця 1. Вміст загального протеїну і продуктів його окислювальної модифікації у КВП дітей порівнюваних груп ( $M \pm m$ )

Клінічні групи	Загальний протеїн, г/л	Продукти окислювальної модифікації протеїнів	
		Основного характеру, Е 430 ммоль/г протеїну	Нейтрального характеру, Е 370 ммоль/г протеїну
1-ша група	$4,39 \pm 0,43$	$36,68 \pm 4,13$	$4,50 \pm 0,47$
2-га група	$3,65 \pm 0,59$	$75,98 \pm 18,86$	$7,93 \pm 1,81$
p	$> 0,05$	$< 0,05$	0,05

Примітка: p – вірогідність різниці.

Таблиця 2. Показники протеолітичної активності у КВП дітей клінічних груп порівняння ( $M \pm m$ )

Клінічні групи	Протеолітична активність, мл/год		
	За лізисом азоальбуміну	За лізисом азоказеїну	За лізисом азоколу
1-ша група	$1,59 \pm 0,06$	$1,45 \pm 0,07$	$0,24 \pm 0,04$
2-га група	$1,48 \pm 0,14$	$1,44 \pm 0,09$	$0,21 \pm 0,03$
p	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$

Примітка: p – вірогідність різниці.

Таблиця 3. Фібринолітична активність КВП обстежених дітей ( $M \pm m$ )

Клінічні групи	Показники фібринолітичної активності, мкг азофібрину/мл за 1 год		
	Сумарна фібринолітична активність	Неферментативна фібринолітична активність	Ферментативна фібринолітична активність
1-ша група	$0,91 \pm 0,06$	$0,42 \pm 0,03$	$0,49 \pm 0,03$
2-га група	$0,86 \pm 0,04$	$0,40 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,02$
p	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$

Примітка: p – вірогідність різниці.

білкових сполук. Водночас, у цих пацієнтів спостерігалося деяке підвищення сумарної фібринолітичної активності КВП, що зумовлена фібринолітичними компонентами лейкоцитів, тромбоцитів, еритроцитів, що, напевно, відображало тривале пошкодження клітин бронхолегеневої системи з подальшим вивільненням активаторів фібринолізу та порушенням функцій ендотелію (табл. 3).

Слід відмітити, що тенденція до посилення окисної модифікації білків у дітей, хворих на БА, за відсутності делеційного поліморфізму вивчених генів системи біотрансформації ксенобіотиків відбувалася на тлі зниження активності каталази порівняно з пацієнтами, що мали генотип GSTT1+M1-, GSTT1-M1+ або GSTT1-M1-. Так, у пацієнтів 1-ї групи активність каталази в КВП становила в середньому  $42,45 \pm 9,56$  мкмоль/хв·мг білка, натомість, у хворих 2-ї групи –  $53,85 \pm 14,82$  мкмоль/хв·мг білка ( $p > 0,05$ ). Але, не дивлячись на виявлені тенденції у середніх показниках активності каталази, якісний аналіз розподілу результатів показав, що рівень активності даного ключового ферменту антиоксидантної системи, що не перевищував 50,0 мкмоль/хв·мг білка, у 2,4 рази підвищував вірогідність наявності делеційного поліморфізму генів детоксикації. У цілому, показники клінічно-епідеміологічного ризику даної події становили: СШ – 2,4 (95% ДІ: 0,58–9,93), ВР – 1,54 (95% ДІ: 1,12–2,1), АР – 22%. Чутливість даного тесту становила 85,7% (95% ДІ: 67,33–95,97), СТ – 28,57% (95% ДІ: 11,28–52,18), ПЦПР – 61,54% (95% ДІ: 44,62–76,64), ПЦНР – 60,0% (95% ДІ: 26,24–87,84), ПВ – 54,55%, ВП – 1,2.

Таким чином, у дітей із делеційним поліморфізмом генів GSTT1 та GSTM1 порівняно з пацієнтами без такого під час загострення БА у КВП накопичуються продукти запального процесу, зумовлені підвищенням активності процесів окисного стресу з накопиченням продуктів окислювальної модифікації білків на тлі виснаження процесів антиоксидантного захисту і зниженої активності каталази, що, на нашу думку, відображає порушення процесів детоксикації алергенів в організмі таких хворих.

## Висновки

У дітей із делеційним поліморфізмом генів GSTT1 та GSTM1 порівняно з пацієнтами без поліморфізму вказаних генів відмічаються інтенсивніші процеси окислювальної модифікації протеїнів на тлі пригнічення активності каталази, що свідчить про необхідність призначення агресивнішої базисної протизапальної терапії таким пацієнтам.

## Література

1. Components of airway hyperresponsiveness and their associations with inflammation and remodeling in mice / D.S. Southam, R. Ellis, J. Wattie [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 119. – P. 848–854.
2. Evaluation of genetic susceptibility to childhood allergy and asthma in an African American urban population / B.R. Joubert, D.M. Reif, S.W. Edwards [et al.] // *BMC. Med. Genet.* – 2011. – Vol. 12. – P. 25.
3. Glutaredoxin 1 regulates cigarette smoke-mediated lung inflammation through differential modulation of I $\kappa$ B kinases in mice: impact on histone acetylation / S. Chung, I.K. Sundar, H. Yao [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2010. – Vol. 299. – P. 192–203.
4. Glutathione S-transferase polymorphisms, asthma susceptibility and confounding variables: a meta-analysis / S. Piacentini, R. Polimanti, I. Simonelli [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* – 2013. – Vol. 40 (4). – P. 3299–3313.
5. GSTM1, GSTP1 and NQO1 polymorphisms and susceptibility to atopy and airway hyperresponsiveness among South African schoolchildren / P. Reddy, R.N. Naidoo, T.G. Robins [et al.] // *Lung.* – 2010. – Vol. 188 (5). – P. 409–414.
6. Kabisch M. Epigenetic mechanisms and the relationship to childhood asthma / M. Kabisch, S. Michel, J. Tost // *Eur. Respir. J.* – 2010. – Vol. 36. – P. 950–961.
7. Lung function and inflammatory responses in healthy young adults exposed to 0.06 ppm ozone for 6.6 hours / C.S. Kim, N.E. Alexis, A.G. Rappold [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 183. – P. 1215–1221.
8. McIlwain C.C. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy / C.C. McIlwain, D.M. Townsend, K.D. Tew // *Oncogene.* – 2006. – Vol. 25. – P. 1639–1648.
9. 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.
10. Saadat M. Genetic polymorphism of glutathione-S-transferase T1, M1 and asthma, a meta-analysis of the literature / M. Saadat, M. Ansari-Lari // *Pakistan Journal of Biological Sciences.* – 2007. – Vol. 10, N. 23. – P. 4183–4189.
11. Sandford A.J. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease / A.J. Sandford, P.D. Pare // *Clin. Chest. Med.* – 2000. – Vol. 21. – P. 633–643.
12. 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.