

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. 6, No. 4, pp. 200-204, 2014

DOI: 10.13187/ejm.2014.6.200

www.ejournal5.com

UDC 616.23-008.42: 616.248-053.2:575.224.2

Bronchial Hyperresistivity Among Children with Neosinophilous Bronchial Asthma and Deletion Polymorphism of Genes *GSTT1* and *GSTM1*

Oksana Y. Feshchuk

Bukovinian State Medical University, Ukraine
58013 Chernivtsi Theatrical area, 2
E-mail: lotockja@rambler.ru

Abstract

The article features the research on bronchial hyperresistivity towards direct and indirect bronchospasmodic stimulus among school children with eosinophilous bronchial asthma and deletion polymorphism of genes *GSTT1* and *GSTM1*. Significant risk of further development of children bronchial hyperresistivity is identified. Genotypes: *T1+M1del*; *T1delM1+*; *T1delM1del*. (OP-6,1 95 %ДИ:2,7-13,7, OИИ-4,2, 95 % ДИ:3,3-5,3, AP-0,29)

Keywords: bronchial hyperresistivity; bronchial asthma; polymorphism of genes *GSTT1* and *GSTM1*.

Введение

Гипервосприимчивость бронхов (ГВБ) у больных бронхиальной астмой (БА) считается характерной особенностью заболевания, определяющей его тяжесть и частоту обострений [1, 2]. Основными критериями, определяющими ГВБ являются гиперчувствительность и гиперреактивность бронхов. Чувствительность бронхов отображает пороговую дозу вещества, которая снижает базальную бронхиальную проходимость на 20%, то есть силу триггерного фактора бронхоконстрикции. Реактивность указывает на особенность «органмишени» и характеризуется крутизной «доза-эффект» при увеличении дозы ингалированного вещества [3]. Предполагается, что в основе этого феномена лежит хроническое воспаление дыхательных путей, которое часто носит неэозинофильный характер [4, 5], а также повреждение бронхолегочной системы ксенобиотиками, что приводит к длительному бронхоспазму [6, 7]. Особую актуальность представляет исследование системы генов метаболизма ксенобиотиков, поскольку их ферментами осуществляется биотрансформация как экзо – так и эндогенных токсических соединений. Генетический полиморфизм генов 2 фазы детоксикации ксенобиотиков *GSTT1* и *GSTM1* лежит в основе межиндивидуальной вариабельности в метаболизме чужеродных агентов и дисбаланса процессов детоксикации последних, которые могут проявиться как факторы предрасположенности к заболеванию так и факторы, модифицирующие его клинический фенотип. [8,9].

Исследование взаимосвязи полиморфизма генов детоксикации ксенобиотиков *GSTT1* и *GSTM1* с характером реакции бронхов недостаточно изучено, а вопрос о взаимоотношении ГВБ у детей с неэозинофильной БА и полиморфизма указанных генов остается открытым [10,11].

Цель исследования

Изучить гипервосприимчивость бронхов к прямым и непрямым бронхоконстрикторным стимулам у детей с неэозинофильной бронхиальной астмой при делеционном полиморфизме генов *GSTT1* и *GSTM1*.

Материал и методы исследования

С целью выявления гипервосприимчивости бронхов в пульмоаллергологическом отделении Оласной детской клинической больницы г. Черновцы обследовано 33 пациента школьного возраста, страдающих неэозинофильной БА. Неэозинофильный тип воспаления дыхательных путей диагностировали при относительном содержании в цитограмме клеточного осадка индуцированной мокроты менее 3% эозинофилов или при их отсутствии [12]. Всем детям в постприступном периоде проводили бронхопровокационные тесты с гистамином (прямой тест) и дозированной физической нагрузкой (бег) – непрямым тест. [13,14]. При повышении гиперчувствительности бронхов к гистамину отмечалось снижение провокационной концентрации гистамина (ПК20Г, мг/мл), а при повышении их гиперреактивности – увеличение показателей дозозависимой кривой (ДЗК, у.е.). Реакция бронхов на дозированную физическую нагрузку определялась индексом бронхоспазма (ИБС, %), который наряду с реакцией на ингаляцию сальбутамола (индекс бронходилатации – ИБД,%) характеризовал общую лабильность бронхов, обозначаемую как показатель лабильности бронхов (ПЛБ,%). Сформировано 2 клинические группы наблюдения. Первую составили 14 школьников, у которых ферментная активность *GSTM1* и *GSTT1* сохранена, поскольку у них наблюдалось как минимум по одной копии неповрежденных аллелей соответствующих генов (генотип $M1+ T1+$). Вторую - сформировали 19 детей, у которых отсутствует активность одной или одновременно обеих исследуемых изоформ *GSTM1* или *GSTT1* (генотипы $MidelT1+$, $M1+Tidel$ и $MidelTidel$). По основным клиническим признакам группы сравнения были сопоставимы.

Всем детям проведено генотипирование *GSTM1* и *GSTT1*. Общую геномную ДНК выделяли из крови согласно стандартного протокола с использованием протеиназ К и додецилсульфата натрия в качестве детергента. Выявление полиморфизма *GSTT1* и *GSTM1* осуществляли методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и анализировали методом электрофореза в 2 % агарозном геле [15]. Делецию генов *GSTT1* и *GSTM1* обозначали как *Tidel* и *Midel*. Гомо – или гетерозиготность по нормальной копии гена - $T1+$ и $M1+$. Ожидаемую длину фрагментов ДНК (431 нп для *GSTT1* и 120 нп для *GSTM1*) рассчитывали с помощью пакета программ компьютерной обработки данных DNASTAR с использованием последовательностей генов *GSTM1* и *GSTT1*, имеющиеся в базе данных Genbank. Гомозиготные формы с делецией обеих копий генов *GSTM1* и *GSTT1* идентифицировали при отсутствии соответствующего фрагмента на электрофореграмме. Такие генотипы обозначали как *Midel* и *Tidel*. Соответственно, наличие этих фрагментов на электрофореграммах свидетельствовало о гомо- или гетерозиготности по нормальной копии гена. Генотип таких пациентов обозначали как $M1+$ и $T1+$.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ “Statistika 7.0”.

Для определения диагностической ценности спирографических тестов использовали показатель чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной предсказуемой ценности с определением их 95 % доверительных интервалов (ДИ). Оценка риска реализации события проводилась с учетом вероятности величин относительного, атрибутивного рисков и соотношения шансов, а также определения их доверительных интервалов.

Результаты исследования и их обсуждение

В таблице приведены показатели неспецифической бронхиальной гипервосприимчивости у школьников с неэозинофильной бронхиальной астмой с учетом наличия делеционного полиморфизма *GSTM1* и *GSTT1* (табл.).

Таблица 1

**Показатели гипервосприимчивости бронхов у детей с бронхиальной астмой
в зависимости от генотипов *GSTM1* и *GSTT1***

Генотип <i>GSTM1</i> и <i>GSTT1</i>	Количество пациентов	Показатели лабильности бронхов			Показатели гипервосприимчивост и бронхов	
		ИБС, %	ИБД, %	ПЛБ, %	ПК20Г, мг/мл	ДЗК, у.е
<i>M1+T1+</i>	14	8,2	8,5	16,8	2,3	1,6
<i>M1+T1del;</i> <i>M1delT1+;</i> <i>M1delT1del</i>	19	18,8	10,6	29,4	1,0	1,7
Pt		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Несмотря на то, что по результатам бронхопровокационной пробы с гистамином (ПК20Г) достоверных отличий по средним показателям не наблюдалось, выраженная ГЧБ к гистамину (ПК20Г<0,3 мг/мл) определялась в 30,7 % случаев у детей с делецией *GSTM1* и/или *GSTT1*, а при ее отсутствии – в 12,5 % наблюдений (Рф <0, 05). У этих детей также чаще определялись выраженные показатели бронхиальной гиперреактивности и лабильности. Так, ИБС более 17% при генотипе *M1+T1+* выявляли у 9 % пациентов, а в группе сравнения – в 38 % случаев (Рф = 0,03). ПЛБ более 23 % у больных с делецией в исследуемых генах выявлялся в 61,1 % случаев, а при отсутствии полиморфизма этих генов – в 18,1 % наблюдений (Рф = 0,01). Доказано, что при наличии делеции, в генах *GSTT1*, *GSTM1* больных с неэозинофильной БА относительный риск (ОР) развития выраженного бронхоспазма физического напряжения (ИБС>17 %) составил 6,1 (95 % ДИ 2,7-13,7), при отношении шансов (ОШ) 4,2 (95 % ДИ 3,3-5,3) и атрибутивном риске (АР) – 0,29. Диагностическая ценность этого теста, как косвенного показателя бронхоспазма, характеризовалась достаточно высокой чувствительностью теста (ЧТ) – 80 % (95 % ДИ 66-90), и умеренной его специфичностью (СТ) – 59 % (95 % ДИ 51-67). Наличие у ребенка делеционного полиморфизма генов *GSTT1*, *GSTM1* предрасполагает к развитию более выраженной ГВБ с посттестовой вероятностью 16,6%, а отсутствие его снижает посттестовую вероятность на 26 %. Следует отметить, что усиление ГВБ происходит за счет их гиперчувствительности (ПК20Г), а не гиперреактивности (ДЗК), что, возможно, связано с ремоделированием бронхиальной стенки вследствие воспалительного процесса или другими механизмами развития бронхоспазма. Эти данные дают основание считать, что повышение ГЧБ у школьников, страдающих БА связано с изменением скорости метаболизма ксенобиотиков и накоплением продуктов их детоксикации в слизистой оболочке бронхов, с последующим развитием в них неэозинофильного воспаления.

Таким образом, установлено, что при наличии делеционного полиморфизма генов *GSTM1* и *GSTT1* у больных с неэозинофильной БА отмечен риск более выраженной неспецифической ГВБ к прямым и непрямым бронхоспазмизирующим стимулам, что, видимо, следует учитывать при разработке индивидуализированных подходов к лечению данного заболевания

Выводы

1. Относительный риск развития выраженного бронхоспазма физического напряжения (ИБС>17 %) при наличии делеции в генах *GSTT1*, *GSTM1* больных с неэозинофильной бронхиальной астмой составил 6,1 (95 % ДИ 2,7-13,7), при отношении шансов (ОШ) 4,2 (95 % ДИ 3,3-5,3) и атрибутивном риске (АР) - 0,29.

2. Наличие у ребенка делеционного полиморфизма генов *GSTT1*, *GSTM1* у детей с эозинофильной бронхиальной астмой предрасполагает к развитию более выраженной гипервосприимчивости бронхов с посттестовой вероятностью 16,6 %, а отсутствие его снижает посттестовую вероятность этого показателя на 26 %.

3. Реактивность бронхов у школьников с неэозинофильным фенотипом бронхиальной астмы существенно не зависит от наличия делеционного полиморфизма генов 2 фазы детоксикации ксенобиотиков.

Примечания:

1. Brannan J. Airway hyperresponsiveness in Asthma: Its Measurement and Clinical Significance / J. Brannan // CHEST. 2010. Vol. 138. P. 11-17.
2. Рекомендации Глобальной инициативы по борьбе с бронхиальной астмой (Global Initiative for Asthma, GINA), пересмотр 2009 г. / Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. 2010. № 5-6 (34-35). С. 56-63.
3. Сажин С.І. Діагностична цінність показників неспецифічної гіперсприйнятливості дихальних шляхів у дітей, хворих на бронхіальну астму / С.І.Сажин // Клінічна та експериментальна патологія. 2010. Том 9, №1 (31). С. 65-68.
4. Pavord I.D. Asthma phenotypes / I.D. Pavord // J Semin Respir Crit Care Med. 2012. Vol. 33(6). P. 645-52.
5. Горячкина Л.А. Основные маркеры нейтрофильного воспаления при бронхиальной астме тяжелого течения / Л.А.Горячкина, Д.В.Битеева, Д.С. Фомина // Российский Аллергологический Журнал. 2012. №1. С. 21-28.
6. Islam T. Glutathione-S-transferase (GST) P1, GSTM1, exercise, ozone and asthma incidence in school children / T. Islam, K. Berhane, R. Mc Connel et al. // Thorax. 2009. Vol. 64 (3). P. 197-202.
7. 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. Vol. 4, №10. P.183-189.
8. El Rifai N. Glutathione S transferase theta1 and mu1 gene polymorphisms and phenotypic expression of asthma in Egyptian children:a case- control study / N. El Rifai, N. Moustafa, N. Degheidy et al. // Italian Journal of Pediatrics. 2014. 40:22
9. Lima C. S. P. Glutathione S- transferase mu1(GSTM1) and theta1 (GSTT1) genetic polymorphisms and atopic asthma in children from Southeastern Brazil / C . S. P Lima, I. A. Neri, G. J. Lourenco at al. // Genetics and Molecular Biology. 2010. Vol.33, №3. P. 438-441.
10. Мазурина С.А. Роль полиморфизма генов-кандидатов в развитии атопической бронхиальной астмы / С.А. Мазурина, В.А. Казначеев // Российский аллергологический журнал. 2011. № 3. С. 14-22.
11. Kudo M. Pathology of asthma / Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. // J Front Microbiol. 2013. Vol. 10. P. 254-263.
12. Ортеменка Є. П. Особливості характеру запальної відповіді дихальних шляхів у школярів, хворих на атопічну та неатопічну бронхіальну астму / Є. П. Ортеменка // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії. 2013. Том 13, № 3 (43). С. 212-216.
13. Juniper E.F. Histamine and Methacholine inalation tests / E.F. Juniper, D.W. Cockcroft, F.E. Hargrave. Lund, Sweden, 1994. 51 p.
14. Новик Г.А. Спирометрия и пикфлоуметрия при бронхиальной астме у детей (практика оценки и мониторинга): уч. Пособие [под ред. проф. И.М. Воронцова] / Г.А. Новик, А.В. Боричев. СПб.: ГПИМА, 2007. 68 с.
15. Выделение ДНК из крови. // Практическая молекулярная биология. <http://molbiol.edu.ru>

References:

1. Brannan J. Airway hyperresponsiveness in Asthma: Its Measurement and Clinical Significance / J. Brannan // CHEST. 2010. Vol. 138. P. 11-17.
2. Rekomendacii Global'noj iniciativy po bor'be s bronhial'noj astmoj (Global Initiative for Asthma, GINA), peresmotr 2009 g. / Klinichna imunologija. Alergologija. Infektologija. 2010. № 5-6 (34-35). S. 56-63.
3. Sazhin S.I. Diagnostichna cinnist' pokaznikov nespecifichnoї giperspriynjatlivosti dihal'nih shljahiv u ditej, hvorih na bronhial'nu astmu / S.I.Sazhin // Klinichna ta eksperimental'na patologija. 2010. Tom 9, №1 (31). S. 65-68.

4. Pavord I.D. Asthma phenotypes / I.D. Pavord // J Semin Respir Crit Care Med. 2012. Vol. 33(6). P. 645-52.
5. Gorjachkina L.A. Osnovnye markery nejtrofil'nogo vospaleniya pri bronhial'noj astme tjazhelogo techeniya / L.A.Gorjachkina, D.V.Biteeva, D.S. Fomina // Rossijskij Allergologicheskij Zhurnal. 2012. №1. S. 21-28.
6. Islam T. Glutathione-S-transferase (GST) P1, GSTM1, exercise, ozone and asthma incidence in school children / T. Islam, K. Berhane, R. Mc Connel et al. // Thorax. 2009. Vol. 64 (3). R. 197-202.
7. 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. Vol. 4, №10. P.183-189.
8. El Rifai N. Glutathione S transferase theta1 and mu1 gene polymorphisms and phenotypic expression of asthma in Egyptian children:a case- control study / N. El Rifai, N. Moustafa, N. Degheidy et al. // Italian Journal of Pediatrics. 2014. 40:22
9. Lima C. S. P. Glutathione S- transferase mu1 (GSTM1) and theta1 (GSTT1) genetic polymorphisms and atopic asthma in children from Southeastern Brazil / C. S. P Lima, I. A. Neri, G. J. Lourenco at al. // Genetics and Molecular Biology. 2010. Vol.33, №3. P. 438-441.
10. Mazurina S.A. Rol' polimorfizma genov-kandidatov v razvitii atopicheskoy bronhial'noj astmy / S.A. Mazurina, V.A. Kaznacheev // Rossijskij allergologicheskij zhurnal. 2011. № 3. S. 14-22.
11. Kudo M. Pathology of asthma / Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. // J Front Microbiol. 2013. Vol. 10. P. 254-263.
12. Ortemenka E. P. Osoblivosti harakteru zapal'noi vidpovidi dihal'nih shljahiv u shkoljariv, hvorih na atopichnu ta neatopichnu bronhial'nu astmu / E. P. Ortemenka // Aktual'ni problemi suchasnoi medicini: Visnik ukrains'koï medichnoi stomatologichnoi akademii. 2013. Tom 13, № 3 (43). S. 212-216.
13. Juniper E.F. Histamine and Methacholine inhalation tests / E.F. Juniper, D.W. Cockcroft, F.E. Hargrave. Lund, Sweden, 1994. 51 p.
14. Novik G.A. Spirometrija i pikfluometrija pri bronhial'noj astme u detej (praktika ocenki i monitoringa): uch. Posobie [pod red. prof. I.M. Voroncova] / G.A. Novik, A.V. Borichev. SPb.: GPMA, 2007. 68s.
15. Vydelenie DNK iz krovi. // Prakticheskaja molekularnaja biologija. <http://molbiol.edu.ru>

УДК 616.23-008.42: 616.248-053.2:575.224.2

Гипервосприимчивость бронхов у детей с неэозинофильной бронхиальной астмой при делеционном полиморфизме генов *GSTT1* и *GSTM1*

Оксана Евгениевна Фещук

Буковинский государственный медицинский университет, Украина
58013 г. Черновцы ул. Театральная, 2
E-mail: lotockja@rambler.ru

Аннотация. В работе исследовано гипервосприимчивость бронхов к прямым и непрямым бронхоспазмизирующим стимулам у школьников с неэозинофильной бронхиальной астмой при делеционном полиморфизме генов *GSTT1* и *GSTM1*. Установлен существенный риск развития выраженной гипервосприимчивости бронхов у детей при генотипах *T1+M1del*; *T1delM1+*; *T1delM1del*. (ОР-6,1 95 % ДИ:2,7-13,7,ОШ-4,2, 95 % ДИ:3,3-5,3, АР-0,29).

Ключевые слова: гипервосприимчивость бронхов; бронхиальная астма; полиморфизм генов *GSTT1* и *GSTM1*.