

Abstract

Koloskova O.K., Bilous T.M.*
Bukovinian State Medical University of Ukrainian Ministry of Health, 207 a, Ruska st. Chernivtsy, 58023, Ukraine

THE DELETION POLYMORPHISM OF THE GENES GSTM1 AND GSTT1 UNDER EOSINOPHILIC AND NEUTROPHILIC PHENOTYPES OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN

Purpose. To study the deletion polymorphism of the genes of glutathione-S-transferase (*GSTM1* and *GSTT1*) in children with bronchial asthma (BA) under eosinophilic and neutrophilic types of airway inflammation.

Materials and Methods. It has been performed complex examination of 79 school-aged children with bronchial asthma, of whom in 46 patients (I-st clinical group) the eosinophilic type of bronchial inflammation was verified, but in 33 patients (II-nd clinical group) the neutrophilic airway inflammation was recognized. Determination of deletions in the genes *GSTM1* and *GSTT1* was provided by multiplex polymerase chain reaction using appropriate specific primers.

Results. In patients with the genotypes T_1+M_1del the severe course of BA more often occurred in children with the eosinophilic asthma phenotype than in neutrophilic asthma (61.5% vs. 42.9%). At that in children with the T_1+M_1del genotypes such clinical signs as more expressive bronchial lability and associated allergic rhinitis were more common for neutrophilic asthma phenotype (33,0% and 71,4% correspondingly) as compared with patients with eosinophilic asthma (13,8%; $P<0,05$ and 15,4%; $P<0,05$ correspondingly). In children with combination of the genotypes T_1delM_1+ and eosinophilic asthma phenotype the higher content of nitrogen monoxide metabolites in exhaled breath condensate (63,1 mmol/ml versus 44,4 mmol/ml; $P<0,05$) as well as the increase in the concentration of serum total IgE (905,8 IU/ml versus 578,6 IU/ml; $P<0,05$) have been determined in comparison with cases of neutrophilic asthma with the same deletion polymorphism of *GSTM1*. A verification of the genotype T_1delM_1+ in asthmatic patients with neutrophilic airway inflammation was associated with a severe course of the disease (50,0% vs. 37,5%; $P<0,05$) and concomitant allergic rhinitis (75,0% vs. 12,5%; $P<0,05$) as compared with patients with combination of both eosinophilic asthma phenotype and the genotype T_1delM_1+ .

Conclusions. Thus, in children with eosinophilic and neutrophilic asthma phenotypes in the presence of deletion polymorphism of *GSTM1* and *GSTT1* genes the certain clinical and laboratory features of the disease have been determined.

Keywords: bronchial asthma, children, glutathione-S-transferase.

Corresponding author: *tanja.vorotnjak@gmail.com

Резюме**Колоскова О.К.,
Білоус Т.М.***Буковинський державний медичний університет МОЗ України,
вул. Руська, 207 а, м. Чернівці,
58023, Україна***ДЕЛЕЦІЙНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ GSTM1, GSTT1 ПРИ
ЕОЗИНОФІЛЬНОМУ І НЕЙТРОФІЛЬНОМУ ФЕНОТИПАХ
БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДІТЕЙ**

Обстежено 79 дітей шкільного віку, що хворіють на БА, з них у 46 хворих встановлено еозинофільний характер запалення бронхів, у 33 пацієнтів – нейтрофільний. Встановлено, що у хворих із комбінацією генотипів *T1+M1del* при еозинофільному фенотипі астми частіше траплялася її тяжка форма, а при нейтрофільному фенотипі – алергічний риніт і виразніша лабільність бронхів. У дітей з комбінацією генотипів *T1delM1+* та еозинофільним фенотипом астми визначалося підвищення вмісту метаболітів монооксиду нітрогену у конденсаті видихуваного повітря, вмісту загального IgE у сироватці крові. При нейтрофільному запаленні бронхів генотип *T1delM1+* асоціював із тяжким перебігом захворювання та супутнім алергічним ринітом.

Ключові слова: бронхіальна астма, діти, глутатіон-S-трансфераза.

Резюме**Колоскова Е.К., Белоус Т.М.****Буковинский государственный медицинский университет МЗ Украины,
ул. Русская, 207 а, г. Черновцы,
58023, Украина***ДЕЛЕЦИОННЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ GSTM1, GSTT1
ПРИ ЭОЗИНОФИЛЬНОМ И НЕЙТРОФИЛЬНОМ ФЕНОТИПАХ
БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ**

Цель исследования: оценить делеционный полиморфизм генов *GSTM1*, *GSTT1* у детей с эозинофильным и нейтрофильным фенотипами бронхиальной астмы (БА).

Материал и методы. Обследовано 79 детей с БА, из которых у 46 пациентов (I клиническая группа) установлено эозинофильный характер воспаления бронхов, а у 33 – нейтрофильный (II клиническая группа). Генотипирование *GSTM1*, *GSTT1* проводили с помощью полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров.

Результаты исследования. У пациентов с комбинацией генотипа *T1+M1del* при эозинофильном фенотипе БА по сравнению с нейтрофильным чаще наблюдалось тяжелое течение заболевания (61,5% проти 42,9%), однако реже - аллергический ринит (15,4% против 71,4%) и выраженная лабильность бронхов (13,8% против 33,0%). У детей с комбинацией генотипа *T1delM1+* и эозинофильным фенотипом БА по сравнению с нейтрофильным характером воспаления бронхов определялось более высокое содержание метаболитов монооксида азота в конденсате выдыхаемого воздуха (63,1 мкмоль/мл против 44,4 мкмоль/мл), общего IgE в сыворотке крови (905,8 МО/мл против 578,6 МО/мл), но реже – тяжелое течение заболевания (37,5% против 50,0%) и сопутствующий аллергический ринит (12,5% против 75,0%).

Выводы. У детей с эозинофильным и нейтрофильным фенотипами бронхиальной астмы при наличии делеционного полиморфизма генов *GSTM1* и *GSTT1* наблюдаются некоторые клинически-лабораторные особенности течения заболевания, что следует учитывать при выборе тактики базисного лечения этих пациентов.

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

Автор, відповідальний за листування: * tanja.vorotnjak@gmail.com



Вступ

Залежно від гетерогенності запалення бронхів на даний час вирізняють еозинофільний та нейтрофільний фенотипи бронхіальної астми (БА), які багато в чому визначають ефективність контролюючого лікування даного захворювання [4, 5]. Розглядаючи БА як багатофакторне захворювання, що визначається спадковими чинниками та патогенними стимулами зовнішнього середовища, дослідниками обговорюється припущення, що характер запалення бронхів залежить від поліморфізму генів *GSTM1*, *GSTT1*, які відіграють важливу роль в антиоксидантному захисті дихальних шляхів [6]. Виходячи з цього, дослідження поліморфізму вказаних генів, які відповідають за синтез ферментів системи детоксикації ксенобіотиків, є актуальним [3, 7], проте не вирішеним питанням.

Мета дослідження: оцінити делеційний поліморфізм генів *GSTM1*, *GSTT1* у дітей, хворих на бронхіальну астму, з еозинофільним та нейтрофільним характером запалення дихальних шляхів.

Матеріали і методи дослідження. Обстежено 79 дітей шкільного віку, що хворіють на БА, з них у 46 хворих (I клінічна група) встановлено еозинофільний характер запалення бронхів, а у 33 пацієнтів – нейтрофільний (II клінічна група). Характер запалення бронхів визначали на підставі цитологічного аналізу індукованого мокротиння, одержаного шляхом інгаляції гіпертонічних (3%, 5%, 7%) розчинів натрію хлориду: за наявності у мокротинні 3% і більше еозинофільних лейкоцитів робили висновок про еозинофільний характер запальних змін дихальних шляхів, а за меншого вмісту даних гранулоцитів – про нейтрофільний варіант [1]. За основними клінічними характеристиками групи були зіставлені. Так, у I групі хлопчиків було 65,3%, а середній вік пацієнтів становив 11,2 року. У II клінічній групі частка хлопчиків становила 56,7%, а середній вік представників даної групи сягав 13,1 року ($P>0,05$). За ступенем тяжкості захворювання у I групі тяжка форма траплялася у 27 пацієнтів (58,7%), середньо тяжка – у 15 дітей (32,6%) та легка – у 4 школярів (8,7%). У представників II групи тяжка астма траплялася у 15 хворих (45,4%, $P>0,05$), середньотяжка – у 14 дітей (42,4%, $P>0,05$), а легка – у 4 школярів (12,2%, $P>0,05$). Встановлено, що початок захворювання у віці до 3 років мав місце у I та II групах у 47,8% випадків.

Усім дітям у позанападному періоді прове-

дене комплексне обстеження з урахуванням вмісту метаболітів монооксиду нітрогену в конденсаті повітря, що видихається (КПВ) за методикою Ємченко Н.Л. (1994), визначенням індексу лабільності бронхів та її компонентів – індексу бронхоспазму у пробі з дозованим фізичним навантаженням (6-хвилинний біг) й індексу бронходилатції при вдихуванні салбутамолу [2].

Генетичні дослідження проводилися на кафедрі молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету ім. Ю.Федьковича (зав. – д.біол.н., проф. Волков Р.А.). Загальну геномну ДНК виділяли з крові, генотипування *GSTM1*, *GSTT1* здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), аналіз результатів якої здійснювали методом електрофорезу в 2% агарозному гелі. Виявлення делецій у даних генах здійснювали методом мультиплексної ПЛР із використанням відповідних специфічних праймерів. В якості позитивного контролю використовували ампліфікацію фрагменту гену *BRCA1*. Гомозиготні форми із делецією обох копій генів *GSTM1* та *GSTT1* позначали як *M1del* та *T1del*. Відповідно наявність даних фрагментів на електрофореграмах свідчила про гомо- або гетерозиготність за нормальними копіями генів та позначалась як *M1+* та *T1+*.

Отримані результати аналізували методами біостатистики. Вірність нульової гіпотези визначалась з урахуванням рівня значимості P_t (за Ст'юдентом) і P_f (метод кутового перетворення Фішера). Дослідження проведено з урахуванням основних положень GCP IH та Хельсінської декларації щодо біомедичних досліджень.

Результати дослідження та їх обговорення. Відмічено, що делеції у структурі гену *GSTT1* з однаковою частотою траплялася у дітей груп порівняння. Так, у представників I клінічної групи делеція в даному гені відмічена у 21,7%, а у II групі – у 21,2%. Гомозиготна делеція *GSTM1* частіше траплялася у дітей із нейтрофільним характером запалення бронхів (51,5%) проти 32,6% у I клінічній групі ($P<0,05$). Попри відсутність відмінностей за показниками делеційного поліморфізму гену *GSTT1* у групах порівняння у дітей із нейтрофільним характером запалення бронхів визначався виразніший бронхоспазм фізичної напруги. Так, індекс бронхоспазму у даних хворих становив 16,2% проти 7,5% у хворих на еозинофільний фенотип БА.

Тяжка БА у хворих із генотипом *GSTM1del*



визначалася частіше за еозинофільного фенотипу захворювання (66,7%) проти 47,0% у II групі ($P < 0,05$). Слід відмітити, що за даного генотипу у дітей груп порівняння відмічена дискордантність частоти виявлення тяжкої БА і показників запалення / гіперреактивності бронхів. Так, середній вміст метаболітів монооксиду нітрогену в конденсаті повітря, що видихається, у дітей I групи сягав 39,3 мкмоль/мл, а чутливість брон-

хів до гістаміну – 2,03 мг/мл. У дітей із нейтрофільним характером запалення дані показники сягали відповідно 48,5 мкмоль/мл та 0,7 мг/мл ($P < 0,05$).

Для оцінки впливу комбінацій виявленого делеційного поліморфізму генів на основні показники БА вивчена їх частота у групах порівняння (табл.).

Таблиця

Частота комбінацій поліморфізму генів <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> у дітей груп порівняння									
Клінічні групи	Кількість хворих	Розподіл генотипів <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i>							
		<i>T1+M1+</i>		<i>T1delM1+</i>		<i>T1+M1del</i>		<i>T1delM1del</i>	
		A	B	A	B	A	B	A	B
I група	46	23	50,0	8	17,4	13	28,3	2	4,3
II група	33	12	36,4	4	12,1	14	42,4	3	9,0
P		>0,05							

Примітка: A – абсолютна кількість; B – відносна кількість (%)

Відмічено, що за наявності у хворих генотипу *T1+M1del* при еозинофільному характері запалення бронхів частіше відмічався тяжкий перебіг БА. Так, у хворих із вказаним генотипом тяжка форма БА асоціювала з еозинофільним характером запалення бронхів у 61,5% випадків, а з нейтрофільним – лише у 42,9% спостережень. На противагу цьому, супутній алергічний риніт у дітей із еозинофільним характером запалення відмічено рідше (15,4%), ніж у хворих із нейтрофільним фенотипом захворювання (71,4%, $P < 0,05$). При даному генотипі у дітей із нейтрофільним характером запалення бронхів траплялася виразніша бронхомоторна реакція на інгаляцію сальбутамолу. Так, індекс бронходиляції у цих хворих становив у середньому 33,0%, а у I клінічній групі – 13,8% ($P < 0,05$).

У дітей із генотипом *T1delM1+* тяжкий перебіг БА у I клінічній групі визначався у 37,5% випадків, а у II групі – у 50,0% спостережень. У хворих за наведеного вище генотипу та нейтрофільного характеру запалення дихальних шляхів частіше визначали супутній алергічний риніт, ознаки якого мали місце у 75,0% та лише у

12,5% за еозинофільного запалення бронхів ($P < 0,05$).

Водночас варто відзначити, що такі показники патологічного процесу при БА, як уміст у крові загального IgE, метаболітів монооксиду нітрогену в КПВ і лабільність бронхів за даного генотипу були виразнішими у хворих I клінічної групи. Так, у таких дітей наведені маркери захворювання відповідно становили 905,8 МО/мл, 63,1 мкмоль/мл та 26,8%. У дітей із нейтрофільним запаленням бронхів наведені вище сурогатні показники становили 578,6 МО/мл, 44,4 мкмоль/мл та 19,2% ($P < 0,05$).

Таким чином, у хворих на БА дітей із ознаками еозинофільного і нейтрофільного запалення бронхів наявність делеційного поліморфізму генів *GSTT1* та *GSTM1* асоціює з тяжкістю захворювання, а також такими додатковими критеріями патологічного процесу як неспецифічна гіперреактивність бронхів та вміст монооксиду нітрогену у КВП в якості маркеру запалення дихальних шляхів, а також ознаками атопічної реактивності організму.

видихуваного повітря визначався вищий вміст метаболітів монооксиду нітрогену (63,1 мкмоль/мл проти 44,4 мкмоль/мл), а в сироватці крові – підвищення вмісту загального IgE (905,8 МО/мл проти 578,6 МО/мл) на фоні високої лабільності бронхів (26,8% проти 19,2%). При нейтрофільному характері запалення бронхів даний генотип асоціював із тяжким перебігом

Висновки

1. У хворих із комбінацією генотипів *T1+M1del* при еозинофільному фенотипі БА частіше траплялася її тяжка форма (61,5% проти 42,9%), а при нейтрофільному фенотипі – алергічний риніт (71,4% проти 15,4%) та виразніша бронхомоторна проба (33,0% проти 13,8%).

У дітей із комбінацією генотипів *T1delM1+* та еозинофільним фенотипом БА у конденсаті



захворювання (50,0% проти 37,5%) та супутнім

алергічним ринітом (75,0% проти 12,5%).

Перспективи подальших досліджень

У даному напрямку полягають у вивченні клінічно-анамнестичних, біохімічних та спірографічних маркерів як показників контролю

бронхіальної астми у дітей шкільного віку з делеційним поліморфізмом генів GSTT1 та GSTM1.

References (список літератури)

1. Bezrukov L.O. porivnialnyi analiz tsytolohichnoho skladu mokrotynnia shkoliariv, khvorykh na bronkhialnu astmu pry eozynofilnomu ta neutrofilnomu kharakteri zapalennia dykhalnykh shliakhiv / L.O. Bezrukov, O.K. Koloskova, Ye.P. Ortemenka // Zdorove rebenka. - №2 (37). - 2012. - S. 28-30.
2. Spirometryia y pykfloumetryia pry bronkhyalnoi astme u detei. Uch. posobye. pod red. Y.M. Vorontsova – SPb.: Yzdanye HPMA, 2005. – 68 s.
3. Glutathione-S-transferase genes and asthma phenotypes: a human epidemiology (HuGE) systemic review and meta-analysis including unpublished data / C. Minelli, R. Granell, R. Newson [et al.] // Int. J. Epidem. - 2010. - Vol. 39. - P. 539-562.
4. Herzallah R. Phenotypes of Induced Sputum in Difficult to Treat Asthma / R. Herzallah // Thorax. – 2012. – Vol. 67. – P. 39.
5. Lovett C.J. Asthma inflammatory phenotypes in kids. Eosinophilic inflammation and the prognosis of childhood asthma / C.J. Lovett, B.F. Whitehead, P.G. Gibson // Clin. Exp. Allergy. - 2007. -Vol. 37. - P. 1594-1601.
6. Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma / H. Ercan, E. Birben, E.A. Dizdar [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. - 2006. - Vol. 118. – P. 1097-1104.
7. The glutathione-S-transferase Mu1 null genotype modulates ozone-induced airway inflammation in human subjects / N.E. Alexis, H.Z. Zhou, J.C. Lay [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. - 2009. - Vol. 124. - P. 1222-1228.

(received 22.08.2015, published online 30.09.2015)

(отримано 22.08.2015, опубліковано 30.09.2015)

