

©О. К. Колоскова, Л. О. Безруков, Т. М. Білоус

ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет»

**ГЕНЕТИЧНІ ПРЕДИКТОРИ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ ФІЗИЧНОЇ НАПРУГИ
В ДИТЯЧОМУ ВІЦІ**

ГЕНЕТИЧНІ ПРЕДИКТОРИ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ ФІЗИЧНОЇ НАПРУГИ В ДИТЯЧОМУ ВІЦІ. Проведено комплексне клінічно-спірографічне обстеження школярів, які хворіють на бронхіальну астму фізичної напруги, залежно від наявності чи відсутності поліморфізму генів ферментів глутатіон-S-трансферази та мутації гена *eNOS*. Показано, що бронхіальна астма фізичної напруги асоціює з делеціями глутатіон-S-трансферази (*GSTT₁del/GSTM₁del*). Виявлено, що максимальний бронхоспазм у пробі з фізичним навантаженням виникає у хворих із генотипом *GSTT₁del/GSTM₁+*, мінімальна бронходилатція під впливом інгаляції 200 мкг салбутамолу – при генотипі *GSTT₁+/GSTM₁+* або *eNOS/GT*, що зумовлює необхідність відносно активної дезобструктивної терапії під час загострень. Натомість генотип *GSTT₁+/GSTM₁del* асоціює з необхідністю мінімального обсягу швидкодопоміжної терапії.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ ФИЗИЧЕСКОГО НАПРЯЖЕНИЯ В ДЕТСКОМ ВОЗРАСТЕ. Проведено комплексное клинико-спирографическое обследование школьников, страдающих бронхиальной астмой физического напряжения, в зависимости от наличия либо отсутствия полиморфизма генов ферментов глутатион-S-трансферазы и мутации гена *eNOS*. Показано, что бронхиальная астма физического напряжения ассоциирует с полиморфизмом генов глутатион-S-трансферазы T_1 и M_1 (*GSTT₁del/GSTM₁del*). Отмечено, что максимальный бронхоспазм в пробе с физической нагрузкой возникает у детей с генотипом *GSTT₁del/GSTM₁+*, минимальная бронходилатция под влиянием ингаляции 200 мкг салбутамолу – при генотипе *GSTT₁+/GSTM₁+* или *eNOS/GT*, что диктует необходимость относительно активной дезобструктивной терапии во время обострений, хотя генотип *GSTT₁+/GSTM₁del* ассоциирует с необходимостью минимального объема этой терапии.

GENETIC PREDICTORS OF EXERCISE-INDUCED BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDHOOD. A complex clinic and spirographic investigation of schoolchildren suffering from exercise-induced bronchial asthma was held depending upon the presence or the absence of genes polymorphism of the enzymes of glutation-S-transferase T_1M_1 and gene mutation *eNOS*. The study showed that bronchial asthma physical effort associated with the polymorphism gene glutathione-S-transferase T_1 and M_1 (*GSTT₁del/GSTM₁del*). It is noted that the maximum bronchospasm on physical stress tests occur in children with genotype *GSTT₁del/GSTM₁+*, minimum bronchodilation influenced by the inhalation of 200 mcg salbutamol – genotype *GSTT₁+/GSTM₁+* and *eNOS/GT*, which necessitates a relatively active desobstructive therapy during exacerbations, although genotype *GSTT₁+/GSTM₁del* associated with the need for the minimum amount of this medication.

Ключові слова: діти, бронхіальна астма фізичної напруги, поліморфізм генів.

Ключевые слова: дети, бронхиальная астма физического напряжения, полиморфизм генов.

Key words: children, bronchial asthma, physical stress, gene polymorphism.

ВСТУП. Базисна терапія бронхіальної астми (БА) із застосуванням інгаляційних глюкокортикостероїдів (іГКС) є загально визнаним стандартом лікування даної недуги [1]. Разом із тим, використання іГКС у хворих на БА не завжди дозволяє досягти оптимального контролю над захворюванням, що часто пов'язують із генотипово-фенотиповою неоднорідністю цієї нозологічної форми в дитячому віці. Так, окремим фенотипом наразі визнана бронхіальна астма фізичної напруги (БАФН), яка, згідно з визначеннями PRACTALL, розглядається як варіант БА, за якого має місце асоційована з фізичною напругою транзиторна обструкція бронхів. Водночас поява обструктивного синдрому в дітей без БА визначається як «бронхоспазм» чи «бронхоконстрикція фізичної напруги» [2, 3]. Бронхоспазм фізичної напруги (БСФН) об'єктивно визначають як зниження ОФВ₁ на 10 % і більше від вихідної величини після відповідного бронхопровокаційного тесту [4, 5]. Позитивний вплив іГКС на БАФН та БСФН починається вже через 4 год після першої дози і має дозозалежний та залежний від часу характер [6–9]. У середньому через тиждень лікування іГКС відмічається перше плато ефективності, а через декілька місяців – друге фармакологічне плато. У цілому ефективність іГКС при БАФН коливається в межах

від 30 до 60 % та варіює від «повного» контролю до мінімального. Відмічено, що у хворих на БАФН, в яких досягнутий контроль над захворюванням завдяки комбінації іГКС із β_2 -агоністами тривалої дії, відміна останніх не спричиняє посилення БСФН [10]. При цьому залишається нечисленна група хворих із відсутністю ефекту від базисного лікування, представлена, мабуть, особливою субпопуляцією пацієнтів із відсутністю ефекту іГКС, що, зокрема, залежить від інших факторів [11], наприклад активності метаболізму ксенобіотиків в організмі. Саме поліморфізм генів, які кодують ферменти II фази детоксикації, визначає функціональність даних ферментів у легенях та інших органах, що підвищує генетичну схильність до окисного стресу та БА. Так, відмічено, що асоціація генотипів *GSTT₁-/GSTM₁-* підвищує ризик розвитку БА в дітей, порівняно з популяцією, майже у 5 разів, а при функціональній активності *GSTT₁+/GSTM₁+* в асоціації з поліморфізмом II за геном ACE – знижує у 7 разів, що фактично є протективною асоціацією генів [12]. Особливості генотипу хворих шкільного віку, які страждають від БАФН, зокрема щодо поліморфізму генів сімейства глутатіонтрансфераз (*GSTT₁/GSTM₁*) та ендотеліальної NO-синтази (*eNOS*), наразі вивчені недостатньо.

Мета дослідження – для вдосконалення діагностики та лікування БАФН у дитячому віці вивчити особливості показників лабільності дихальних шляхів за делеційного поліморфізму генів $GSTT_1$ і $GSTM_1$ та гена ендотеліальної NO-синтази ($eNOS$).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Для досягнення мети роботи з дотриманням біоетичних принципів у пульмоалергологічному відділенні ОДКЛ м. Чернівців обстежено 102 дитини шкільного віку, які хворіють на БА. У роботі використано класифікацію і менеджмент БА згідно з Уніфікованим клінічним протоколом первинної, вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги «Бронхіальна астма у дітей» (наказ МОЗ України № 868 від 8 жовтня 2013 р). На підставі обстеження дітей сформовано 2 клінічні групи. До I групи (основної) ввійшли 50 школярів із діагнозом БАФН, а до складу II групи (групи порівняння) – 52 хворих на БА дитини без ознак БСФН. Діагноз бронхіальної астми фізичної напруги (зусилля) формулювали відповідно до рекомендацій PRACTALL-2008, Європейського респіраторного товариства (ERS) та Європейської академії алергології та клінічної імунології (EAACI) у кооперації з GA²LEN (2008) [13].

Середній вік дітей I клінічної групи становив $11,2 \pm 0,4$ (95% ДІ: 10,3–12,1) року. Серед них було 22 дівчинки (44,0%) та 28 хлопчиків (56,0%). У сільській місцевості мешкало 27 дітей (54,0%), а у міських поселеннях – 23 хворих (46,0%). Середня тривалість захворювання становила $6,18 \pm 0,45$ (95% ДІ: 5,3–7,1) року. В II клінічній групі дівчаток було 16 (30,8%), а хлопчиків – 36 (69,3%). Середній вік хворих II клінічної групи становив $12,02 \pm 0,46$ (95% ДІ: 11,1–12,9) року. В сільській місцевості проживало 25 дітей (48,1%), а у містах – 27 хворих (51,9%). Середня тривалість захворювання сягала $6,77 \pm 0,55$ (95% ДІ: 5,7–7,9) року. В основній групі легка персистувальна БА визначалася у 10,0% випадків, середньотяжка – у 40,0% і тяжка – у 50,0% хворих. У групі порівняння наведена тяжкість персистування захворювання траплялася, відповідно, у 7,7, 36,5 та 55,8% спостережень ($p > 0,05$). Наведені дані дають підстави вважати, що за основними

клінічними характеристиками групи порівняння суттєво не відрізнялися, а отже, були зіставлюваними.

Дослідження проведено у паралельних групах, сформованих за принципом простої випадкової вибірки методом «дослід-контроль». Обстеження проводилося у позанападному періоді. Провокаційні спірографічні проби з дозованим фізичним навантаженням проводилися за умови відміни препаратів, які могли змінити неспецифічну реактивність бронхів до непрямого (дозований біг) бронхоспазмозогенного стимулу. Одержані результати визначення лабільності бронхів у відповідь на дозований біг та бронхомоторну пробу з інгаляцією 200 мкг сальбутамолу виражали у вигляді показника лабільності бронхів (ПЛБ, %) і його компонентів – індексу бронхоспазму (ІБС, %) та індексу бронходиляції (ІБД, %).

Спірографічні дослідження здійснювали на спірометрі «Microlab» (виробництва Великої Британії, серійний номер 445501, метрологічна повірка від 24.05.2012 р., свідоцтво № 39-02/0096). Генетичні дослідження проводилися на кафедрі молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету ім. Ю. Федьковича.

Одержані результати дослідження аналізували за допомогою комп'ютерних пакетів STATISTICA StatSoft Inc. та Excell XP для Windows на персональному комп'ютері з використанням параметричних і непараметричних методів обчислення.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

У таблиці 1 наведені результати спірографічного обстеження хворих груп порівняння.

Наведені дані дають підстави вважати, що при проведенні стандартної спірограми суттєвих відмінностей в одержаних результатах не встановлено. Більше того, середні показники ЖЄЛ у дітей I клінічної групи перевищували вікову норму, напевне, за рахунок наявності компенсаторних механізмів функції зовнішнього дихання.

Результати вивчення делецій у генах $GSTT_1$ та $GSTM_1$ у хворих клінічних груп порівняння (табл. 2) свідчать про те, що вказаний поліморфізм траплявся у кожній другій дитини, хворої на БА.

Таблиця 1. Показники спірографії в дітей клінічних груп, % від належної величини

Показник спірографії	I група (n=50)	II група (n=52)	p
ОФV ₁	88,6±5,6	92,5±5,3	>0,05
ЖЄЛ	102,6±5,3	97,6±5,6	>0,05
ОФV ₁ /ЖЄЛ	84,6±4,1	93,5±2,8	>0,05
МОШ25	59,6±8,4	69,3±7,3	>0,05
МОШ50	64,8±9,1	77,8±6,5	>0,05

Примітка. ОФV₁ – об'єм форсованого видиху на 1-й секундї; ЖЄЛ – життєва ємність легень; МОШ – максимальна об'ємна швидкість видиху; p – вірогідність відмінностей за критерієм Стьюдента.

Таблиця 2. Частота комбінацій поліморфізму $GSTT_1$ та $GSTM_1$ у дітей клінічних груп

Клінічна група	Кількість хворих	Розподіл генотипів $GSTT_1$ та $GSTM_1$							
		T_1+M_1+		$T_1del M_1+$		T_1+M_1del		$T_1del M_1del$	
		A	B	A	B	A	B	A	B
I група	50	21	42,0	9	18,0	15	30,0	5	10,0
II група	52	28	53,8	7	13,5	15	28,8	2	3,85
p		>0,05		>0,05		>0,05		<0,05	

Примітка. А – абсолютна кількість пацієнтів; В – відсоток від загальної кількості пацієнтів; p – критерій вірогідності відмінностей.

При цьому у хворих I клінічної групи частіше визначалися делеції гена $GSTT_1$ (28,0 %), ніж у дітей групи порівняння (17,35 %). Показано, що у хворих на БАФН майже втричі частіше виявлявся «нульовий» генотип вказаних генів (10,0 проти 3,85 %, $p < 0,05$). Це дає підстави вважати, що делеція гена $GSTT_1$ може впливати на виразність розвитку БСФН.

У таблиці 3 наведені показники лабільності бронхів у дітей I клінічної групи залежно від делеційного поліморфізму генів $GSTT_1$ та $GSTM_1$.

Наведені результати дозволяють вважати, що БСФН є найбільш виразним у дітей із генотипом $GSTM_1+$, особливо в комбінації з делеціями гена $GSTT_1$ (генотип $GSTT_1delM_1+$). За наявності у хворих на БАФН генотипу $GSTM_1+$, особливо в комбінації з $GSTT_1+$ (генотип $GSTT_1+M_1+$), визначається найменш виражена бронхомоторна проба із сальбутамолом, що, мабуть, відображає ремодуляцію дихальних шляхів. Наведене вище дає підстави вважати, що наявність у хворих на БАФН генотипу $GSTM_1+$ слід розглядати як потенційний ризик розвитку вираженого БСФН та слабкої бронхомоторної реакції, зумовленої ймовірною ремодуляцією бронхів.

Оскільки $eNOS$ має відношення до продукування монооксиду нітрогену в ранній фазі запалення, що призводить до релаксації судин, збільшення їх проникності та сприяє синдрому «витікання», було доцільним вивчити

частоту мутаційного поліморфізму даного гена в групах порівняння (табл. 4).

Наведені дані дають можливість вважати, що в кожній другій дитині, хворої на БА, трапляється мутаційний поліморфізм гена $eNOS$ (генотипи GT , TT). Гомозиготний генотип TT найчастіше відмічався у дітей групи порівняння без ознак БСФН, що дає підстави для припущення впливу мутаційного поліморфізму гена $eNOS$ на показники лабільності бронхів.

Відповідно до цього, ми вивчали показники бронхомоторної проби з провокацією дозованим бігом та інгаляцією короткодійного β_2 -агоніста у пацієнтів I групи з визначеною характеристикою гена $eNOS$ (табл. 5). Наведені дані вказують на те, що мутація гена $eNOS$ суттєво не впливає на виразність БСФН, зменшуючи, водночас, результати бронхомоторної проби із сальбутамолом, мабуть, через наявність у дитини процесу ремодуляції бронхів.

Таким чином, аналіз генетичної схильності організму дітей до змін реактивності бронхів у цілому показав, що бронхоспазм фізичної напруги суттєво зростає за відсутності в таких дітей делецій у гені $GSTM_1$, які почасти можна розглядати як чинник схильності до розвитку бронхіальної обструкції після фізичного навантаження. У хворих на БАФН виразність бронхомоторної реакції після інгаляції сальбутамолу суттєво зменшувалася за наявності в них генотипу $GSTM_1+$ та/або мутацій гена $eNOS$.

Таблиця 3. Показники лабільності бронхів у хворих на БАФН залежно від делеційного поліморфізму генів $GSTT_1$ та $GSTM_1$ ($P \pm m$)

Генотип	ІБС, %	ІБД, %	ПЛБ, %
$GSTT_1+M_1+$	21,0±2,44	10,1±2,16*	31,1±3,67
$GSTT_1delM_1+$	24,2±4,98	11,2±4,24*	35,4±5,64
$GSTT_1+M_1del$	18,4±0,9	21,0±2,72	39,3±2,86
$GSTT_1delM_1del$	19,4±1,7	12,8±4,92	32,1±4,83
p	>0,05	<0,05*	>0,05

Примітка. * – відносно $GSTT_1+M_1del$.

Таблиця 4. Частота генотипів $eNOS$ у дітей клінічних груп порівняння

Клінічна група	Кількість хворих, n	Розподіл генотипів $eNOS$					
		GG		GT		TT	
		A	B	A	B	A	B
I група	28	15	53,6	11	39,3	2	7,14
II група	22	10	45,5	8	36,4	4	18,2
p		>0,05		>0,05		<0,05	

Примітка. А – абсолютна кількість пацієнтів; В – відсоток від загальної кількості пацієнтів; р – критерій кутового перетворення Фішера.

Таблиця 5. Показники лабільності бронхів у хворих на БАФН залежно від мутацій гена $eNOS$ ($P \pm m$)

Генотип	ІБС, %	ІБД, %	ПЛБ, %
$eNOS/GG$	20,3±2,57	19,8±3,49	40,0±3,85
$eNOS/GT$	20,1±2,49	11,7±1,23*	31,3±4,9
$eNOS/TT$	21,5±5,5	12,0±1,3	33,5±5,5
p	>0,05	<0,05*	>0,05

Примітка. * – відносно GG.

ВИСНОВКИ. 1. Незалежно від наявності бронхоспазму фізичної напруги у кожного другого школяра, який хворіє на бронхіальну астму, мають місце делеційний поліморфізм генів *GSTT₁* і *GSTM₁* та мутація гена *eNOS*.

2. Бронхіальна астма фізичної напруги у шкільному віці асоціює з «нульовим» генотипом (*GSTT₁del/GSTM₁del*) та майже втричі меншою частотою мутації *eNOS/TT*.

3. При БАФН максимальний бронхоспазм у пробі з фізичним навантаженням виникає у хворих із генотипом *GSTT₁del/GSTM₁+*, мінімальна бронходилатція під впли-

вом 200 мкг сальбутамолу – при генотипі *GSTT₁+/GSTM₁+* або *eNOS/GT*, що зумовлює необхідність відносно активної дезобструктивної терапії під час загострень. Натомість генотип *GSTT₁+/GSTM₁del* асоціює з необхідністю мінімального обсягу швидкодіючої терапії.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ полягають у вивченні особливостей місцевого запального процесу в бронхах дітей, які страждають від БАФН, за поліморфізму вивчених генів ферментів біотрансформації ксенобіотиків.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A new look at the pathogenesis of asthma / S. T. Holgate, H. S. Arshad, G. C. Roberts [et al.] // *Clin. Sci. (Lond)*. – 2009. – Vol. 118. – P. 439–450.
2. Anderson S. Exercise-induced bronchoconstriction: pathogenesis / S. Anderson // *Curr. Opin. Allergy Asthma Rep.* – 2005. – Vol. 5. – P. 116–122.
3. Panrsons J. P. Exercise-induced bronchoconstriction in athletes / J. P. Panrsons, J. Y. Mastronarde // *Chest*. – 2005. – Vol. 128. – P. 3966–3974.
4. Yotshall R. W. Exercise-induced bronchoconstriction / R. W. Yotshall // *Drugs*. – 2002. – Vol. 62. – P. 1725–1739.
5. Rundell K. W. Exercise-induced bronchospasm in the elite athlete / K. W. Rundell, D. M. Jenkinson // *Sports Med.* – 2002. – Vol. 32. – P. 583–600.
6. Effect of ciclesonide dose and duration of therapy O2 exercise-induced bronchoconstriction in patients with asthma / P. Subbarao, M. Duong, E. Adelroth [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2006. – Vol. 117. – P. 1008–1013.
7. Effect of different antiasthmatic treatment on exercise-induced bronchoconstriction in children with asthma / I. Stelmach, I. Grzelewski, P. Majar [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 121. – P. 383–389.
8. Acute effects of beclomethasone on hyporpnia-induced bronchoconstriction / P. Kippelen, J. Larson, S. D. Anderson [et al.] // *Med. Sci Sports Exerc.* – 2010. – Vol. 42. – P. 273–280.
9. Effects of single-dose fluticasone on exercise-induced asthma in asthmatic children: a pilot study / B. J. Thio, G. L. Slingerland, A. F. Nagelberke [et al.] // *Pediatr. Pulmonol.* – 2001. – Vol. 32. – P. 115–121.
10. Pilot study: the effect of reducing treatment on exercise-induced bronchoconstriction / E. T. Kersten, J. M. Driessen, J. C. van Leeuwen [et al.] // *Pediatr. Pulmonol.* – 2010. – Vol. 45, No. 9. – P. 927–933.
11. Sputum eosinophils and response of exercise-induced bronchoconstriction to corticosteroid in asthma / M. Duong, P. Subbarao, E. Aderoth [et al.] // *Chest*. – 2008. – Vol. 133. – P. 404–411.
12. Bolt H. M. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases *GSTT1* and *GSTM1* in pharmacology and toxicology / H. M. Bolt, R. Thier // *Curr. Drug. Metab.* – 2006. – Vol. 7 (6). – P. 613–628.
13. Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GA²LEN review / C. Almqvist, M. Worm, B. Leynaert [et al.] // *Allergy*. – 2008. – Vol. 63. – P. 47–578.

Отримано 28.07.16