

УДК 616.37-003.4-053.2-07+616-056.7

Н.В. Роговик^{1,3}, Н.В. Віштак², Г.В. Макух², Л.Й. Бобер³

РОЗПОДІЛ АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА mEPHX У ХВОРИХ НА МУКОВІСЦИДОЗ ГОМОЗИГОТ ЗА МУТАЦІЄЮ F508DEL

¹ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького² Інститут спадкової патології АМН України, м. Львів³ Західноукраїнський спеціалізований дитячий медичний центр, м. Львів

Резюме. У пацієнтів, хворих на муковісцидоз гомозигот за «мажорною» мутацією, виявлено певні частоти реєстрації алелів гена mEPHX. Їх проаналізовано у загальній групі пацієнтів із легким та тяжким варіантами перебігу хвороби та в осіб із синдромом холестазу. «Си-

льних» асоціацій між алелями гена mEPHX серед пацієнтів і тяжкістю перебігу хвороби не виявлено, що потребує подальших робіт із більшою кількістю пацієнтів.

Ключові слова: ген mEPHX, муковісцидоз, мутація F508del, генетичний поліморфізм.

Вступ. Муковісцидоз (МВ) – одне з найбільш поширених (1:3000) моногенних захворювань із поліорганною маніфестацією. Клінічні прояви МВ різноманітні й визначаються такими факторами: мутацією гена трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу (ТРБМ), генами-модифікаторами та сукупністю чинників навколишнього середовища [1].

Відомо вже понад 1900 мутацій гена ТРБМ [2]. Протягом останніх десятиліть вчені намагаються знайти взаємозв'язок між генотипом та фенотипом у хворих на МВ. Однією зі спроб була класифікація мутацій гена ТРБМ залежно від тяжкості клінічних проявів на «тяжкі», «легкі» та «варіюючі». Мутація F508del гена ТРБМ вважається «тяжкою», оскільки її наявність асоціюється з тяжким перебігом МВ. Ця мутація є найбільш поширеною (мажорною) серед хворих на МВ. Проте спостерігається значний клінічний поліморфізм у хворих на МВ з однаковими мутаціями гена ТРБМ, зокрема і в сибсів. Отже, це підтверджує думки щодо впливу інших модифікуючих факторів на фенотип МВ як генетичних, так і епігенетичних [3, 4].

Фенотипові прояви МВ є надзвичайно важливими для пацієнта, зокрема стан бронхолегеневої системи та нутритивний статус, оскільки вони визначають тривалість та якість життя, терапевтичну тактику, оцінку ризику захворюваності та прогнозування характеру перебігу патології [5].

Ураження респіраторного тракту, у вигляді безперервно рецидивного хронічного запального процесу, спостерігається майже у всіх пацієнтів з МВ. При цьому чільне місце належить «оксидативному стресу», який виникає внаслідок дисбалансу оксидантів і антиоксидантів, що сприяє прогресуванню легеневої патології [6].

МВ як мультиорганна патологія потребує комплексного підходу та застосування значної кількості медикаментів, які впливають на різноманітні патогенетичні ланки хвороби.

Особливо актуальними при цьому є вивчення метаболізму токсичних чинників і шляхів їх біотрансформації в осіб із хронічними обструктивними захворюваннями легень (ХОЗЛ), зокрема і зумовленого МВ. Процеси біотрансформації поля-

гають у знешкодженні чужорідних сполук і сприяють створенню балансу між організмом та навколишнім середовищем. В окисненні токсичних чинників беруть участь як ензими цитохрому, так і ферменти нецитохромного окиснення. Серед останніх чільне місце посідає мікрсомальна епоксидгідролаза (mEPHX), яка забезпечує детоксикацію епоксид-похідних поліароматичних вуглеводнів шляхом каталізу їх до менш реактивних і більш водорозчинних дигідродіолів із подальшою їхньою екскрецією з організму [7].

Ген mEPHX локалізується на хромосомі 1 (1q42.13) і складається з дев'яти екзонів розділених вісьмома нітронами. Для нього відомі декілька одонуклеотидних поліморфізмів, із яких найбільш значущими є два: T337C та A415G, оскільки вони призводять до зміни активності ферменту mEPHX. Це, у свою чергу, дозволило класифікувати фенотипи, зумовлені цим ферментом, на «повільний» генотип S/S та «швидкий» генотип N/N [8].

У геномі «повільного» алеля T337C (Tyr113His) відбувається транзиція Т на С у положенні 337 у третьому екзоні, що призводить до заміни в ферменті тирозинового залишку на гістидиновий у положенні 113 і зумовлює зниження активності ферменту на 50 % у гомозигот і на 25 % у гетерозигот. У результаті знижується ефективність інактивації токсичних метаболітів, що призводить до розвитку «оксидативного стресу» і посиленої продукції великої кількості вільних радикалів. Клінічно це проявляється збільшенням ризику розвитку респіраторної патології.

Алель G локусу A415G (His139Arg) має назву «швидкого», оскільки дана мутація зумовлює збільшення активності ферменту на 25 %. Це відбувається при заміщенні аденіну на гуанін у положенні 139 (4 екзон) гена mEPHX.

Незмінна активність і стабільність ферменту mEPHX є сильними факторами стійкості до розвитку ХОЗЛ.

Ген mEPHX експресується в різноманітних клітинах, зокрема в гепатоцитах, епітеліальних клітинах та бронхах. Патогенетична участь фенотипів вищеписаних одонуклеотидних поліморфізмів у розвитку легеневої патології впливає на

антиоксидантний захист легенів в умовах «оксидативного стресу» при ХОЗЛ, зменшення реактивності чужорідних сполук, детоксикації екзогенних хімічних сполук [9].

Мета дослідження. Вивчити розподіл алельних варіантів гена mEPHX як модифікуючого фактору захворювання у хворих на МВ гомозигот за мутацією F508del.

Матеріал і методи. Матеріалом для дослідження слугувала ДНК, виділена з лейкоцитів периферичної крові пацієнтів. Виділення та очистку ДНК із лейкоцитів периферичної крові здійснювали набором «GenePak DNAPCR test» (ООО «Лаборатория ИзоГен», м.Москва, РФ). На подальших етапах дослідження проводили ампліфікацію послідовностей ДНК in vitro, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

ПЛР здійснювали в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик» («ДНК-технология», РФ), застосовуючи олігонуклеотидні праймери («Fermentas», м.Вільнюс, Литва), набір реагентів для ампліфікації «GenePak® PCR Core» (ООО «Лаборатория ИзоГен», м.Москва, РФ). Ампліфіковані продукти піддавали рестрикції, використовуючи ендонуклеази рестрикції Eco32I (T337C) та RsaI (A415G) (MBI Fermentas) [10].

Специфічність продуктів ПЛР та аналіз рестрикційних фрагментів проводили шляхом електрофорезу у 2-3 % агарозному гелі. Отримані сигнали порівнювали з маркерами довжин і на основі цього детектували розміри отриманих фрагментів.

Результати дослідження та їх обговорення. Проведено молекулярно-генетичний аналіз частоти генотипів за поліморфними локусами T337C та A415G гена mEPHX у 35 пацієнтів, хворих на МВ гомозигот за мутацією F508del, та в 157 осіб групи контролю.

У результаті проведених молекулярно-генетичних досліджень та подальших статистичних розрахунків встановлено розподіл генотипів за поліморфними локусами гена mEPHX серед пацієнтів, хворих на МВ, порівняно з групою контролю та розподіл даних генотипів залежно від клінічного перебігу МВ (ступінь тяжкості визначався за шкалою Швахмана-Кульчицького).

Аналіз розподілу генотипів за поліморфним локусом T337C гена mEPHX показав, що частота реєстрації генотипу 337CC у групі пацієнтів з МВ є нижчою (8,6 %), ніж у пацієнтів контрольної групи (15 %) (табл. 1).

Особи, які є гомозиготами за алелем 337T (51,4 %, OR=1,35) гена mEPHX серед пацієнтів, хворих на МВ з «мажорною» мутацією, трапляються значно частіше, ніж з алелем 337C (8,6 %, OR=0,52). Одержані дані корелюють із результатами досліджень, отриманих російськими вченими, які встановили, що наявність 337CC генотипу гена mEPHX характеризується несприятливим прогнозом щодо тяжкості бронхолегеневих проблем у пацієнтів із ХОЗЛ та МВ [11].

Результати, отримані дослідниками з Великобританії, вивчаючи поліморфізм алелів гена mEPHX серед 1017 пацієнтів з ХОЗЛ, виявили, що не існує асоціацій між алелями гена mEPHX і розвитком хронічної патології легенів чи тяжкості її перебігу [12].

У пацієнтів із легшим перебігом МВ частота генотипу 337TC є нижчою (50 %), ніж у пацієнтів із тяжким перебігом МВ (31,6 %) (табл. 2). Статистично вірогідних відмінностей у частотах генотипів не встановлено ні в групі пацієнтів з МВ, ні у групах пацієнтів із МВ із різними варіантами перебігу МВ ($p=2,04$ та $p=0,7$ відповідно).

Генотип 415GG гена mEPHX виявлено частіше в пацієнтів із МВ (20 %), ніж у контрольній групі (8 %). Результати дослідження показали, що частота реєстрації даного генотипу є статистично вірогідною в пацієнтів із МВ (OR=2,77, CI 95 %:1,01-7,56, $p^*<0,05$) порівняно з контрольною групою (табл. 3).

У пацієнтів із легшим перебігом МВ генотип 415AA трапляється частіше (75 %), ніж у пацієнтів із тяжким перебігом МВ (52,6 %), а генотип 415GG реєструється у два рази рідше в пацієнтів із легшим перебігом МВ, ніж у пацієнтів із тяжким перебігом МВ (26,3 %) (табл. 4). Відмінності частот генотипів поліморфних локусів 415AA і 415GG серед досліджуваних груп пацієнтів не були статистично вірогідними ($p=1,86$ та $p=1,04$ відповідно).

Таблиця 1

Результати генотипування дітей з муковісцидозом за поліморфним локусом T337C (Tyr 113 His) гена mEPHX (Eco32I)

Генотип	Загальна дослідна група (n=35)		Контрольна група (n=157)		χ^2 ($p>0,05$)	OR, 95% CI
	n	%	n	%		
337TT	18	51,4	69	44	0,65	1,35 (0,648-2,81)
337TC	14	40	64	41	0,01	0,969 (0,459-2,046)
337CC	3	8,6	24	15	2,04	0,52 (0,147-1,833)
Алель T	50	71,4	202	64	1,28	
Алель C	20	28,6	112	36	1,28	

Таблиця 2

**Порівняння даних генотипування дітей з муковісцидозом за поліморфним локусом
Т337С (Тур 113 His) гена mERHX (Eco32I)**

Генотип	Дослідна група I (n=16)		Дослідна група II (n=19)		χ^2 (p>0,05)	OR, 95% CI
	n	%	n	%		
337TT	7	43,75	11	57,9	0,70	0,57 (0,148-2,169)
337TC	8	50	6	31,6	1,23	2,167 (0,547-8,587)
337CC	1	6,25	2	10,5	0,20	0,57 (0,047-6,896)
Алель Т	22	68,75	28	73,7	0,21	
Алель С	10	31,25	10	26,3	0,21	

Примітка. Дослідна група I – з легшим клінічним перебігом (3-5-й ступінь), дослідна група II – з тяжчим клінічним перебігом (1-2-й ступінь)

Таблиця 3

**Результати генотипування дітей з муковісцидозом за поліморфним локусом
А415G (His 139 Arg) гена mERHX (RsaI)**

Генотип	Дослідна група (n=35)		Контрольна група (n=157)		χ^2	OR, 95% CI
	n	%	n	%		
415AA	22	62,9	99	63	0 (p>0,05)	0,99 (0,46-2,12)
415AG	6	17,1	45	29	1,95 (p>0,05)	0,51 (0,20-1,32)
415GG	7	20	13	8	4,21 (p*<0,05)	2,77 (1,01-7,56)
Алель А	50	71,4	243	77	1,12 (p>0,05)	
Алель G	20	28,6	71	23	1,12 (p>0,05)	

Примітка. p*< 0,05 – статистично вірогідна відмінність

Таблиця 4

**Порівняльна таблиця даних генотипування дітей з муковісцидозом за поліморфним локусом
А415G (His 139 Arg) гена mERHX (RsaI)**

Генотип	Дослідна група I (n=16)		Дослідна група II (n=19)		χ^2 (p>0,05)	OR, 95% CI
	n	%	n	%		
415AA	12	75	10	52,6	1,86	2,7 (0,363-11,467)
415AG	2	12,5	4	21,1	0,45	0,54 (0,085-3,397)
415GG	2	12,5	5	26,3	1,04	0,4 (0,066-2,419)
Алель А	26	81,25	24	63,2	2,79	
Алель G	6	18,75	14	36,8	2,79	

Примітка. Дослідна група I – з легшим клінічним перебігом (3-5-й ступінь), дослідна група II – із тяжчим клінічним перебігом (1-2-й ступінь)

Проаналізовано частоту розподілу алелів Т і С та А і G поліморфних локусів Т337С та А415G відповідно, гена mERHX у семи пацієнтів, хворих на МВ з «мажорною» мутацією та проявами холестатичного гепатиту. Встановлено, що ресстра-

ція алеля Т за поліморфним локусом Т337С і алеля А за локусом А415G у даній досліджуваній групі спостерігається частіше (85,7 % і 78,5 % відповідно) порівняно з розподілом алеля С за

локусом T337C (14,3 %) і G за локусом A415G (21,5 %).

Дані результати зумовлюють до подальшого проведення генотипування більшої кількості хворих на МВ з ураженням печінки з метою вивчення ролі вищеописаних одонуклеотидних поліморфізмів у розвитку холестаза.

Частоти генотипів mEPHX 415AA і 415GG у пацієнтів із легшим перебігом МВ є вищими, ніж у пацієнтів з тяжким перебігом МВ, проте дані відмінності не досягнули вірогідних значень. Можливо, такі тенденції поширення вищеописаних генотипів зберігатимуться в подальших дослідженнях, які необхідно провести серед більшої кількості хворих на МВ.

Висновки

1. Серед осіб, хворих на муковісцидоз з «мажорною» мутацією, спостерігається дещо підвищена частота генотипу 337TT гена mEPHX порівняно з контролем. Статистично вірогідних відмінностей не виявлено, що, можливо, зумовлено малою вибіркою даних.

2. Генотип 415GG гена mEPHX статистично вірогідно вищий у хворих на муковісцидоз порівняно з контрольною групою, а його роль у розвитку ураження респіраторного тракту при муковісцидозі планується додатково вивчати, зокрема і на ферментативному рівні.

3. Вірогідних асоціацій між алелями гена mEPHX і тяжкістю перебігу захворювання у хворих на муковісцидоз гомозигот з мутацією F508del не виявлено, що потребує подальшого вивчення з використанням більшої кількості даних про пацієнтів, хворих на муковісцидоз і з іншими мутаціями.

Література

1. Антипкін Ю.Г. Современная клиническая характеристика течения муковисцидоза у детей в Украине / Ю.Г. Антипкін, Л.П. Михайлец // Репродуктивное здоровье женщины. – 2006. – № 3 (28). – С. 215-217.

2. Cystic Fibrosis Mutation Database: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cfr>
3. Муковісцидоз: метод. рекомендації / [Н. И. Капранов, Н. Ю. Каширская, В. Д. Шерман та ін.]. – М.: Медико-генетический научный центр РАМН, 2011. – С. 10-12.
4. Макух Г.В. Аналіз мутацій гена CFTR (ТРБМ) у хворих високого ризику муковісцидозу із Західного регіону України: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.15 «Інститут клітин. біології та генет. інженерії» / Г.В. Макух. – К., 2001. – 16 с.
5. Бобер Л.Й. Стан підшлункової залози у хворих на муковісцидоз залежно від асоціації фенотип-генотип: дис. ... канд. наук : 14.01.10 / Бобер Людмила Йосипівна. – Львів, 2008. – 149 с.
6. Effect of an antioxidant-rich multivitamin supplement in cystic fibrosis / S.D. Sagel, M.K. Sontag, M.M. Anthony [et al.] // J. of cystic fibrosis. – 2011. – № 10 (1). – P. 31-36.
7. Информационная система по медицински-значимым полиморфизмам генома человека – онлайн база данных [Электронный ресурс]: [сайт] / ФГУ "НИИ Физико-химической медицины" ФМБА России. – Режим доступа: <http://www.genepassport.ru/Main>. – название с экрана.
8. Віштак Н.В. Алельний поліморфізм гена mEPHX як маркер схильності до формування екологічно детермінованих станів у дітей / Н.В. Віштак, О.З. Гнатейко // Довкілля та здоров'я. – 2011. – № 2. – С.15-19.
9. Polymorphisms in the microsomal epoxide hydrolase gene: role in lung cancer susceptibility and prognosis / Z. Erkisi, I. Yaylim-Eraltan, A. Turna [et al.] // Tumori. – 2010. – № 96. – P. 756-763.
10. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD / S-L. Cheng, C-J. Yu, C-J. Chen [et al.] // Eur. Respir. J. – 2004. – Vol. 23. – P. 818-824.
11. Korytina G.F. Role of polymorphic variants of cytochrome P450 genes (CYP1A1, CYP2E1) and microsomal epoxide hydrolase (mEPHX) in pathogenesis of cystic fibrosis and chronic respiratory tract diseases / G.F. Korytina, D.G. Ianbaeva, T.V. Viktorova // Mol. Biol. (Mosk). – 2003. – № 37 (5). – P. 784-792.
12. Genetic variants of microsomal epoxide hydrolase and glutamate-cysteine ligase in COPD / S. Chappell, L. Daly, K. Morgan [et al.] // Eur. Respir. J. – 2008. – № 32 (4). – P. 931-937.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА mEPHX У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ ГОМОЗИГОТ ПО F508DEL

Н.В. Роговик, Н.В. Виштак, Г.В. Макух, Л.И. Бобер

Резюме. У пациентов с муковисцидозом гомозигот по «мажорной» мутации выявлены определенные частоты регистрации аллелей гена mEPHX. Они проанализированы в общей группе больных, среди пациентов с легким и тяжелым вариантами течения болезни и у больных с синдромом холестаза. «Сильных» ассоциаций между аллелями гена mEPHX среди пациентов и тяжестью течения болезни не обнаружено, что требует дальнейших работ с большим количеством пациентов.

Ключевые слова: ген mEPHX, муковисцидоз, мутация F508del, генетический полиморфизм.

DISTRIBUTION OF ALLELIC VARIANTS OF mEPHX GENE AMONG PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS OF F508DEL HOMOZYGOTES

N.V. Rohovyk^{1,3}, N.V. Vishtak², H.V. Makukh², L.J. Bober³

Abstract. Patients with cystic fibrosis of homozygotes for the "major" mutations had specific allele frequencies in mEPHX gene. They have been analysed in the general group of patients, among those with mild and severe forms of the

disease and in patients with cholestasis syndrome. We have not found "strong" association between alleles of the gene mEPHX among patients and the severity of the disease which requires further research with a larger number of patients.

Key words: mEPHX gene, cystic fibrosis, mutation F508del, genetic polymorphism.

¹ Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Lviv)

² Institute of Hereditary Pathology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine (Lviv)

³ Western Ukrainian Specialized Children's Medical Centre (Lviv)

Рецензент – проф. Т.В. Сорокман

Buk. Med. Herald. – 2013. – Vol. 17, № 4 (68). – P. 124-128

Надійшла до редакції 28.08.2013 року

© Н.В. Роговик, Н.В. Віштак, Г.В. Макух, Л.Й. Бобер, 2013

616.248-008.61-08-053.5

С.І. Сажин

ЕФЕКТИВНІСТЬ БАЗИСНОЇ ТЕРАПІЇ АТОПІЧНОЇ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ В ДІТЕЙ ЗА ЗМІНАМИ СПРИЙНЯТЛИВОСТІ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ ДО НЕПРЯМИХ ПРОВОКАЦІЙНИХ ЧИННИКІВ

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Резюме. У роботі проаналізована динаміка гіперсприйнятливості дихальних шляхів на тлі базисного лікування в дітей шкільного віку, хворих на atopічну та неатопічну бронхіальну астму. Встановлено, що для зниження надмірної чутливості бронхів пацієнтам із atopічним фенотипом захворювання до схеми профілактичної терапії варто включати анти-IgE-антитіла. Па-

цієнтам, хворим на неатопічну бронхіальну астму, базисну терапію варто посилювати призначенням пролонгованих теофілінів.

Ключові слова: бронхіальна астма, діти, лікування, гіперсприйнятливості бронхів.

Вступ. Бронхіальна астма (БА) розглядається як комплексне імунологічне та запальне захворювання, що характеризується хронічним запаленням бронхів, гіперреактивністю та ремоделюванням дихальних шляхів [8].

Гетерогенність клінічних і додаткових симптомів БА зумовлює її поділ на окремі фенотипи [11]. Однією з перших спроб поділу бронхіальної астми на альтернативні форми, за клінічно-імунологічними показниками, вважають виокремлення зовнішнього (атопічного) та внутрішнього (неатопічного) фенотипів захворювання [4]. Наявність позитивних шкірних прик-тестів, надмірна концентрація специфічних IgE в сироватці крові, еозинофілія периферичної крові та/або індукованого мокротиння, як правило, у поєднанні з алергічним ринітом і/або екземою притаманні atopічній формі БА [9]. Ознаками неатопічного фенотипу вважають повторні бронхообструкції, які маніфестували на другому-третьому роках життя та були спровоковані інфекційними захворюваннями респіраторного тракту [6]. На відміну від дорослих, у яких неатопічна астма порівняно з atopічною є більш тяжкою, у дітей неатопічний фенотип характеризується легшим перебігом [5]. На сьогоднішній день продовжується пошук ключових патогенетичних ланок запалення при внутрішньому варіанті захворювання. Відповідно й біомаркери для визначення даного фенотипу (збільшення концентрації Th1-типу, IL-18, IL-15

у крові, антитіл до білків епітелію дихальних шляхів) не є валідними [12].

Враховуючи, що пацієнти з різними фенотипами захворювання потребують індивідуалізованих схем профілактичного лікування, на сьогодні тривають дискусії щодо доцільності внесення до стандартів терапії бронхіальної астми окремих груп препаратів. Проте практично відсутні роботи, які присвячені вивченню динаміки гіперсприйнятливості дихальних шляхів за альтернативних імунологічних фенотипів БА.

Мета роботи. Оцінити ефективність стандартних схем базисної терапії в дітей із atopічним та неатопічним фенотипом захворювання за змінами реактивності дихальних шляхів для покращання індивідуалізованого підходу до профілактичного лікування.

Матеріал і методи. На базі пульмоалергологічного відділення обласної дитячої клінічної лікарні (м. Чернівці) обстежено 64 дитини, хворих на бронхіальну астму. Критеріями входження в дослідження вважали: вік дитини від 6 до 17 років, діагностована персистувальна БА, тривалість хвороби не менше трьох місяців, наявність інформаційної згоди батьків та дітей. Критеріями невходження слугували: вік до 6 та старше 18 років; інтермітуюча БА, активне куріння більше десяти цигарок на день, використання препаратів, які могли б вплинути на результати досліджень, дітисироти, наявність уроджених вад розвитку бронхів