

УДК 575.1:616.248-053.2

*Н.В. Банадига, С.Б. Волошин***РОЛЬ СПАДКОВОСТІ ТА ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА G308A ФАКТОРА НЕКРОЗУ ПУХЛИН АЛЬФА У ДІТЕЙ ІЗ БРОНХІАЛЬНОЮ АСТМОЮ**

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України»

Резюме. Вивчено особливості перебігу бронхіальної астми у хворих із різними генотипами поліморфізму гена G308A TNF α залежно від спадкового анамнезу, тяжкості перебігу, дебюту захворювання та статі. Встановлено, що в дітей домінуючим є гомозиготний варіант G/G по основному алелю, значно рідше трапляється гетерозиготний варіант G/A (28,71 %) TNF α G308A.

Вирішальну роль у реалізації захворювання належить наявності обтяженого спадкового анамнезу, зокрема по материнській лінії, з генотипом G/G TNF α G308A.

Ключові слова: бронхіальна астма, поліморфізм генів, спадковість.

Вступ. Неухильний ріст захворюваності та ранній дебют алергічної патології в дитячому віці зумовлює потребу змінити підходи до цієї проблеми. Очевидним є те, що ретельне вивчення спадкового анамнезу в родині – лише первинний крок до запобігання хворобі. На сучасному етапі встановлено, що ризик atopії зростає залежно від наявної патології у батьків (в одного чи обох). Водночас умови зовнішнього оточення вирізняють дебют хвороби, саме тому визріла реальна потреба запровадження нових методів діагностики та запобігання алергії. Останніми роками набуває все більшої популярності дослідження генотипових та фенотипових ознак, взаємодія яких формує адаптаційно-приспосувальні механізми до мінливих факторів зовнішнього середовища [4]. Інтерпретація результатів генетичного дослідження в комплексі із даними клінічних та лабораторно-інструментальних методів обстеження дає змогу надати низку заходів, спрямованих на первинну та вторинну профілактику генетично детермінованих захворювань, спрогнозувати тяжкість перебігу нозологій та сприяти забезпеченню надання лікувальних схем із врахуванням індивідуальних особливостей [1, 6]. Наявність негативної тенденції до зростання захворюваності викликає значний інтерес до пошуку молекулярно-генетичних механізмів розвитку бронхіальної астми (БА) серед дитячої популяції, а також причинних алергенів, які визначають тип та ступінь реакцій організму у відповідь на впливи середовища [7, 10].

Однією із патогенетичних ланок розвитку БА є порушення регуляції цитокінів [3, 7], синтез яких контролюється імунною відповіддю та визначає розвиток алергічної спрямованості. Найбільш важливу роль відіграють IL-1b і фактор некрозу пухлин (TNF α), що ініціюють запальну реакцію, а також гранулоцитарно-макрофагальний колоніестимулювальний фактор (GM-CSF), який збільшує тривалість життя еозинофілів у дихальних шляхах [11, 13]. Різні прояви TNF α опосередковуються через специфічні рецептори, взаємодія з якими опосередковується через активацію або інгібування експресії певних генів [8, 9], за рахунок чого проявляється прозапальний

чи захисний ефекти. Даний цитокін в організмі може брати участь у процесах деструкції та репарації, що сприяє посиленню чи зменшенню запальної відповіді [8]. Ступінь продукції TNF α в організмі індукується декількома участками генома, одним із найважливіших яких є ген TNF α , а наявний поліморфізм промотора гена може призводити до заміни основи в позиції 308 аденіну на гуанін (A/G), що може сприяти синтезу підвищеної кількості даного цитокіну в організмі [11]. Тому доцільним є вивчення частоти заміни алельних варіантів G308A TNF α з метою визначення прогностичного значення поліморфізму для розвитку та тяжкості перебігу БА.

Мета дослідження. Відстежити поліморфізм гена G308A TNF α у дітей з БА залежно від даних спадкового анамнезу.

Матеріал і методи. Для досягнення мети роботи проведено поглиблене клініко-інструментальне та молекулярно-генетичне обстеження 101 дитини з БА, які перебували на стаціонарному лікуванні дитячої міської та обласної лікарень. Діагноз у даних пацієнтів встановлений з урахуванням міжнародних рекомендацій GINA-2015 [12] та наказу МОЗ України №868 від 08.10.2013 р. [5]. Серед хворих переважали особи чоловічої статі (70,30 %) та лише третину становили дівчатка (29,70 %). У віковому аспекті переважали діти молодшого шкільного віку (до 12 років) – 58 (57,43 %), та дещо меншу кількість становили особи старшого шкільного віку – 43 (42,57 %). Жителів міської місцевості було 56,44 %, села – 43,56 %.

Генотипування поліморфних варіантів заміни G308A TNF α проведено шляхом виділення ДНК з периферичної крові за допомогою тест-системи «innu PREP Blood DNA Mini Kit» (Німеччина). Щоб визначити поліморфні варіанти гена TNF α (G308A) rs1800629 використовували модифіковані протоколи з олігонуклеотидними праймерами із застосуванням методу ПЛР та наступним аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів. Досліджувани ділянки генів ампліфікували за допомогою специфічних праймерів «Metabion» (Німеччина) [13]. Продукти ампліфікації фрагментів ДНК генів підля-

гали гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеази рестрикції *NcoI* («Thermo Scientific», США). Візуалізували отримані результати в трансліномінаторі.

Результати досліджень та їх обговорення.

Проаналізовані результати клініко-лабораторних обстежень дали змогу встановити у 29 (28,71 %) пацієнтів інтермітуючий перебіг БА, а у 72 (71,29 %) дітей – персистувальний перебіг. Зокрема, у 23 (22,77 %) осіб персистувальний перебіг легкого ступеня, у 29 (28,71 %) – середнього ступеня, а у 20 (19,80 %) хворих – тяжкого ступеня.

Вивчення даних анамнезу дозволило встановити, що у 70,30 % дітей спостерігався обтяжений спадковий анамнез, а у третини хворих (29,70 %) не виявлялося схильності до atopії серед родичів. У більшості пацієнтів (54,93 %) спостерігалось успадкування по материнській лінії, причому у 71,79% випадків у матері або її родичів діагностована БА. Це збігається з положеннями GINA-2015, яка акцентує увагу на високій значимості саме обтяженості алергоанамнезу по материнській лінії. З дещо меншою частотою траплялося успадкування по батьківській лінії (28,17 %), у той же час БА в даному випадку виявлялася майже у 95,00 % випадків. Обтяжена спадковість по обох лініях виявлена серед 6 (8,45 %) дітей та в такої самої кількості серед сибсів (рис. 1).

Проаналізувавши взаємозв'язок особливостей успадкування та тяжкості перебігу БА (табл. 1) засвідчено переважання при інтермітуючому і персистувальному перебігу саме обтяженого анамнезу по материнській лінії. Зіставляючи дані обтяженого алергоанамнезу в родині встановили, що при інтермітуючому перебігу суттєво переважає обтяжений материнський анамнез (41,38 %), а при персистувальному перебігу він теж домінував (37,50 %), однак зростала частота наявної алергічної патології по батьківській лінії (22,22 %). Можливо, цей факт і впливає на несприятливий перебіг хвороби, а саме більш тяжкий клінічно. При тяжкому ступеню перебігу БА успадкування по материнській лінії траплялося у кожній другій дитині. При середньотяжкому перебігу БА обтяжений анамнез по материнській та бать-

ківській лінії діагностовано майже з однаковою частотою (відповідно: 27,59 % та 31,03 %). Успадкування по обох лініях спостерігалось при інтермітуючому перебігу (13,79 %) та у 6,30 % випадків при середньотяжкому персистувальному перебігу. Наявність БА серед сибсів виявлено з однаковою частотою незалежно від тяжкості перебігу. Відсутність алергічних захворювань серед родичів спостерігалась практично рівномірно, незалежно від тяжкості перебігу БА.

Досліджуючи час дебюту БА залежно від гендерних особливостей, вдалося встановити, що в осіб чоловічої статі симптоми бронхообструкції виникали вже в ранньому віці майже в кожного другого пацієнта (47,89 %), з дещо меншою частотою - у дошкільному та молодшому шкільному віці (відповідно: у 28,17 % та 23,94 % випадків). Серед осіб жіночої статі БА також частіше дебютувала в ранньому віці (у 40,00 % дітей), та дещо рідше в дошкільному (33,33 %) та молодшому шкільному вікових періодах (26,67 %).

В осіб чоловічої статі обтяжений спадковий анамнез спостерігався у 69,01 % дітей, при тому серед даної групи вперше симптоми бронхообструкції виникали у 48,98 % випадків вже в ранньому віці, у 28,57 % - у дошкільному віці та у 22,45 % - у молодшому шкільному віці. Наявність успадкування БА серед осіб жіночої статі частіше траплялася (у 73,33 %), дебют захворювання здебільшого припадав на ранній вік (45,46 %), з меншою частотою на дошкільний (27,27 %) та молодший шкільний період (27,27 %). Виникнення перших симптомів БА серед дітей з обтяженою спадковістю по материнській лінії спостерігалась як серед хлопчиків, так і дівчаток найчастіше в ранньому віці (відповідно: 51,85 % і 58,33 %). У дітей з обтяженим анамнезом по батьківській лінії незалежно від гендерних особливостей БА майже з однаковою частотою дебютувала в різних вікових періодах. Що стосується пацієнтів із необтяженим анамнезом, то у хлопчиків БА частіше виникала в ранньому віці (45,45 %), у дівчаток – у дошкільному віці (50,00 %).

Аналізуючи особливості виникнення БА серед обстежених хворих залежно від вікових аспектів, то при успадкуванні БА по материнській

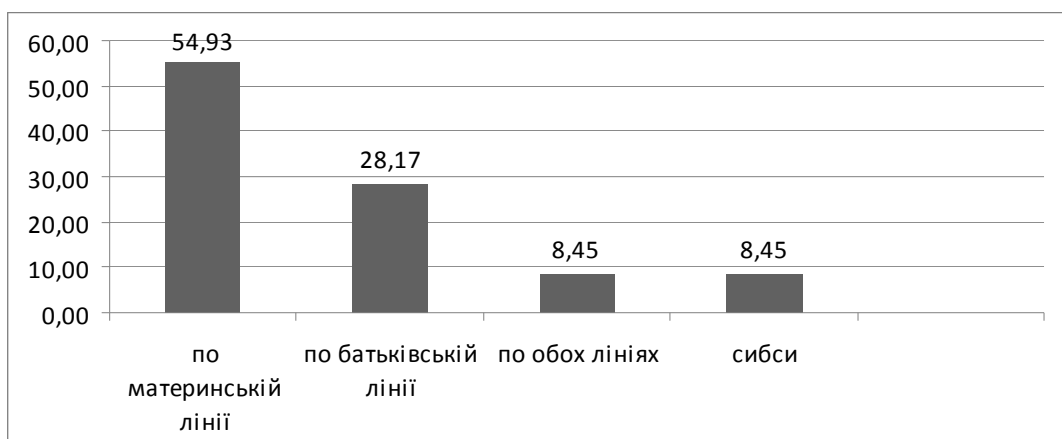


Рис. 1. Частота та структура обтяженого спадкового анамнезу у хворих із бронхіальною астмою

Таблиця 1

Розподіл пацієнтів із обтяженим генетичним анамнезом залежно від тяжкості перебігу бронхіальної астми

Перебіг захворювання		Успадкування		По материнській лінії (n=39)		По батьківській лінії (n=20)		По обох лініях (n=6)		Сибси (n=6)		Не обтяжений (n=30)	
		абс	%	абс	%	абс	%	Абс	%	абс	%		
Інтермітуючий (n=29)		12	41,38	4	13,79	4	13,79	2	6,90	7	24,14		
Персистувальний (n=72)	легкого ступеня (n=23)	9	39,13	6	26,09	-	-	1	4,35	7	30,43		
	середнього ступеня (n=29)	8	27,59	9	31,03	2	6,90	2	6,90	8	27,58		
	тяжкого ступеня (n=20)	10	50,00	1	5,00	-	-	1	5,00	8	40,00		

Таблиця 2

Дебют бронхіальної астми у пацієнтів із різними варіантами спадкового анамнезу

Обтяженість	По материнській лінії (n=39)		По батьківській лінії (n=20)		По обох лініях (n=6)		Сибси (n=6)		Не обтяжений (n=30)	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Вік дебюту										
Ранній вік (n=46)	21	53,85	8	40,00	2	33,33	3	50,00	12	40,00
Дошкільний вік (n=30)	7	17,95	7	35,00	3	50,00	3	50,00	10	33,33
Молодший шкільний вік (n=25)	11	28,21	5	25,00	1	16,67	-	-	8	26,67

Таблиця 3

Поліморфізм гена TNF α в локусі G308A залежно від тяжкості перебігу бронхіальної астми

Ступінь тяжкості	Генотип GG (n=69)		Генотип GA (n=29)		Генотип AA (n=3)	
	абс	%	абс	%	абс	%
Інтермітуючий (n=29)	20	68,97	8	27,59	1	3,44
Легкий (n=23)	16	69,57	6	26,09	1	4,35
Середній (n=29)	19	65,52	9	31,03	1	3,45
Тяжкий (n=20)	14	70,00	6	30,00	-	-

кій лінії бронхообструктивний синдром дебютує вже в ранньому віці в кожній другій дитині (табл. 2). За наявності обтяженого анамнезу по батьківській лінії, перші симптоми БА частіше виникали в ранньому та дошкільному віці. При успадкуванні БА по обох лініях у половині дітей симптоми дебютували в дошкільному віці, однак мала кількість таких пацієнтів не дає підстав узагальнювати.

Викликав неабиякий інтерес як зіставляються дані обтяженого анамнезу зі станом генетично зумовленої активності запальних цитокінів, а

тому був досліджений генотип TNF α у обстежених. Вивчаючи генотипові особливості даних пацієнтів, вдалося встановити переважання G/G (68,32%) генотипу, у значно меншій кількості – G/A (28,71 %) і у 3 (2,97 %) пацієнтів A/A поліморфний варіант.

У пацієнтів з успадкуванням по материнській лінії, де родичі хворіли на БА, а також серед осіб з наявністю БА по батьківській лінії (рис.2) найчастіше траплявся G/G генотип (відповідно: 75,00 % та 73,68 %) та значно рідше G/A полі-

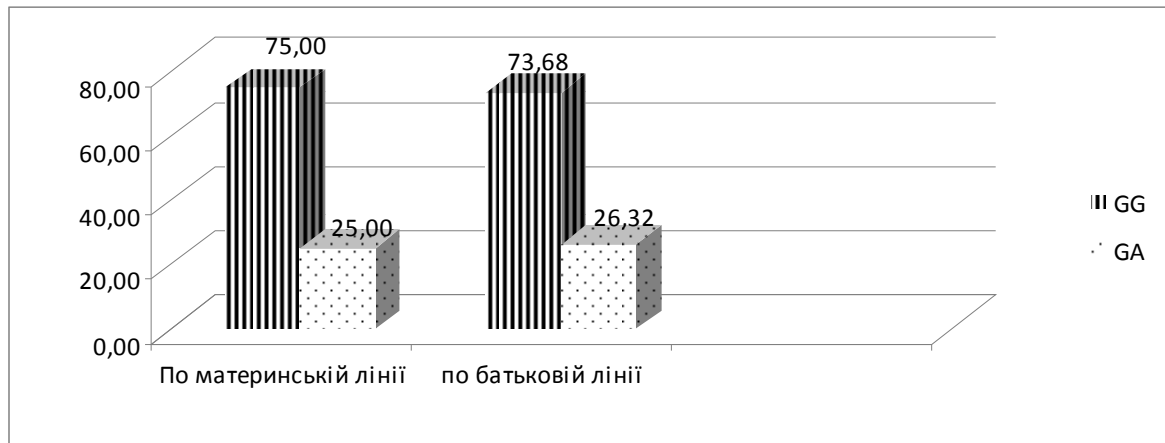


Рис. 2. Особливості генотипу залежно від наявності бронхіальної астми серед родичів

Таблиця 4

Поліморфізм гена TNF_{α} в локусі G308A залежно від дебюту бронхіальної астми

Генотип	GG (n=69)		GA (n=29)		AA (n=3)	
	абс	%	Абс	%	абс	%
Ранній вік (n=46)	32	69,57	13	28,26	1	2,17
Дошкільний вік (n=30)	20	66,67	9	30,00	1	3,33
Молодший шкільний вік (n=25)	17	68,00	7	28,00	1	4,00

морфний варіант заміни G308A TNF_{α} (відповідно: у 25,00 % та 26,32 %).

Оцінка взаємозв'язку тяжкості перебігу БА та генотипу з'ясувала, що при інтермітуючому перебігу переважав G/G (68,97 %) генотип, у кожній третій дитини (27,59 %) – G/A поліморфний варіант заміни G308A TNF_{α} . Така ж закономірність гомозиготи по основному алелю G/G простежується і серед пацієнтів із персистувальним перебігом (табл. 3). Гетерозиготний варіант G/A діагностований практично з однаковою частотою при інтермітуючому та персистувальному перебігу.

Гомозиготи за мінорним алелем (A/A) виявлені в поодиноких випадках, незалежно від тяжкості перебігу БА. Низька поширеність генотипу A/A TNF_{α} в локусі G308A відмічена результатами інших досліджень [2], що свідчить про відсутність зв'язку виникнення БА у дітей з генотипом A/A в позиції 308 TNF_{α} (рис. 2).

Таке ж домінування генотипів простежується і при різних вікових аспектах появи перших ознак бронхообструктивного синдрому в дітей (табл. 4).

Вивчаючи генотипові особливості заміни G308A TNF_{α} залежно від гендерних особливостей та тяжкості перебігу вдалося встановити, що гомозиготний варіант по основному алелю (G/G) переважав (66,19 %) у хлопчиків незалежно від тяжкості перебігу БА. Серед дівчаток гомозиготний по основному алелю (G/G) був також домінуючим (73,33 %), особливо при персистувальному перебігу хвороби. Гетерозиготний варіант G/A гена G308A TNF_{α} у пацієнтів із БА встановлений у хлопчиків (29,58 %) та дівчаток (26,67 %) практично з однаковою частотою, а гомозиготний варіант за мінорним алелем (A/A) виявлений в окремих випадках осіб чоловічої статі (4,22 %), у дівчаток – не діагностований у жодному разі.

Наступними аналізу піддалися випадки БА, яка мала різні варіанти розвитку. А саме, у пацієнтів із БА, що була результатом еволюції алергічного маршу діагностований домінуючий генотип G/G TNF_{α} G308A (34,78 %) та в кожній четвертій дитини G/A генотип. У пацієнтів, в яких БА поєднувалася з іншими проявами системної алергії (алергічний риносинусит, atopічний дерматит та інші) домінуючим був генотип G/G (63,64 %), з меншою частотою траплявся гетерозиготний варіант G/A (32,73 %). БА, яка виникала в дітей, як перша і єдина форма алергічної патології, асоціювалася із гомозиготним варіантом G/G за основним алелем TNF_{α} G308A (76,92 %). Привертає увагу і те, що гомозиготний варіант A/A за мінорним алелем діагностувався лише в поодиноких випадках (2,97 %) за наявності в пацієнта декількох форм atopії в анамнезі або наявних.

Висновки

1. Вивчення поліморфізму гена TNF_{α} G308A у дітей із бронхіальною астмою встановило, що домінуючим є гомозиготний варіант G/G за основним алелем незалежно від тяжкості перебігу

хвороби, дебюту астми та статі пацієнта. Обтяженість алергоанамнезу по материнській та батьківській лінії у хворих дітей відповідала генотипу G/G, що утричі частіше виявлений, ніж гетерозиготний варіант G/A.

2. Діагностична цінність визначення гомозиготи за основним алелем G/G TNF α G308A, яка є істотно превалюючою незалежно від клінічного варіанта бронхіальної астми (монопатологія, еволюція atopічного маршу, комбінована системна алергія), дозволяє розглядати даний метод молекулярно-генетичного аналізу, як ефективний маркер реалізації алергічної патології.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати надають можливості для розробки сучасних методів первинної та вторинної профілактики БА у дітей з обтяженим генетичним анамнезом.

Література

1. Банадига Н.В. Роль фенотипових та генотипових ознак у перебігу бронхіальної астми у дітей / Н.В. Банадига, С.Б. Волошин // *Соврем. педиатрия*. – 2016. – № 4. – С. 62-66.
2. Врублевская С.В. Полиморфизм сывороточного TNF α у детей с atopическими заболеваниями / С.В. Врублевская, А.М. Камышный // *Wschodnieos-uropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal)*. – 2016. – № 7. – С. 28-36.
3. Кайдашев И.П. Т-клеточная регуляция при atopических заболеваниях / И.П. Кайдашев // *Клин. иммунол. Аллергология. Инфектология*. – 2011. – № 9-10. – С. 18-21.
4. Охотникова Е.Н. «Аллергический марш»: связь поколений и эскалация аллергии у детей / Е.Н. Охотникова // *Клин. иммунол. Аллергология. Инфектология*. – 2008. – № 4(15). – С. 7-15.
5. Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при бронхіальній астмі: наказ МОЗ України №868 від 08.10.2013 р. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.moz.gov.ua>. – Назва з екрану.
6. Пузырева В.П. Генетика бронхолегочных заболеваний: монография / Под ред. В.П. Пузырева, Л.М. Огородовой (гл. ред. серии А.Г. Чучалин). – М.: Холдинг «Атмосфера», 2010. – 160 с.
7. Чернышова О.Е. Современные представления о патогенезе бронхиальной астмы / О.Е. Чернышова, Е.И. Юлиш // *Соврем. педиатрия*. – 2010. – № 2 (30). – С. 67-71.
8. Aggarwal B. Cytokines: from clone to clinic / B. Aggarwal, E. Pocsik // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2012. – Vol. 292. – P. 335-345.
9. Association of TNF α with severe respiratory syncytial virus infection and bronchial asthma / B. Puthothu, S. Bierbaum, M. Kopp [et al.] // *Pediatr. Allergy Immunol.* – 2009. – Vol. 20. – P. 157-63.
10. Banadyha N.V. The investigation of gene polymorphism β 2-adrenoceptors in children with bronchial asthma / N.V. Banadyha, S.B. Voloshyn // *J. of Education, Health and Sport*. – 2015. – № 5 (12). – P. 417-423.
11. Cytokine gene polymorphism and asthma susceptibility, progress and control level / S. Daneshmandi, A.A. Pourfathollah, Z. Pourpak [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. – Vol. 39, № 2. – P. 1845-53.
12. Global Initiative for Asthma (GINA) A pocket guide for asthma management and prevention (for adults and children older than 5 years) 2015 [Electronic resource]. – URL : <http://www.ginasthma.com>. – Title from screen.
13. Investigation of TNF-alpha gene (G308A) and GSTP1 gene (Ile105Val) polymorphisms in Turkish patients with retinopathy of prematurity / M. Ture, M. Yildiz, M. Karkucak [et al.] // *Turk. J. Med. Sci.* – 2015. – Vol. 45. – P. 164-169.

РОЛЬ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ И ПОЛИМОРФИЗМА G308A ГЕНА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ АЛЬФА У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Н.В. Банадыга, С.Б. Волошин

Резюме. Изучены особенности течения бронхиальной астмы у больных с различными генотипами полиморфизма гена G308A TNF α в зависимости от наследственного анамнеза, тяжести течения, стадии заболевания и пола. Установлено, что у детей доминирующим является гомозиготный вариант G/G по основной аллели, значительно реже встречается гетерозиготный вариант G/A (28,71 %) TNF α G308A. Решающую роль в реализации заболевания предостоят наличие отягощенного наследственного анамнеза, в частности по материнской линии, с генотипом G/G TNF α G308A.

Ключевые слова: бронхиальная астма, полиморфизм генов, наследственность.

THE ROLE OF HEREDITY AND GENE G308A POLYMORPHISM OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA

N.V. Banadyha, S.B. Voloshyn

Abstract. Peculiarities of bronchial asthma in patients with different genotypes of the G308A polymorphism of the TNF α gene, depending on genetic history, severity, stage of disease and gender have been studied. It was established that the dominant homozygote variant in children was G/G for the primary alleles, much less common was heterozygous variant G/A (28,71 %) TNF α G308A. A crucial role in the implementation of the disease has the presence of the burdened hereditary anamnesis, particularly through the maternal line, with genotype G/G TNF α G308A.

Key words: bronchial asthma, genetic polymorphism, inheritance.

I.Horbachevsky Ternopil State Medical University of Ministry of Health of Ukraine (Ternopil)

Рецензент – проф. О.К. Колоскова

Buk. Med. Herald. – 2016. – Vol. 20, № 4 (80). – P. 12-16

Надійшла до редакції 18.06.2016 року