

УДК 616-053.32-056.7

О.М. Ковальова*,
В.І. Похилько*, З.І. Россоха**,
О.О. Калюжка*,
Ю.О. Гончарова***

ВДНЗ України «Українська медична
стоматологічна академія»
(Україна м. Полтава,)*
Референс-центр з молекулярної діагностики
МОЗ України,
Національна медична академія
післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика
(Україна м. Київ,)**
Полтавська обласна дитяча клінічна лікарня
(Україна м.Полтава)***

ЧИ ВПЛИВАЄ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* НА ПЕРЕБІГ ЗАХВОРЮВАНЬ СИСТЕМИ ДИХАННЯ У ПЕРЕДЧАСНО НАРОДЖЕНИХ ДІТЕЙ?

Ключові слова: гени, поліморфізм,
передчасно народжені діти.

Резюме. В статті наведені результати визначення асоціації між наявністю поліморфних генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* та перебігом захворювань органів дихання у передчасно народжених новонароджених. В результаті проведеного дослідження виявлено достовірно більшу частоту розвитку пневмоній у дітей з поліморфним генотипом гену *GSTP1*, ніж серед дітей з генотипом AA гену *GSTP1*. Наявність певних поліморфних варіантів генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* у недоношених новонароджених достовірно підвищує відносний ризик потреби застосування респіраторної підтримки при розвитку у них критичних станів в неонатальному періоді.

Вступ

На сьогодні ідентифіковано широкий спектр детермінант розвитку легеневої функції у дітей [1]: низький гестаційний вік, мала маса при народженні, інфекції в ранньому дитинстві, астма та пасивне паління [2]. З точки зору генетичних детермінант, то на розвиток респіраторних функцій впливають гени родини глутатион-S-трансфераз (GST), епоксидні гідролази та α 1-антитрипсін ген [3]. Серед них локуси глутатион-S-трансферази мають найбільші функціональні алельні варіанти [4].

Зважаючи на те, що гени *GSTM1*, *GSTT1* та *GSTP1* експресуються в легенях, включаються в антиоксидантні захисні механізми і мають найбільші функціональні варіанти алелей [5], дослідження їх поліморфізму у новонароджених, які лікуються у ВІТ, є актуальними.

Мета дослідження

Визначити асоціації між наявністю поліморфних генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* та перебігом захворювань органів дихання у передчасно народжених новонароджених.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідження включені передчаснонароджені діти (n=120) з гестаційним віком від 27 тижнів до 36

тижнів, масою при народженні від 750 г до 2500 г, які лікувалися у відділеннях інтенсивної терапії новонароджених (ВІТН) лікувальних закладів Полтавської області упродовж 2009-2010 рр. Усі діти були розділені на групи залежно від виду генотипу генів *GSTM1*, *GSTT1* та *GSTP1* (рис.1). До групи дітей з поліморфними генами були віднесені діти з генотипом *GSTT1* « - », генотипом *GSTM1* « - » та з генотипами *AG* або *GG* гену *GSTP1* (рис.1).

Аналіз делеційного поліморфізму генів *GSTT1*, *GSTM1* проводили з використанням мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції. Для визначення поліморфних варіантів *A313G* 5 екзону гена *GSTP1* також проводили полімеразну ланцюгову реакцію з подальшим рестрикційним аналізом продуктів реакції ампліфікації. Детекцію продуктів полімеразної ланцюгової реакції та рестрикційного аналізу проводили в агарозному гелі. Ампліфікацію виділеної ДНК проводили в реакційній суміші за М. Arand [6]. Ампліфіковані фрагменти розподіляли з використанням горизонтального електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі із забарвленням бромистим етидієм

Для визначення зв'язку між вказаними генотипами зазначених генів та потребою дитини у медичних втручаннях використовували розрахунки відносних ризиків

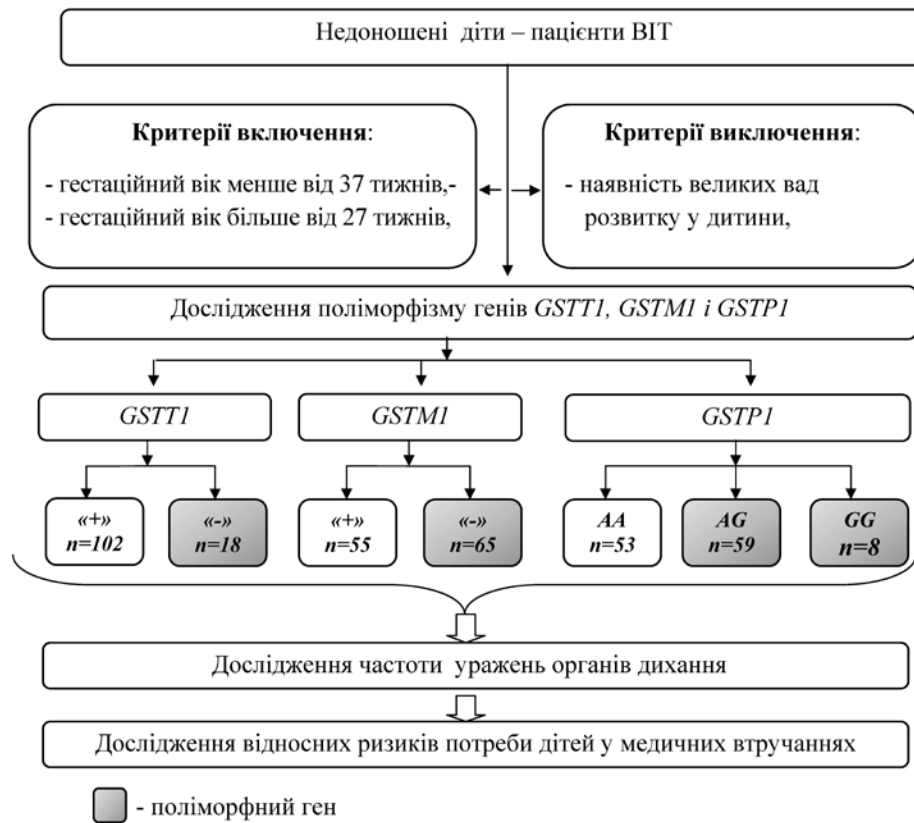


Рис. 1. Дизайн дослідження

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження показало, що з усієї обстеженої когорти (n=120) немовлят 15,0 % (n=18) мали делеційний поліморфізм гена *GSTT1*, 54,2 % (n=65) – делеційний поліморфізм гена *GSTM1*, 49,17 % (n=59) – AG генотип та 6,67 % (n=8) – GG генотип гена *GSTP1*. У роботі вітчизняних учених, присвячених дослідженню поліморфізму зазначених генів у здоровій популяції новонароджених показано, що частота делеційного поліморфізму гена *GSTT1* має місце у $20,0 \pm 6,32$ % дітей, а гена *GSTM1* – у $47,5 \pm 7,9$ % дітей [7]. Подібні дані висвітлюють і іноземні вчені, зокрема у роботі D. Frank показано, що в обстеженій когорті американських школярів молодшого віку делеційний поліморфізм гена *GSTT1* виявлений у 22,1 % дітей, делеційний поліморфізм гену *GSTM1* – у 43 % дітей, а GG генотип гена *GSTP1* – у 13,7 % дітей [8]. Таким чином, наведені дані свідчать про відсутність генетичної зумовленості госпіталізації передчасно народжених у ВІТН.

Серед обстежених новонароджених не було виявлено вірогідної різниці у розподілі досліджуваних генотипів в залежності від їх статі та від місця проживання батьків (місто або село). При проведенні порівняння інших базових характеристик не було виявлено впливу поліморфних варіантів генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* на скорочення терміну гестації та зниження маси дітей при народженні (табл. 1).

Результати проведеного дослідження показали, що частота розвитку РДС та пневмонії у дітей з делеційним поліморфізмом *GSTT1* та *GSTM1* достовірно не відрізнялась від частоти розвитку вказаних патологій у дітей з функціональними алелями (табл. 2). У той же час виявлено достовірно більшу частоту розвитку пневмоній у дітей з поліморфним генотипом гену *GSTP1*, ніж серед дітей з генотипом AA гену *GSTP1*.

У зв'язку з виявленими нами асоціаціями між розвитком пневмонії та досліджуваними варіаціями генів *GSTT1*, *GSTM1* та *GSTP1*, ми вважали за доцільне оцінити вплив поліморфних варіантів генів сімейства *GSTs* на розвиток органних дисфункцій у дітей та виникаючу внаслідок цього потребу в респіраторній підтримці. Розрахунки відносних ризиків щодо ймовірного перебігу неонатальних захворювань і, відповідно, застосування більш агресивних технологій лікування показало (табл. 3), що наявність генотипу *GSTT1* «-» достовірно збільшує ймовірність застосування у дитини СРАР-терапії. Що стосується гену *GSTP1*, то його AG генотип достовірно збільшує ймовірність застосування у дитини кисневої підтримки, GG генотип застосування ШВЛ та кисневої підтримки. Крім того, результати дослідження показали, що тривалість ШВЛ у дітей з поліморфним GG *GSTP1* генотипом була достовірно більшою, ніж у дітей з генотипами AG і AA (рис.2).

Таблиця 1

Базові характеристики обстежених дітей, стратифікованих відповідно до генотипів *GSTs* генів

Базові характеристики	Генотипи <i>GSTT1</i>		Генотипи <i>GSTM1</i>		Генотипи <i>GSTP1</i>		
	<i>GSTT1</i> «+» (n=102)	<i>GSTT1</i> «-» (n=18)	<i>GSTM1</i> «+» (n=55)	<i>GSTM1</i> «-» (n=65)	AA (n=53)	AG (n=59)	GG (n=8)
Гестаційний вік у тижнях, (М/95 %ДІ)	30,8/ 30,2–31,4	30,7/ 29,3–32,1	31,0/ 30,1–31,9	30,6/ 29,9–31,4	30,9/ 30,1– 31,8	30,9/ 30,0–31,7	29,3/ 27,1– 31,5
Маса при народженні в грамах, (М/95 %ДІ)	1612,0/ 1503,5– 1720,4	1386,1/ 1148,4– 1623,9	1608,4/ 1463,9– 1753,0	1552,4/ 1414,5– 1690,2	1583,8/ 1434,8– 1732,8	1591,8/ 1444,6– 1739,1	1438,8/ 1127,2– 1750,3
Стать, % / (n [жіноча/ чоловіча])	42,2 (43/59)	50 (9/9)	38,2 (21/34)	47,7 (31/34)	37,7/ (20/33)	45,8/ (27/32)	62,5*/ (5/3)
Місце проживання батьків, % (n [місто/село])	39,2/ (40/62)	50,0/ (9/9)	40,0/ (22/33)	41,5/ (27/38)	34,0/ (18/35)	45,8/ (27/32)	50,0*/ (4/4)

* $p < 0,05$ відносно дітей з генотипом AA гену *GSTP1*

Таблиця 2

Частота захворювань у передчаснонароджених дітей, стратифікованих відповідно до генотипів *GSTs* генів

Показники, що характеризують перебіг вагітності та пологів у матерів	Генотипи <i>GSTT1</i>		Генотипи <i>GSTM1</i>		Генотипи <i>GSTP1</i>		
	<i>GSTT1</i> «+» (n=102)	<i>GSTT1</i> «-» (n=18)	<i>GSTM1</i> «+» (n=55)	<i>GSTM1</i> «-» (n=65)	AA (n=53)	AG (n=59)	GG (n=8)
Пневмонія, % / (n [так/ні])	6,9/ (7/95)	16,7/ (3/15)	10,9/ (6/49)	6,2/ (4/61)	3,8/ (2/51)	11,9*/ (7/52)	12,5*/ (1/7)
РДС III –IV ст., % / (n [так/ні])	20,6/ (21/81)	27,8/ (5/13)	21,8/ (12/43)	21,5/ (14/51)	24,5/ (13/40)	18,6/ (11/48)	25,0/ (2/6)

Примітка. * $p < 0,05$ порівняно з групою дітей із генотипом AA гена *GSTP1*;

Таблиця 3

Зв'язок між генотипами недоношених дітей та потребою їх у застосуванні респіраторної підтримки, ВР (95 % ДІ)

Типи генотипів	Потреба у ШВЛ	Потреба у CPAP-терапії	Потреба у кисневій підтримці
<i>GSTT1</i> «-»	1,142(0,937–1,346)	1,478*(1,214–1,743)	1,06(0,908–1,304)
<i>GSTM1</i> «-»	1,088(0,893–1,283)	0,790(0,648–0,931)	1,13(0,926–1,33)
<i>GSTP1</i> AG	1,186 (0,974:1,398)	0,834(0,685:0,983)	1,347* (1,106:1,589)
<i>GSTP1</i> GG	1,59* (1,306–1,874)	0,946(0,777–1,116)	1,47* (1,209–1,736)

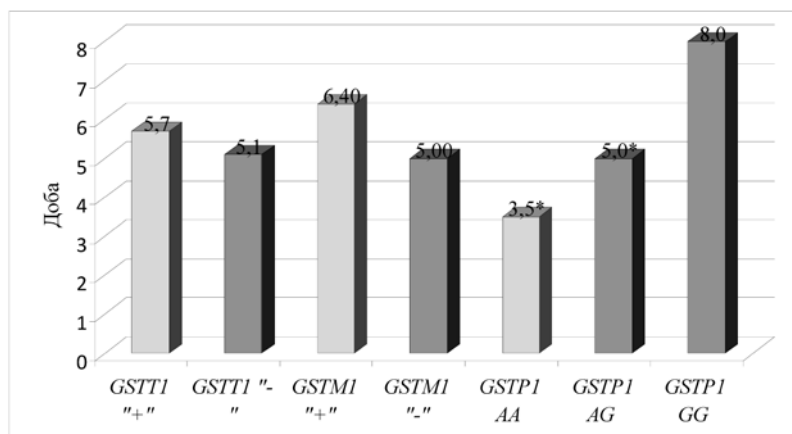
Примітка. * – $p < 0,05$ 

Рис. 2. Тривалість штучної вентиляції легень у дітей обстежених груп

* $p < 0,05$ відносно генотипу GG *GSTP1*

Висновки

Доведено, що у недоношених новонароджених розвиток пневмонії асоційований з наявністю у них генотипу AG гену *GSTP1*.

Показано, що наявність певних поліморфних варіантів генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* у недоношених новонароджених вірогідно підвищує відносний ризик потреби застосування респіраторної підтримки при розвитку у них критичних станів в неонатальному періоді.

Запровадження молекулярно-генетичного дослідження генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* у ново-

народжених, які лікуються у неонатальних ВІТ, дозволить виявляти немовлят з ризиком розвитку критичних станів, органних дисфункцій та підвищеною потребою у застосуванні респіраторної підтримки.

Перспективи подальшої діяльності.

Запровадження молекулярно-генетичного дослідження генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* у новонароджених надасть можливість спрогнозувати ризики розвитку критичних станів у немовлят відділень інтенсивної терапії буде сприяти покращенню результатів їх лікування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Maternal smoking during pregnancy, environmental tobacco smoke exposure and childhood lung function / F. D. Gilliland, K. Berhane, McConnell [et al.] // *Thorax*. – 2000. – Vol. 55. – P. 271-276.
2. Das P. Meta-analysis study of glutathione-S-transferases (*GSTM1*, *GSTP1*, and *GSTT1*) gene polymorphisms and risk of acute myeloid leukemia / P. Das, A. P. Shaik, V. K. Bammidi // *Leuk. Lymphoma*. – 2009. – Vol. 50, № 8. – P. 1345-1351.
3. Shaheen S. O. Do lower respiratory tract infections in early childhood cause chronic obstructive pulmonary disease? / S. O. Shaheen, D. J. Barker, S. T. Holgate // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. – 1995. – Vol. 151. – P. 1649-1651.
4. Hayes J. D. Glutathione-S-transferase polymorphisms and their biological consequences / J. D. Hayes, R. C. Strange // *Pharmacology*. – 2000. – Vol. 61. – P. 154-166.
5. 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.
6. A Multiplex Polymerase Chain Reaction Protocol for the Simultaneous Analysis of the Glutathione S-Transferase *GSTM1* and *GSTT1* Polymorphisms / M. Arand, R. Muhlbauer, J. Hengstler [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 1996. – № 236. – P. 184-186.
7. Аналіз поліморфізму генів *GSTT1*, *GSTM1* у новонароджених, які перенесли перинатальну асфіксію / Т. К. Знаменська, Н. Г. Горovenko, В. І. Похилько [та ін.] // *Педіатрія, акушерство та гінекологія*. – 2009. – Т. 71, № 5. – С. 28-29.
8. Effects of Glutathione-S-Transferase M1, T1, and P1 on Childhood Lung Function Growth / D. Frank, W. Gilliland, J. Gauderman [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2002. – Vol 166. – P. 710-716.

ВЛИЯЕТ ЛИ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* НА ХОД ЗАБОЛЕВАНИЙ СИСТЕМЫ ДЫХАНИЯ У ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ?

Е. М. Ковалева, В. И. Похилько, З. И. Россоха, Е. А. Калиужка, Ю. А. Гончарова

ВГУЗ Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия»
(г. Полтава, Украина)*
Референс-центр молекулярной диагностики МОЗ Украины
Национальная медицинская академия
последипломного образования им. П. Л. Шупика
(г. Киев, Украина)**,
Полтавская областная детская клиническая больница
(г. Полтава, Украина)***

Резюме. В статье приведены результаты определения ассоциации между наличием полиморфных генотипов *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* и ходом заболеваний органов дыхания в преждевременно рожденных новорожденных. В результате проведенного исследования обнаружена достоверно большая частота развития пневмоний у детей с полиморфным генотипом гена *GSTP1*, чем среди новорожденных с генотипом AA гена *GSTP1*. Наличие определенных полиморфных вариантов генотипов *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* у недоношенных новорожденных достоверно повышает относительный риск потребности применения респираторной поддержки при развитии у них критических состояний в неонатальном периоде.

Ключевые слова: гены, полиморфизм, преждевременно рожденные дети.

DOES *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* GENE POLYMORPHISM HAS INFLUENCE ON THE COURSE OF RESPIRATORY DISEASES IN PRETERM INFANTS?

*Kovaliova Ye. M. *, Pokhylko V. I. *, Rossokha Z. I. **, Kaliuzhka Ye. A. *, Honcharova Yu. A. ****

Ukrainian Stomatology Academy
(Poltava, Ukraine)*,
Reference-centre for molecular diagnostic,
Ministry of Public Health of Ukraine,
National Medical Academy for Post-graduate Education
the namd after P. L. Shupik (Kiev, Ukraine)**,
Poltava regional child's clinical hospital
(Poltava, Ukraine)***

Summary. This work presents the results which show the association between the presence of *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* polymorphic genes and the duration of respiratory organ diseases in preterm neonates. The research has allowed to ascertain reliably higher incidence rate of pneumonia in children with polymorphic genotype of *GSTP1* gene than in neonates with AA genotype of *GSTP1* gene. The presence of certain polymorphic variants of *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* in preterm neonates reliably increases the relative risk of respiratory symptoms which may result on the development of critical states during neonatal period, when respiratory support is required.

Key words: gene, polymorphism, preterm neonates.

Рецензент: Завідувач кафедри педіатрії №2
Тернопільського державного медичного університету
ім. І. Я. Горбачевського д. мед. н., професор Павлишин Г. А.