© Е. А. Шаповалова, О. Н. Аржанова,
Т. Э. Иващенко, О. В. Лаврова,
Д. С. Чистякова, В. С. Баранов

ГУ НИИ акушерства и гинекологии
им. Д. О. Отта РАМН, Санкт-Петербург,
Россия

ГУ НИИ Пульмонологии СПбГМУ
им. акад. И. П. Павлова

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОТИПОВ ПО ГЕНАМ СИСТЕМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН, БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

УДК 618.3-06:616.248-07

■ Алгоритм ведения беременных с бронхиальной астмой должен включать максимально раннюю постановку на учет у пульмонолога и акушера-гинеколога с индивидуальными мерами по вторичной профилактике бронхиальной астмы. Проведение адекватной базисной терапии бронхиальной астмы позволяет избежать ухудшения в течении этого заболевания, уменьшает частоту осложнений беременности. Ферменты системы детоксикации фазы 2 вовлечены в патогенез бронхиальной астмы. Эти данные открывают новые возможности и досимптоматического выявления лиц, подверженных заболеванию бронхиальной астмой. В частности, анализ генотипа детей, родившихся от матерей, больных бронхиальной астмой, позволяет выявить новорожденных с наследственной предрасположенностью к этому заболеванию и своевременно начать его профилактику.

■ **Ключевые слова:** бронхиальная астма; беременность; ферменты системы детоксикации; полиморфизм генов.

Введение

В последние два-три десятилетия распространенность бронхиальной астмы возросла, особенно среди детей и молодых людей. Заболеваемость аллергическими заболеваниями в Западной Европе достигает 25–30%, в отдельных регионах составляет 50–60%, в промышленных районах России заболеваемость достигает 15–35%.

Распространенность бронхиальной астмы в мире колеблется в пределах от 1 до 12,2%. Заболеваемость бронхиальной астмой увеличивается среди детей, подростков и взрослых, причем темпы роста заболеваемости бронхиальной астмой в детском и подростковом возрасте опережают рост таковой среди взрослых. Риск развития бронхиальной астмы у ребенка, если болен один из родителей, составляет 20–30%, если больны оба родителя, вероятность достигает 75% [3].

По мнению ряда авторов, за последние 25 лет число больных, имеющих симптомы бронхиальной астмы, увеличилось в 2 раза [4].

В структуре аллергических заболеваний в России преобладает бронхиальная астма, достигая 23–60% [1]. В среднем каждый третий гражданин России болен тем или иным аллергическим заболеванием, часто имеется сочетание нескольких аллергических болезней [2]. Известно, что риск развития бронхиальной астмы во многом определяется неблагоприятными генетическими факторами и, прежде всего, зависит от состояния генов системы детоксикации.

Цель исследования

Изучение связи течения бронхиальной астмы у беременных с функционально неблагоприятными наследственными вариантами генов системы детоксикации.

Материал и методы исследования

Обследовано 109 женщин с бронхиальной астмой в возрасте от 17 до 44 лет (средний возраст 27 лет). При постановке на учет в женской консультации все женщины направлялись к пульмонологу в НИИ пульмонологии, где проводилось комплексное клиничко-функциональное обследование. На основании результатов обследования уточнялся диагноз, степень тяжести, фаза течения заболевания. Для каждой больной индивидуально составлялся план профилактических и лечебных мероприятий, в дальнейшем больная находилась под наблюдением пульмонолога весь период беременности. Затем больная направлялась в ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, где также проводилось обследование больной, при наличии показаний назначалось лечение. В дальнейшем ведение осущест-

влялось совместно с акушером-гинекологом женской консультации. При необходимости больная госпитализировалась в отделение патологии беременности ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН.

Практически все больные (91%) страдали бронхиальной астмой аллергического генеза, у 4% женщин заболевание дебютировало в период беременности, у 65% отмечено легкое течение заболевания (у 34% — эпизодическое, у 32% — персистирующее), среднетяжелой бронхиальной астмой страдало 27% беременных и у 2 было тяжелое течение.

Все беременные были разделены на 2 группы. В первую группу вошли 62 (56,9%) беременные с поздней манифестацией заболевания (после 30 лет). Вторую группу составили 47 беременных (43,1%) с манифестацией заболевания до 30 лет.

Объектом молекулярно-генетического анализа были гены, ответственные за синтез ферментов фазы 2 детоксикации: глутатион-трансферазы GSTM1 и GSTT1 (5).

Частоты нулевых аллелей генов GSTM1, GSTT1 у 109 больных бронхиальной астмой и новорожденных исследованы методом полимеразной цепной реакции. Контрольную группу составили 90 здоровых доноров Северо-Западного региона России. Смесь для амплификации, объемом 25 мкл включала 15нМ каждого праймера, 67 мМ трис-НС1, рН 8,8, 16,6 мМ сульфата аммония, 6,7 мМ MgCl₂, 6,7 мкМ ЭДТА, 10мМ меркаптоэтанол, 170 мкг BSA, 1,0 мМ каждого dNTP и IU ДНК-полимеразы (производства «Бион», Москва). Для амплификации фрагмента генов GSTM1 и GSTT1 использовали следующие условия ПЦР: после денатурации (94°С, 7 мин.) проводили 32 цикла амплификации в режиме 94°С — 1 мин; 53°С — 1 мин; 72°С — 1 мин 20 сек. После амплификации анализировали продукты реакции в 7,0%-м полиакриламидном геле с последующей окраской этидиумбромидом и визуализацией в проходящем УФ-свете. Гомозигот и гетерозигот по нормальному аллелю «+» определяли на электрофореграммах наличием продукта амплификации размером 271 п. о. для GSTM1 и фрагмента 315 п. о. для GSTT1. Отсутствие соответствующих фрагментов указывало на гомозиготность индивидуума по делеции одного из генов. В качестве внутреннего контроля использовали амплификацию фрагмента гена CYP1A1. Для амплификации двух фрагментов гена GSTP1 использовали следующие условия ПЦР: после денатурации (94°С, 7 мин.) проводили 32 цикла амплификации в режиме: 94°С — 40 сек, 60°С — 40 сек, 72°С — 1 мин. После амплификации продукты ПЦР подвергались расщеплению с помощью специфич-

ческих эндонуклеаз Bso MA1 (праймеры GST p 1F и GST p 2 R) и BstFN1 (праймеры GST p 3F и GST p 4R) по прописям, рекомендованным фирмой-изготовителем рестриктаз в буфере, прилагаемом к ферменту. Продукты реакции анализировали в 7,0%-м полиакриламидном геле с последующей окраской этидиумбромидом и визуализацией в проходящем УФ-свете.

Результаты исследований

Нами проведено генетическое исследование и проанализированы течение беременности и родов. Угроза прерывания данной беременности наблюдалась у 56 больных бронхиальной астмой в обеих группах. Угрожающий выкидыш был у 36 беременных (33,0%). Угроза преждевременных родов отмечена у 20 женщин (18,3%). В первой группе с этим осложнением госпитализировано 35 женщин (32,1%), из второй группы 21 больная (19,3%). Частота гестозов во второй группе была достоверно ниже, чем в первой группе (23,8 и 53,8% соответственно, $p < 0,01$). Хроническая плацентарная недостаточность диагностирована всего у 9 женщин (8,2%), причем частота хронической плацентарной недостаточности составила 3% во второй и 8,5% в первой группе ($p < 0,05$).

У 109 женщин роды произошли в ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН. Из них 108 родов — срочные (99,1%), преждевременные роды наблюдались у 1 женщины из первой группы. У 92 женщин роды проведены через естественные родовые пути (84,4%), 17 женщин родоразрешены путем операции кесарева сечения (15,6%), из них по показаниям со стороны матери — 10, со стороны плода — 1, по совокупности показаний — 6. Имело место преждевременное излитие околоплодных вод у 20 женщин (18,3%), у 6 — раннее излитие вод (5,5%). Слабость родовой деятельности наблюдалась у 3 женщин (2,7%), быстрые роды в 2 случаях (1,8%). Других аномалий родовой деятельности не наблюдалось. Частота и характер осложнений во время родов у женщин 1-й и 2-й группы существенно не различались.

Масса детей при рождении составила от 2460 до 4310 г. Оценка по шкале Апгар у 107 новорожденных составила 7–8 баллов, один ребенок родился в асфиксии легкой степени и один в асфиксии средней степени тяжести (при преждевременных родах). Все родильницы выписаны на 4–8 сутки, осложнения выявлены в 2 случаях (1,8%) в виде субинволюции матки.

Проведенное генетическое исследование показало, что у всех больных бронхиальной астмой частота гомозигот GSTM1 0/0 превышает популяционный уровень в два раза и составляет 75,6% ($\chi^2 = 18,9$; $p < 0,001$).

Относительный риск развития заболевания (OR) у гомозиготных носителей нулевого аллеля GSTM1 повышается в 4,5 раза. При анализе делеции гена GSTT1 также выявлено статистически достоверное повышение частоты гомозигот по нулевому аллелю GSTT1 у пациентов с бронхиальной астмой — 72,1% ($\chi^2 = 36,4$; $p < 0,001$), тогда как в популяции Северо-Западного региона России генотип GSTT10/0 встречался с частотой 22,7%. Относительный риск развития заболевания у гомозиготных носителей нулевого аллеля гена GSTT1 повышается в 8,8 раза. Нами также показано, что 90% пациентов с бронхиальной астмой имеют делецию хотя бы в одном из изученных генов.

В зависимости от генотипа все пациенты как основной, так и контрольной групп были разделены на 4 подгруппы: 1 — генотипы GSTM1+, GSTT1+; 2 — генотипы GSTM10/0, GSTT1+; 3 — генотипы GSTM1+, GSTT1 0/0 и 4 — генотипы GSTM10/0; GSTT10/0.

Как следует из полученных данных, у пациентов с бронхиальной астмой соотношение генотипов глутатион-S-трансфераз достоверно отличается от такового в популяции. В частности, показано, что у больных бронхиальной астмой генотип GSTM1+, GSTT1+ встречается с частотой 9,3%, тогда как в группе здоровых такой генотип зарегистрирован в 45,5% случаев ($\chi^2 = 26,0$; $p < 0,001$). Частота GSTM1 0/0, GSTT1 0/0 среди больных составила 57,0% и почти в 6 раз превысила таковую в контрольной группе ($\chi^2 = 37,1$; $p < 0,001$). Относительный риск развития заболевания у гомозиготных носителей нулевых аллелей генов GSTM1 и GSTT1 повышен в 13 раз. Выявленное нами достоверное увеличение частоты гомозигот по нулевому аллелю генов GSTM1 и GSTT1 у больных бронхиальной астмой, свидетельствует о возможном участии этих генов в патогенезе бронхиальной астмы.

При анализе зависимости начала заболевания от особенностей генотипа установлено, что частота генотипа GSTM1 0/0, GSTT10/0 у больных бронхиальной астмой с поздней манифестацией заболевания (после 30 лет) оказалась в три раза выше, чем в популяции (31 и 9,1% соответственно, $p < 0,05$). В то же время у больных бронхиальной астмой с манифестацией заболевания до 30 лет частота гомозигот по нулевым аллелям генов GSTM1, GSTT1 превышает популяционную частоту почти в семь раз и составляет в среднем 63% ($p < 0,01$). Наиболее высокая частота делеций двух исследуемых генов зарегистрирована в группе больных с манифестацией заболевания от 20 до 30 лет (66%). Таким образом, можно предположить, что существует взаимосвязь между частотой генотипов GSTM1 0/0, GSTT1 0/0 у пациентов с возрастом дебюта заболевания.

Заключение

Полиморфизм генов, кодирующих ферменты фазы II системы детоксикации, у пациентов с бронхиальной астмой в настоящее время мало изучен. Исследования полиморфизма гена микросомальной эпоксид гидролазы (mEPHX), кодирующего фермент фазы I детоксикации ксенобиотиков, не показали достоверных различий между числом индивидуумов с медленной формой mEPHX среди больных бронхиальной астмой по сравнению с контрольной группой [7]. Напротив, изучение полиморфизма гена N-ацетил трансферазы 2 (фермент II фазы системы детоксикации) выявило достоверное увеличение доли «медленных» ацетиляторов среди больных астмой и атопией [5]. Ранее нами была также установлена ассоциация одного из полиморфных сайтов гена GSTP1, кодирующего глутатион-S-трансферазу P1 (фаза II детоксикации) с бронхиальной астмой [6]. Выявленное в настоящем исследовании достоверное увеличение частоты гомозигот по нулевому аллелю генов GSTM1 и GSTT1 у беременных, больных бронхиальной астмой, свидетельствует о возможном участии белковых продуктов этих генов в патогенезе данного заболевания. У больных бронхиальной астмой с манифестацией заболевания до 30 лет частота гомозигот по нулевым аллелям генов GSTM1, GSTT1 превысила популяционную почти в семь раз и составила 63%.

Алгоритм ведения беременных с бронхиальной астмой должен включать максимально раннюю постановку на учет у пульмонолога и акушера-гинеколога, разработку индивидуальных мер по вторичной профилактике бронхиальной астмы. Проведение адекватной базисной терапии бронхиальной астмы позволяет избежать ухудшения в течении этого заболевания, уменьшает частоту осложнений беременности.

Таким образом, результаты данного исследования подтверждают ранее полученные данные [5, 6] о том, что ферменты системы детоксикации фазы 2 вовлечены в патогенез бронхиальной астмы. Эти данные открывают новые возможности и досимптоматического выявления лиц, подверженных заболеванию бронхиальной астмой. В частности, анализ генотипа детей, родившихся от матерей, больных бронхиальной астмой, позволяет выявить новорожденных с наследственной предрасположенностью к этому заболеванию и своевременно начать его профилактику.

Литература

1. Бронхиальная астма / Под ред. Г. Б. Федосеева. — СПб.: МИА, 1996. — 464 с.
2. Бронхиальная астма / Под ред. А. Г. Чучалина. — М.: Агар, 1977. — 432 с.

3. *Фассахов, Р. С.* Лечение бронхиальной астмы у беременных / Фассахов Р. С. // Аллергология. — 1998. — № 1. — С. 32–36.
4. *Шехтман, М. М.* Руководство по экстагенитальной патологии у беременных / Шехтман М. М. — М.: Триада-Х, 2003.
5. Association between the N-acetylation genetic polymorphism and bronchial asthma / Nacak M., Aynacioglu A. S., Filiz A. [et al.] // Br. J. Clin. Pharmacol. — 2002. — Vol. 54, N 6. — P. 671–674.
6. *Ivaschenko, T. E.* Glutathione-S-transferase micro and theta gene polymorphisms as new risk factors of atopic bronchial asthma / Ivaschenko T. E., Sideleva O. G., Baranov V. S. // J. Mol. Med. — 2002. — Vol. 80, N 1. — P. 39–43.
7. *Smith, C.* Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema / Smith C., Harrison D. // Lancet. — 1997. — Vol. 350. — P. 630–633.

Статья представлена Э. К. Айламазяном,
НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта,
Санкт-Петербург

GENOTYPES ESPECIALLY BY GENES OF DETOXICATION SYSTEM IN PREGNANT WOMEN WITH BRONCHIAL ASTHMA

Shapovalova E. A., Arzhanova O. N., Ivashenko T. E.,
Lavrova O. V., Chistjakova D. S., Baranov V. S.

■ **Summary:** Polymorphism of genes, coding phase II detoxication system enzymes in patients with bronchial asthma has not been enough researched this time. Investigations of polymorphism of microsomal epoxid hydrolase (mEPHX) gene,

coding enzyme of phase I of xenobiotic detoxication have not revealed reliable distinctions between the number of persons with “slow” type mTPHX among patients with bronchial asthma and control group. On the contrary, research of gene N-acetyltransferase 2 (II phase detoxication system enzyme) polymorphism, have determined reliable increasing of share with “slow” type among the patients with asthma and atopy. Earlier, it has been established the association of one of the polymorphous sites of gene GSTM1, coding glutation-S-transferase PI (phaza II detoxication) with bronchial asthma. Reliable increasing of frequency of homozygot by zero allelic genes GSTM1 and GSTT1, revealed in this study, at pregnant women with bronchial asthma, testify to possible proteins products participation. Among patients with bronchial asthma and the disease manifestation to 30 years, the frequency of homozygot by zero allelic genes GSTM1, GSTT1 has exceeded the population one almost in 7 time and made 63%.

The conducting algorithm of pregnant women with bronchial asthma have to include register at pulmonologist and obstetrician-gynecologist as early as possible, taking individual actions for secondary prophylaxis of bronchial asthma.

So, obtained results confirm, that phase II detoxication system enzymes are involved in pathogenesis of bronchial asthma. These facts show new possibilities in early discovery of patients, who are subjected to bronchial asthma. Specifically, the analysis a genotype of children, who were born from females with bronchial asthma, allows to reveal neonatus with this disease hereditary predisposition and to start its prophylaxis in good time.

■ **Key words:** bronchial asthma; pregnancy; detoxication system enzyme; polymorphism gene.

■ Адреса авторов для переписки

Шаповалова Елена Андреевна — к. м. н, старший научный сотрудник.

Иващенко Татьяна Эдуардовна — д. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории пренатальной диагностики и наследственных болезней.

Аржанова Ольга Николаевна — д. м. н., руководитель отделения патологии беременности.

Лаврова Ольга Вальдемаровна — врач-пульмонолог, СПбГМУ им. акад. Павлова.

Чистякова Дарья Сергеевна — врач акушер-гинеколог.

Баранов Владислав Сергеевич — д. м. н., заведующий лабораторией пренатальной диагностики и наследственных болезней.

ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, 199034 Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3