

This study is dedicated to one out of a two world maximums of the frequency of the CCR5del32 deletion. This maximum was found in population of Shorians. Here we perform the analysis of the frequency distribution of the deletion allele among different linguistic groups.

ВІШТАК Н.В., ГНАТЕЙКО О.З.

*ДУ "Інститут спадкової патології АМН України",
Україна, 79000, м.Львів, вул.М.Лисенка 31а, e-mail:nataliyavishtak@rambler.ru*

ДОСЛІДЖЕННЯ АЛЕЛЬНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗ У ДІТЕЙ, ЩО ПРОЖИВАЮТЬ В УМОВАХ ЗАБРУДНЕНОГО ДОВКІЛЛЯ

Диференційна чутливість різних осіб до середовищних факторів в залежності від індивідуальних спадкових особливостей зводиться до адаптивного процесу чи, навпаки, до дезадаптації, що супроводжується проявом мультифакторіальних захворювань, що виникають в результаті таких контактів.

Фактори зовнішнього середовища, що діють на організм поділяються на природні і штучні, біотичні і абіотичні. До відносно «нових» середовищних факторів варто віднести ксенобіотики – чужорідні для нормального метаболізму речовини з потенціальним біологічним ефектом (десятки тисяч хімічних сполук, включаючи ліки).

Інформація про внесок пропорцій генного різноманіття на різних рівнях ієрархічної структури груп світового народонаселення свідчить про те, що основна його доля припадає на внутрішньо популяційний рівень [1,2]. Цим фактом пояснюються істотні відмінності в реакції окремих людей на тиск одного і того ж середовища.

Алелі ряду локусів, які знаходяться в нормальному поліморфному стані в природньому середовищі проживання людських популяцій, можуть стати «патологічними» в інших умовах, що міняються під впливом антропогенних факторів[3].

Більшість ксенобіотиків, які потрапляють в організм, не мають прямої деструктивної дії, проте її набувають метаболіти, що утворюються в процесі системної біотрансформації – послідовного ензимного перетворення жиророзчинних сполук у полярні водорозчинні метаболіти, які легко елімінуються. Система ферментів, що приймають участь у цьому процесі носить назву детоксикаційної і поділяється на три фази : фазу активації ксенобіотиків (I), фазу детоксикації (нейтралізації) ксенобіотиків (II) та фазу елімінації (III) [4].

Головною функцією II фази біотрансформації є нейтралізація метаболітів, що володіють токсичними властивостями, які утворились внаслідок дії ферментів фази I. Ключову роль серед сполук, що беруть участь в цій фазі відіграють ферменти глутатіон-S-трансферази (GSTs). Детоксикація за допомогою глутатіону забезпечує резистентність клітин до дії вільних радикалів, перекисного окислення ліпідів, алкілування білків та сприяє попередженню пошкодження ДНК [5,6].

Синтез глутатіонтрансфераз контролюється генами різних хромосом. В кожному з них виявлені поліморфізми, які суттєво впливають на їх функції. Серед чотирьох класів GSTs важливу роль у детоксикації відіграють глутатіон-S-трансферази GSTM1 та GSTT1. Вважається, що саме ці гени задіяні в патогенезі різноманітних онкопатологій і виступають в якості модифікаторів і факторів ризику при захворюваннях, пов'язаних з несприятливою дією факторів зовнішнього

середовища[7,8].

Екологічна ситуація в нашій державі характеризується наявністю територій з підвищеним рівнем радіації після Чорнобильської катастрофи, а також зон з високими концентраціями хімічних чинників антропогенного походження. Все це створює реальну загрозу для здоров'я людей і, насамперед, дітей, які в силу своїх анатомо-фізіологічних особливостей є більш чутливими до дії ксенобіотиків.

Зважаючи на все вище викладене, дослідження поліморфізму генів, що кодують ферменти системи детоксикації набуває першочергового значення для оцінки ризику захворюваності та прогнозування характеру перебігу екологічно детермінованої патології у дітей, що постійно проживають на забруднених територіях [9].

На території Івано-Франківської області знаходяться три райони з високим рівнем забруднення довкілля – Галицький, Долинський і Снятинський. У першому інтенсивність забруднення зумовлена викидами в атмосферу Бурштинської ГЕС. Щільність викидів становить 212,4 т на 1 км². Снятинський р-н належить до зони радіаційного забруднення після аварії на Чорнобильській АЕС. Долинський р-н забруднений продуктами переробки нафтохімічної промисловості, розвиненої на території району [10].

Метою роботи було встановлення розподілу алельного поліморфізму генів GSTM1 і GSTT1, що кодують глутатіон-S-трансферази у дітей з несприятливих регіонів для використання даних маркерів у прогнозуванні важкості перебігу екопатологічних станів.

Матеріали і методи

В нашому дослідженні обстежували чотири групи дітей, що проживають в Івано-Франківській області.

Першу дослідну групу (ГГ) склали 67 дітей із хімічно забрудненого регіону (Галицький район). Другу дослідну групу (СГ) склали 66 дітей з регіону з підвищеним рівнем радіаційного фону (Снятинський район). Третю групу склали 53 дитини з Долинського району (нафта і нафтопереробна промисловість) (ДГ). Четверта група (контрольна) репрезентує 90 дітей, що проживають в визнаних екологічно чистими регіонах Івано-Франківської області (Верховинський і Городенківський райони) (КГ).

Діти були віком від 6 до 16 років. Усі діти оглядалися педіатрами-спеціалістами і проводилось УЗД внутрішніх органів.

При порівнянні досліджуваних і контрольної груп по віку і частоті спадкової обтяженості відмінностей не виявлено, що вказує на правомірність порівняння генетичних показників в цих групах.

Для проведення генотипування брали венозну кров в пробірки з ЕДТА. Виділення ДНК проводили, використовуючи комерційні набори ООО «Лаборатория Изоген», (Москва, РФ).

Поліморфні варіанти генів GSTM1 і GSTT1 пов'язані з протяжною делецією (до 10 т.п.н.), яка призводить до повної відсутності продукту гена і, відповідно, до порушення метаболізуючої функції.

Присутність чи відсутність нульового алеля GSTM1 GSTT1 визначали за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції [11]. ПЛР проводили за допомогою термоциклера Терцик («ДНК-технология», Росія).

Отримані фрагменти розділяли в 2 % агарозному гелі з подальшим фарбуванням бромистим етидієм і візуалізацією фрагментів в УФ-промінні.

Гомозиготи і гетерозиготи по функціональному алелю « + » визначали за наявністю на електрофореграмах продукту ампліфікації розміром 470 п.н. для GSTT1 і 271 п.н. для GSTM1. Відсутність відповідного фрагменту вказувала на гомозиготність особи по делеції гена. В якості внутрішнього контролю використовували фрагмент гена альбуміну (330 п.н.).

Результати та обговорення

У групах дітей із забруднених регіонів відмічено високу частоту скарг, характерних для синдрому загальної інтоксикації.

Для виявлення факторів, які пов'язані з розвитком мультифакторіальних соматичних захворювань при дії генотоксичних чинників було проведено дослідження алельного поліморфізму генів GSTM1 і GSTT1, які продукують детоксикаційні ензими. Результати проведеного генотипування представлені у таблиці.

Таблиця

Розподіл «нульових» варіантів генів GSTT1 і GSTM1 у обстежених дітей

Групи дітей	Кількість, n	Генотип GSTM1« – »		Генотип GSTT1« – »		Генотип GSTM1«←» + GSTT1«←»	
		n	Частота, %	n	Частота, %	n	Частота, %
ГГ(Галицький район)	67	30	45	14	21	7	11
СГ(Снятинський район)	66	30	45	21	32	15	23
ДГ(Долинський район)	53	18	34	10	19	4	8
КГ(Контрольна група)	90	35	39	25	28	13	15

У 21 % дітей з групи ГГ виявлено подвійний алель GSTT1 « – », подвійний алель GSTM1 « – » у 45 %. Поєднання подвійних «нульових» алелів обох генів зареєстровано в 11 % випадків. У групі з радіаційно контрольованого району СГ подвійний алель GSTT1 « – » виявлено у 32 % дітей, GSTM1 « – » у 45 % обстежуваних, а поєднання обох «нульових» варіантів генів – у 23 %. В групі ДГ (Долинський район) частота встановленого генотипу GSTM1 « – » становила 34 %, алель GSTT1 « – » виявлено у 19 % дітей, а наявність делетованих алелів обох генів встановлено у 8 % осіб.

В контрольній групі КГ розподіл алелів був слідуєчим : генотип GSTM1 « – » виявлено у 39 % осіб, генотип GSTT1 « – » встановлено у 28 % обстежених, генотип GSTM1 « – » + GSTT1 « – » – у 15 % осіб.

Частота реєстрації подвійних делетованих алелів генів GSTM1 і GSTT1 в осіб усіх груп не відрізнялась від літературних даних про частоту нефункціональних «нульових» алелів цих генів у кавказькій популяції [4].

Обстежувані групи (ГГ, СГ, ДГ) ми поділили за важкістю перебігу захворювань : 1)легший перебіг (глибина ураження і кількість виявлених захворювань мінімальні); 2)важчий перебіг (глибший ступінь ураження і залучення в патологічний процес більшої кількості органів і систем).

При аналізуванні отриманих генотипів дітей з поділених груп ми встановили наступну картину у відсотковому відношенні : діти, у яких зафіксований легший характер перебігу захворювання були гомозиготними носіями делетованих алелей генів GSTM1 і GSTT1 у 53 % та 35 % відповідно. А при констатації важчого перебігу нами було відмічено 46 % подвійної делеції гена GSTM1 і 42 % гена GSTT1.

Отримані результати свідчать про те, що у дітей, які постійно проживають на техногенно-забруднених територіях і які є носіями нефункціональних алелів генів GSTT1 і GSTM1, збільшується ризик захворювань, спричиненими впливом дії на організм ксенобіотиків. Перспективи подальших досліджень пов'язані з пошуком нових маркерів екологічної дезадаптації, а саме : визначення поліморфних варіантів окремих генів, що належать до першої фази системи біотрансформації для встановлення взаємодії між обома фазами детоксикації і шляхів корекції екопатологічних станів.

Висновки

У роботі досліджено розподіл генотипів у дітей, які постійно перебувають у контакті з генотоксичними чинниками (проживають в умовах радіаційно і хімічно забрудненого довкілля). У дітей, в яких встановлений різний ступінь важкості протікання екологічно детермінованої патології виявлено зростання частоти гомозиготного носійства делетованих алелів гена GSTT1.

Література

1. *Nei M.* Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70.
2. *Lewontin R.C.* The genetic basis of evolutionary chance. N.Y.; London: Columbia Univ. Press, 1974. 351.
3. *Kelada S.N., Eaton D.L., Wang S.S. et al.* The role of genetic polymorphisms in environmental health // Environmental Health Perspectives. V. 111. № 81. P. 1055-1064. 645.
4. *Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В.* Геном человека и гены предрасположенности (Введение в предиктивную медицину). Санкт-Петербург: «Интермедика», 2000. 272с.
5. *Спицын В.А., Цыбикова Э.Б., Агапова Р.К. и др.* Влияние наследственных факторов на переносимость хирургических операций у больных раком легкого // Генетика 1996. Т. 32. № 5. С. 691-701.
6. *Mace, K., Bowman, E. D., Vautravers, P., Shields, P. G., Harris, C. C., and Pfeifer, A. M.* Characterization of xenobiotic-metabolizing enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues. Eur. J. Cancer, 34: 914–920, 1998.
7. *Rollinson S, Roddam P, Kane E, et al.* Polymorphic variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukaemia. Carcinogenesis. 2000;21:43-47
8. *Rebbeck T.R.* Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 6: 733-743, 1997.
9. *Трахтенберг И.М.* Приоритетные аспекты фундаментальных исследований в токсикологии // Тез. докл. 1 съезда токсикологов Украины. – К., 2001. – С. 5-6.
10. *Довкілля Івано-Франківщини: Статистичний збірник / За ред. Л.О.Зброй.* – 2004. – 133 с.
11. *Arand M., Muhlbauer R., Hengstler J. et al.* Multiplex Polymerase chain Reaction for the Glutathione S-Transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms // Analytical Biochemistry. – 1996. – № 236. –Р. 184-186.

Резюме

Вивчено алельний поліморфізм генів GSTM1, GSTT1 II фази біотрансформації ксенобіотиків серед дітей, що проживають на територіях, забруднених генотоксичними чинниками. Дослідження показало, що маркером схильності до розвитку і важкості перебігу соматичних захворювань можна вважати генотип GSTT1 « – ».

Изучен аллельный полиморфизм генов GSTM1, GSTT1 II фазы биотрансформации ксенобiotиков среди детей, проживающих в условиях загрязненной окружающей среды. Проведенное исследование показало, что маркером предрасположенности к развитию и тяжести течения заболеваний можно считать генотип GSTT1 « – ».

Authors studied genes polymorphism of GSTM1, GSTT1, which participate in II phase of xenobiotics transformation, in children which live on polluted territories. The study showed that genotype GSTT1 « – » could be estimated as marker of predisposition to development and more severe course of ecologically caused disease.

**ВОРОБЬЕВА Л. И., ВДОВИЧЕНКО Н.И., МИКУЛИНСКИЙ Ю. Е.,
КУЛЬШИН В.Е.**