



УДК 612.014.4:577.15.025:575.113.2]:616.053.2

С. О. Печеник, Н. С. Лук'яненко, Г. Р. Акопян, Н. Р. Косцик, Н. В. Віштак

ОСОБЛИВОСТІ АКТИВНОСТІ ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗИ В ОРГАНІЗМІ ДІТЕЙ В УМОВАХ ДІЇ РІЗНИХ ФАКТОРІВ ЗАБРУДНЕННЯ ДОВКІЛЛЯ

Інститут спадкової патології АМН України, Львів

Екологічна ситуація в нашій державі характеризується комплексним забрудненням із наявністю територій з підвищеним рівнем радіації після чорнобильської катастрофи, а також зон із високими концентраціями хімічних факторів антропогенного походження. Все це створює реальну загрозу для здоров'я людей і, насамперед, дітей, які через свої анатомофізіологічні особливості є більш чутливими до дії ксенобіотиків [1].

Процес біотрансформації ксенобіотиків поділяється на три фази. У I фазі чужорідні для організму речовини активуються за допомогою цитохромів P450 із приєднанням модифікуючих функціональних груп ($-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$). У процесі II фази проміжні метаболіти з'єднуються з ендogenousними лігандами, що сприяє їх виведенню з організму. У цій фазі задіяні N-ацетилтрансфераза, глутатіон-S-трансфераза, глюкуронозилтрансфераза, епоксидгідролаза та метилтрансфераза. У III фазі відбувається евакуація ксенобіотиків шляхом їх екскреції в жовч або кров за допомогою специфічних транспортних сполук — P-глікопротеїнів [2].

Ефективність детоксикації ксенобіотиків в організмі залежить, таким чином, від функціо-

нальної повноцінності ферментних систем, що відповідають за їх біотрансформацію. Продукція цих ферментів кодується відповідними генами. Наявність у генотипі певних алелів може спричиняти зниження активності ферменту, що робить носіїв таких алелів більш чутливими до несприятливого екзогенного впливу [3; 4].

Іншою причиною зниження ферментативної активності може виявитися безпосередній вплив ксенобіотиків на ферментні системи, що відповідають за їх метаболізацію. Відомо, що самі токсичні компоненти можуть стати потужними індукторами чи інгібіторами цих ферментів і змінювати тим самим швидкість біотрансформації ендogenous і екзогенних хімічних сполук [5]. У зв'язку з цим вивчення активності ферментів, що забезпечують детоксикацію ксенобіотиків, набуває першочергового значення в оцінці ризику для здоров'я дітей, які постійно проживають на забруднених територіях.

Важливу роль серед сполук, що беруть участь у II фазі, відіграє фермент глутатіон-S-трансфераза (GST). Детоксикація за допомогою глутатіону забезпечує резистентність клітин до дії вільних радикалів, перекисно-го окиснення ліпідів, алкілуван-

ня білків і запобігає поломкам ДНК. Принципово важливою є присутність глутатіон-S-трансфераз в еритроцитах. Це відкриває можливість детоксикації екзогенних гідрофільних сполук уже на перших етапах їх проникнення в організм [6]. Недостатність GST може збільшувати ризик онкологічних захворювань, оскільки в цьому разі зростає чутливість до окремих хімічних канцерогенів [7].

На території Івано-Франківської області знаходяться два райони з високим рівнем забруднення довкілля — Галицький і Снятинський [8]. У першому інтенсивність забруднення зумовлена викидами в атмосферу Бурштинської електростанції. Щільність викидів становить 212,4 т на 1 км². У структурі викидів 59,3 % сірчистого ангідриду, 9,0 % — вуглеводнів без легких органічних сполук, 7,4 % — окислів азоту. Сланцева зола становить 96,8 % об'єму всіх твердих викидів. Снятинський район належить до зони радіаційного забруднення після чорнобильської катастрофи. Щільність забруднення території радіонуклідами становить за цезієм — 4,60 Кі/км², за стронцієм — 0,31 Кі/км². Для порівняння, у Верховинському районі тієї ж області щільність викидів становить 34 кг на 1 км²,



тобто в 6000 разів менша, ніж у Галицькому районі. Забруднення радіонуклідами становить за цезієм — 1,3 Кі/км², за стронцієм — 0,8 Кі/км², що в чотири рази менше, ніж у Снятинському районі.

Мета роботи — встановити особливості розподілу алелів генів, які кодують глутатіон-S-трансферазу, визначити її біохімічну активність у дітей з несприятливих регіонів та порівняти з показниками дітей з незабрудненого регіону для можливого використання виявлених особливостей у системі прогнозування екопатологічних станів.

Матеріали та методи дослідження

Обстежено 67 дітей із хімічно забрудненого регіону (дослідна група 1, Галицький район) і 66 дітей з регіону з підвищеним радіаційним фоном (дослідна група 2, Снятинський район). Групу контролю утворили 39 дітей з незабрудненого Верховинського району. Всі діти були віком від 6 до 16 років. Кількість обстежених дівчаток була трохи більшою в дослідних групах. Усім дітям, крім клінічного огляду педіатром, гастроентерологом, нефрологом, неврологом, офтальмологом і стоматологом, проводили УЗД внутрішніх органів і щитоподібної залози.

Активність ферментів і розподіл алелів генів GSTM1 та GSTT1 визначали у 39 зразках крові дітей з хімічно забрудненого регіону, 36 зразках крові дітей з регіону з підвищеним радіаційним фоном і 36 зразках крові дітей з екологічно чистого регіону (ЕЧР).

Визначення активності GST проводили за методом W. H. Nabis [9]. Розподіл алелів генів GSTM1 і GSTT1 визначали за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції [10].

Результати дослідження та їх обговорення

У групах дітей із забруднених регіонів відмічено високу частоту скарг, характерних для

синдрому загальної інтоксикації; зокрема, на частий головний біль — у 51–57 %, зниження апетиту — у 50–56 % обстежених. У цих групах, на відміну від контрольної, відмічалися скарги на болі в нижніх кінцівках. Вірогідно частіше, ніж у контролі, реєстрували скарги на часті болі в животі.

Загальний стан усіх обстежених оцінено як задовільний. У дітей із забруднених регіонів вірогідно частіше реєструвалися блідість шкірних покривів, мікрополіаденіт, приглушені тони серця при аускультатії, болючість при пальпації живота, позитивний симптом Пастернацького.

При ультразвуковому обстеженні дітей звертали увагу на стан щитоподібної залози та внутрішніх паренхіматозних органів. Оскільки контрольну групу утворили діти, що проживають в одному з гірських районів, частота ультразвукових ознак зоба 1–2-ї стадії у них виявилася підвищеною. Частота зоба 1–2-ї стадії у групі дітей з регіону з підвищеним радіаційним фоном виявилася вірогідно вищою, ніж у контролі. Не виявлено відмінностей між частотою цієї ознаки в групах дітей з хімічно забрудненого регіону та в контролі. У групі дітей зі Снятинсь-

кого району (радіаційний характер забруднення) виявлено вищу, ніж у контролі, частоту ознак запального стану нирок.

Проаналізовано частоту захворювань, виявлених за допомогою анамнезу, клінічного й ультразвукового дослідження дітей, а також огляду, проведеного стоматологами. Відмічено підвищену частоту ураження нирок, щитоподібної залози та зубів у дітей, які постійно проживають в екологічно несприятливих регіонах (табл. 1).

Хоча в ЕЧР було виявлено високу частоту зоба 1–2-ї стадії серед обстежених дітей, частота цієї патології у дітей із забруднених регіонів виявилася вірогідно вищою від контрольної групи. Звертає на себе увагу висока частота патології нирок серед обстежених дітей зони радіаційного контролю. Вона вірогідно відрізнялась як від частоти в контролі, так і в групі з регіону з переважно хімічним типом забруднення.

Високу частоту хронічного тонзиліту (52–68 % обстежених дітей дослідних груп) можна розглядати як маркер імунологічної недостатності. Виснаженням механізмів імунологічного захисту можна пояснити також вірогідно вищу частоту захворюваності дітей із забруднених

Таблиця 1

Частота захворювань, виявлених у групах дітей, за даними анамнезу, клінічного й ультразвукового обстеження

Виявлені захворювання	Частота q виявлених захворювань у групах		
	Дослідна група 1 (Галицький р-н), n=67	Дослідна група 2 (Снятинський р-н), n=66	Контрольна група, n=39
Нефропатії	0,27	0,51**	0,23
Зоб 1–2-ї стадії	0,67**	0,74*	0,38
Часті ГРЗ	0,51**	0,65**	0,24
Гіпоплазія емалі зубів	0,21	0,54*	0,15
Хронічний тонзиліт	0,52*	0,68*	0,08
Патологія ЖВШ/ШКТ	0,24	0,35	0,20

Примітка. * — вірогідна різниця показника порівняно з контрольною групою; $P < 0,01$; ** — вірогідна різниця показника порівняно з контрольною групою; $P < 0,05$.



регіонів на гострі респіраторні інфекції.

За даними огляду стоматолога, більш як у половини дітей з дослідних груп реєструвались ознаки гіоплазії емалі зубів (ГЕЗ), що може свідчити про порушення в них метаболізму кальцію.

Для виявлення факторів, що можуть сприяти маніфестації захворювань дітей, пов'язаних з інтоксикацією, в умовах тривалої дії генотоксичних факторів, нами проаналізовано активність ферменту глутатіонтрансферази, який відіграє суттєву роль у детоксикації ксенобіотиків. З'ясування ролі коливань активності цього ферменту в організмі дітей, які постійно проживають в умовах забрудненого довкілля, на нашу думку, дасть можливість ефективно прогнозувати розвиток екопатології.

Проведено аналіз особливостей розподілу алелів генів GSTM1 і GSTT1 у 38 дітей з регіону з переважно хімічним типом забруднення, 30 дітей із зони радіаційного контролю та у 29 дітей з ЕЧР. Визначали частоту алелів GSTM1 0/0 і GSTT1 0/0, при яких не виробляються функціонально повноцінні ферменти.

У 21 % дітей з Галицького району з переважно хімічним типом забруднення виявлено алель GSTT1 0/0, алель GSTM1 0/0 — майже у половини обстежених. Поєднання обох «нульових» алелів зареєстровано в 11 % випадків. У групі дітей з радіаційно контрольованого Снятинського району алель GSTT1 0/0 виявлено у третини дітей, GSTM1 0/0 — більш як у половини, а поєднання GSTM1 0/0 і GSTT1 0/0 — у 23 % обстежених. В ЕЧР (Верховинський район) частота реєстрації алелів GSTM1 0/0 і GSTT1 0/0 була однаковою — 31 % обстежених, а їх поєднання виявили у 10 % випадків. Не виявлено статистично вірогідних відмінностей між частотою реєстрації алелів GSTT1 0/0 і GSTM1 0/0 або їх поєднання в

групах дітей, які проживали в ЕЧР і забрудненому регіоні.

Проаналізовано біохімічну активність ферменту глутатіонтрансферази залежно від особливостей генотипу. Для цього порівнювали активність GST у підгрупах дітей із забруднених регіонів, розподілених залежно від наявності «нульових» алелів GSTT1 0/0 і GSTM1 0/0 або їх поєднання (табл. 2). Виявлено такі закономірності. У контрольній групі активність ферменту в підгрупах дітей — носіїв «нульових алелів» — GSTT1 0/0, GSTM1 0/0 і поєднання GSTT1 0/0 і GSTM1 0/0 була вірогідно нижчою, ніж у підгрупах носіїв алелів GSTT1 AB, GSTM1 AB, GSTT1 AB і GSTM1 AB, адже саме ці алелі забезпечують продукцію функціонально повноцінного ферменту. У дослідних групах (як із переважно хімічним, так і радіаційним типом забруднення) цього не спостерігалось — не виявлено вірогідних відмінностей в активності ферменту залежно від особливостей генотипу (див. табл. 2).

У групі дітей, які постійно проживають в умовах інтенсивного забруднення повітря (Галицький район), активність GST вірогідно відрізнялась у бік зниження, порівняно з мешканцями Снятинського району з радіаційним типом забруднення. Найбільш виражену статистичну різницю активності ферменту відмічено в підгрупах носіїв алелів GSTT1 AB, GSTM1 AB та їх поєднання (див. табл. 2). На нашу думку, це може бути результатом виснаження біохімічних механізмів продукції GST в умовах масивного хімічного забруднення довкілля.

Не відмічено вірогідних відмінностей активності глутатіонтрансферази в підгрупах носіїв алелів GSTT1 0/0, GSTM1 0/0 та їх поєднання, що проживали в ЕЧР чи в умовах забруднення довкілля (див. табл. 2). Носії алелів GSTT1 AB, GSTM1 AB та їх поєднання з Галицького району мали віро-

гідно нижчу активність GST, ніж носії цих алелів із ЕЧР. Знижену активність ферменту порівняно з контролем відмічено також у підгрупах носіїв GSTM1 AB та поєднання GSTT1 AB і GSTM1 AB зі Снятинського району з переважно радіаційним типом забруднення. Підсумовуючи наведені дані, можна виділити спільну тенденцію. Діти з генетичними передумовами до вироблення функціонально повноцінного ферменту демонстрували зниження його активності в умовах проживання на територіях з ознаками хімічного та радіаційного забруднення.

Біохімічна активність глутатіонтрансферази за середніми значеннями в дослідній групі 1 (хімічне забруднення) була вірогідно нижчою, ніж у групі контролю та групі 2 (радіаційне забруднення):

$$M_1 \pm m_1 = (0,65 \pm 0,04) \text{ ОД/мл,} \\ M_K \pm m_K = (1,67 \pm 0,14) \text{ ОД/мл,} \\ P < 0,001;$$

$$M_1 \pm m_1 = (0,65 \pm 0,04) \text{ ОД/мл,} \\ M_2 \pm m_2 = (1,33 \pm 0,15) \text{ ОД/мл,} \\ P < 0,001.$$

Активність глутатіонтрансферази в сироватці крові дітей із зони радіаційного контролю не відрізнялася вірогідно від активності в контрольній групі:

$$M_2 \pm m_2 = (1,33 \pm 0,15) \text{ ОД/мл,} \\ M_K \pm m_K = (1,67 \pm 0,14) \text{ ОД/мл,} \\ P > 0,05 \text{ (рис. 1).}$$

Активність GST у групах коливалась у широкому діапазоні значень — від 0,15 до 3,26 ОД/мл. Виділено підгрупи осіб, в яких активність ферменту була нижчою 1 ОД/мл, знаходилася в інтервалі від 1 до 2 ОД/мл і була вище 2 ОД/мл. У дослідній групі 1 (хімічне забруднення) 87 % обстежених дітей мали низький рівень активності GST — <1 ОД/мл. У дослідній групі 2 дітей з низьким рівнем активності було 48 %. У контролі низький рівень активності зареєстровано лише у 26 % дітей. У групі дітей з ЕЧР переважали особи з середнім і високим рівнем активності — по 37 %, усього — 74 %. У дослідній групі 1 осіб із висо-



Аналіз активності глутатіонтрансферази залежно від особливостей генотипу, ОД/мл, М±m

Групи дітей	GSTT1 0/0 генотип	GSTT1 AB генотип	Вірогідність різниці, P	GSTM1 0/0 генотип	GSTM1 AB генотип	Вірогідність різниці, P	GSTT1 0/0 + GSTM1 0/0 генотип	GSTT1 AB + GSTM1 AB генотип	Вірогідність різниці, P
Дослідна група 1 (Галицький район)	0,66±0,10	0,65±0,04	>0,05	0,75±0,08	0,59±0,04	>0,05	0,80±0,23	0,60±0,04	>0,05
Дослідна група 2 (Снятинський район)	1,38±0,32	1,39±0,17	>0,05	1,46±0,23	1,30±0,21	>0,05	1,25±0,29	1,20±0,15	>0,05
P ₁₋₂	>0,05	<0,01		<0,01	<0,01		>0,05	<0,01	
Контрольна група (Верховинський район)	0,94±0,10	1,85±0,18	<0,01	0,98±0,11	1,89±0,18	<0,01	0,94±0,22	2,18±0,16	<0,01
P _{1-к}	>0,05	<0,01		>0,05	<0,01		>0,05	<0,001	
P _{2-к}	>0,05	>0,05		>0,05	<0,05		>0,05	<0,001	

кою активністю GST не виявлено, а дітей із середнім рівнем активності було лише 13 %. У дослідній групі 2 також переважали діти з низькою активністю ферменту, осіб із високою активністю було лише 13 % (рис. 2). Слід відмітити, що за середніми значеннями активність GST у підгрупі <1 ОД/мл дослідної групи 1 була вірогідно нижчою від активності в однойменній підгрупі контрольної групи:

$M_1 \pm m_1 = (0,57 \pm 0,03)$ ОД/мл,
 $M_k \pm m_k = (0,80 \pm 0,06)$ ОД/мл,
 $P < 0,01$.

Відмічено також вірогідну різницю в підгрупах від 1 до 2 ОД/мл між групами з переважно хімічним забрудненням і контролем:

$M_1 \pm m_1 = (1,16 \pm 0,08)$ ОД/мл,
 $M_k \pm m_k = (1,44 \pm 0,06)$ ОД/мл,
 $P < 0,05$.

Загалом у групах із забруднених регіонів переважали особи зі знизеним рівнем активності глутатіонтрансферази, а осіб із високим рівнем або не було, або їх відсоток був утричі нижчим від контрольної групи.

Таким чином, зареєстровано виражене зниження активності глутатіонтрансферази в групі дітей з регіону з інтенсивним забрудненням повітря. Показники активності вірогідно відрізнялись як від даних контролю, так і від 2-ї групи (радіаційне забруднення). На нашу думку, це може бути зумовлене виснаженням механізмів адаптації в умовах довготривалого впливу ксенобіотиків на організм дітей, хоча не можна виключити пряму інгібуючу дію комплексу хімічних факторів — складових викидів електростанції. Хоча за середніми значеннями не виявлено вірогідних відмінностей активності GST між групами з радіаційним забрудненням і контролем, у дослідній групі переважали особи з низькою активністю ферменту.

На нашу думку, дослідження рівня активності GST — ферменту, що відіграє важливу роль у процесах детоксикації, в комп-



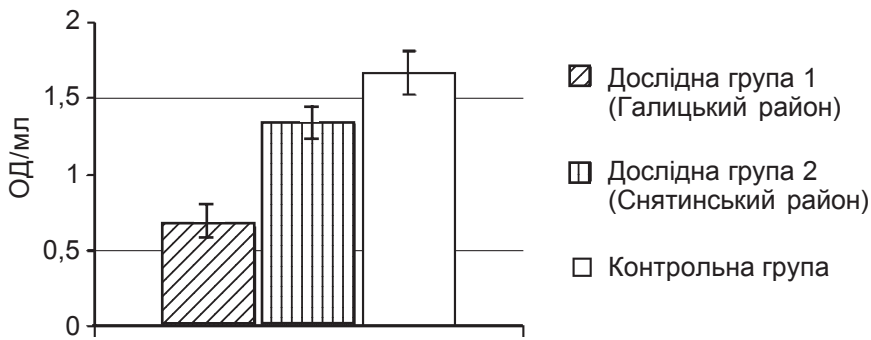


Рис. 1. Активність глутатіонтрансферази в групах дітей



Рис. 2. Розподіл підгруп із різною активністю GST у групах дітей

лексі з іншими інформативними маркерами можна використовувати для прогнозування виникнення захворювань у дітей, пов'язаних з екопатогенними впливами.

Висновки

1. У дітей із забруднених регіонів вірогідно частіше, ніж у контрольній групі, реєстрували ознаки ураження сечовидільної системи, зоба 1–2-ї стадії, гіпоплазії емалі зубів ($P < 0,05$).

2. Біохімічна активність глутатіонтрансферази в підгрупах дітей із генетичними передумовами до нормальної продукції ферменту із забруднених регіонів була низькою та не відрізнялася від активності у носіїв алелів GSTT1 0/0, GSTM1 0/0 та їх поєднання. У контрольній групі активність GST у носіїв алелів GSTT1 AB, GSTM1 AB була вірогідно вищою, ніж у носіїв «нульових» алелів ($P < 0,01$).

3. Відмічено зниження активності глутатіонтрансферази в групі дітей із регіону з інтенсив-

ним забрудненням повітря. Показники активності були вірогідно нижчими як від показників контролю, так і від даних 2-ї групи ($P < 0,001$). Хоча за середніми значеннями не виявлено вірогідних відмінностей активності GST між групами з радіаційним забрудненням і контролем, у дослідній групі переважали особи з низькою активністю ферменту.

4. Перспективи подальших досліджень пов'язані з пошуком нових маркерів екологічної дезадаптації, а також шляхів корекції екопатологічних станів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Трахтенберг И. М. Приоритетные аспекты фундаментальных исследований в токсикологии // Тез. докл. I съезда токсикологов Украины. — К., 2001. — С. 5-6.

2. Геном человека и гены предрасположенности (Введение в предиктивную медицину) / В. С. Баранов, Е. В. Баранова, Т. Э. Иващенко, М. В. Асеев. — СПб.: «Интермедика», 2000. — 272 с.

3. The Role of Genetic Polymorphisms in Environmental Health / N. Samir,

I. Kelada, L. David et al. // Environ Health Perspect. — 2003. — N 111. — P. 1055-1064.

4. Полиморфизм в генах человека, ассоциирующихся с биотрансформацией ксенобиотиков / В. А. Спицын, С. В. Макаров, Г. В. Пай, Л. С. Бычковская // Вестник ВОГиС. — 2006. — Т. 10, № 1. — С. 97-105.

5. Тутельян В. А. Изучение метаболизма действия ксенобиотиков: значение для оценки безопасности жизни // Вестник АМН СССР. — 1984. — № 8. — С. 94-98.

6. Hayes J. D., Strange R. C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences // Pharmacology. — 2000. — N 61. — P. 154-166.

7. Glutathione S-Transferase Theta 1 Gene (GSTT1) null genotype is associated with an increased risk for acquired aplastic anemia in children / U. Dirksen, K. A. Moghadam, C. Mambetova et al. // Pediatric Research. — 2004. — N 55. — P. 466-471.

8. Довкілля Івано-Франківщини: Статистичний збірник / За ред. Л. О. Зброй. — 2004. — 133 с.

9. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. — 1974. — Vol. 249. — P. 7130-7139.

10. Multiplex Polymerase Chain Reaction for the simultaneous analysis of the Glutathione S-Transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms / M. Arand, R. Muhlbauer, J. Hengstler et al. // Analytical Biochemistry. — 1996. — N 236. — P. 184-186.

