



УДК 575.113.2:616.1/9-053.2]:612.014.4

Н. В. Віштак

## АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ Т3801С ГЕНА *CYP1A1* У ДІТЕЙ З ЕКОДЕТЕРМІНОВАНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України», Львів

Система ферментів біотрансформації ксенобіотиків — універсальний механізм, що підтримує внутрішній баланс і сприяє збереженню здоров'я організму людини [1]. У сукупності всі ферменти, які беруть участь у деградації ксенобіотиків, функціонують злагоджено. Відхилення призводить до шкідливих для організму людини, а тим паче дитини, наслідків, оскільки дитячий організм є недосконалим внаслідок анатомо-фізіологічних особливостей. Реакція організму людини на суттєві зміни довкілля може виражатися у формі різноманітних екозумовлених захворювань [2].

Епідеміологічними дослідженнями, проведеними в різних країнах, виявлено достатньо переконливий зв'язок між забрудненням навколишнього середовища і зростанням частоти хвороб органів дихальної, сечовидільної, травної систем, ендокринних і онкологічних захворювань [3; 4]. Слід відзначити недостатню кількість досліджень, присвячених впливу ксенобіотиків на формування екогенетичних захворювань у дітей.

Вираженість реакцій організму, що проявляються посиленням діяльності адаптаційних механізмів у відповідь на

стресову ситуацію, визначається не тільки силою та тривалістю впливу, але й залежить від генетичних особливостей організму [2].

Цитохром Р-450 (*CYP*) 1A1 є ключовим ферментом в I фазі біоактивації ксенобіотиків [5]. Нормальне функціонування арилгідрокарбонгідроксилази, що продукується геном *CYP1A1*, — перший крок у метаболізмі численних поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПВВ) [6].

Проведені дослідження вказують на асоціацію поліморфних форм *CYP1A1* із розвитком певних зл�якісних новоутворень, зі схильністю до багатьох мультифакторних захворювань [7–9].

Поліморфізм Т3801С локалізується в 3'-некодуєчому регіоні, значної прямої функціональної ролі він не відіграє, проте може впливати на зміну експресії гена, стабільності мРНК чи активності ферменту. Алеель Т3801С є асоційованим із підвищеним рівнем ДНК-аддуктів у різних тканинах організму [10; 11].

Екологічна ситуація, що склалася в Західному регіоні України (Івано-Франківська область), та наростання частоти патології багатьох систем організму серед дітей свідчать

про актуальність вивчення причин цього явища та необхідність пошуку нових маркерів індивідуальної чутливості дитячого організму до дії ксенобіотиків.

**Мета роботи** — дослідження частоти розподілу алельного поліморфізму Т3801С гена *CYP1A1* у дітей з екопатологією, пов'язаною з інтоксикацією в умовах тривалої дії токсичних чинників.

### Матеріали та методи дослідження

Для встановлення молекулярно-генетичних маркерів розвитку і перебігу екозумовлених захворювань обстежено 200 дітей з різними проявами екодетермінованих захворювань (загальна дослідна група): 44 особи зі Снятинського району (м. Снятин), який належить до зони радіаційного забруднення після Чорнобильської катастрофи; 40 осіб із Галицького району (м. Бурштин), в якому забруднення довкілля зумовлене викидами в атмосферу Бурштинської електростанції; 53 особи з Долинського району (м. Долина), інтенсивне забруднення навколишнього середовища якого спричинене продуктами нафтопереробки; 63 особи з Калуського району (м. Калуш),



довкілля якого забруднене полутантами, утвореними внаслідок діяльності хімічного комбінату ЗАТ «Лукор». Група контролю (ГК) — здорові діти, відібрані методом випадкової вибірки, що проживають у різних регіонах Івано-Франківської області (157 осіб).

При порівнянні досліджуваних і контрольної груп за частотою спадкової обтяженості відмінностей не виявлено, що вказує на правомірність порівняння генетичних показників у цих групах.

Матеріалом для дослідження служила ДНК, виділена із лейкоцитів периферійної крові пацієнтів. Виділення та очищення ДНК із лейкоцитів периферійної крові проводили набором «GenePak DNA PCR test» (ООО «Лаборатория ИзоГен», Москва, РФ). На подальших етапах дослідження проводили ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro*, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Проводили ПЛР в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», РФ), використовували олігонуклеотидні праймери («Fermentas», Вільнюс, Литва), набір реагентів для ампліфікації «GenePak® PCR Core» (ООО «Лаборатория ИзоГен», Москва, РФ). Ампліфікований продукт піддавали рестрикції, використовуючи ендонуклеазу рестрикції *MspI* (MBI Fermentas).

Специфічність продуктів ПЛР та аналіз рестрикційних фрагментів проводили шляхом електрофорезу у 2–3%-му агарозному гелі. Отримані сигнали порівнювали з маркерами довжин і на основі цього детектували розміри отриманих фрагментів (рис. 1) [12].

### Результати дослідження та їх обговорення

У результаті проведеного генотипування дітей, які про-

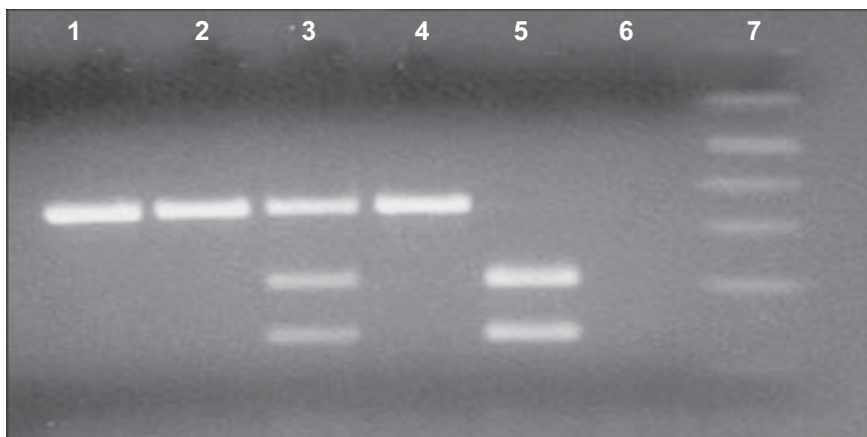


Рис. 1. Електрофореграма рестрикційних фрагментів поліморфного локусу Т3801С гена *CYP1A1* (*MspI*); 2%-й агарозний гель: 1 — продукт ПЛР; 2, 4 — генотип 3801ТТ (340 п. н.); 3 — генотип 3801ТС (340, 200 і 140 п. н.); 5 — генотип 3801СС (200 і 140 п. н.); 6 — негативний контроль; 7 — маркер мол. ваги (100 п. н.)

живають в умовах несприятливого зовнішнього середовища, не було виявлено жодних розбіжностей з даними проведеного генотипування дітей ГК, оскільки всі обстежені — і пацієнти, і особи ГК — проживають на території Західної України і належать до однієї етнічної групи, тобто є генетично гомогенними (табл. 1).

Аналізуючи дані, наведені в табл. 1, дійшли висновку, що частота ідентифікованих генотипів у осіб дослідної групи не відрізнялася від частоти у гомозиготних і гетерозиготних носіїв у ГК. Частота генотипу 3801ТТ зустрічалась у 81,5 % обстежених проти 85 % у ГК. Гетерозиготне носійство 3801ТС ідентифікували у 16,5 % осіб дослідної групи проти 14 % у контрольній. Носійство мутантного генотипу 3801СС

спостерігалось у 2 % дітей дослідної групи, тимчасом як у ГК була зафіксована частота гомозиготного мутантного генотипу у 1 % групи. Така ж картина спостерігається і щодо розподілу алелів: алель Т зустрічався з частотою 90 % у дослідній групі проти 92 % у контрольній, алель С — 10 % у дітей дослідної групи проти 8 % контрольної. Отримані дані збігаються з даними літератури: в Європейській популяції варіант С/С трапляється з частотою 0–5 % і гетерозиготне носійство Т/С — з частотою 9–28 % [8; 13].

У результаті аналізу клініко-лабораторного обстеження дітей загальної групи було відокремлено групу, до якої ввійшла 101 дитина з найбільш тяжким перебігом екопатології (наявність більше трьох хронічних захворювань різних систем

Таблиця 1

### Розподіл частоти алельного поліморфізму Т3801С гена *CYP1A1* (*MspI*) у дітей загальної дослідної групи

| Група                          | Генотип    |           |        |          |         |
|--------------------------------|------------|-----------|--------|----------|---------|
|                                | 3801ТТ     | 3801ТС    | 3801СС | Алель Т  | Алель С |
| Дослідна, n=200<br>абс. (%)    | 163 (81,5) | 33 (16,5) | 4 (2)  | 359 (90) | 41 (10) |
| $\chi^2$ (p>0,05)              | 0,93       | 0,67      | 0,28   | 1,09     | 1,09    |
| Контрольна, n=157,<br>абс. (%) | 134 (85)   | 21 (14)   | 2 (1)  | 289 (92) | 25 (8)  |



Частота алельного поліморфізму T3801C  
гена *CYP1A1* (MspI) у дітей із найбільш тяжким  
перебігом екопатології

| Група                          | Генотип   |           |        |          |         |
|--------------------------------|-----------|-----------|--------|----------|---------|
|                                | 3801TT    | 3801TC    | 3801CC | Алель T  | Алель C |
| Дослідна, n=101<br>абс. (%)    | 74 (73,3) | 27 (26,7) | 0 (0)  | 175 (87) | 27 (13) |
| $\chi^2$                       | 5,74*     | 7,24**    | 1,29   | 3,96*    | 3,96*   |
| Контрольна, n=157,<br>абс. (%) | 134 (85)  | 21 (14)   | 2 (1)  | 289 (92) | 25 (8)  |

Примітка. \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ .

організму одночасно, що вкладається в загальноприйняте поняття «синдрому ксеногенної інтоксикації»).

Отримані результати, наведені в табл. 2, вказують на те, що серед когорти дітей з найбільш тяжким перебігом екопатології рідше за ГК реєструвалося гомозиготне носійство «нормального» генотипу 3801TT гена *CYP1A1*. Частота цього варіанта у дослідній групі становила 73,3 %, у контрольній — 85 %.

З удвічі статистично вірогідно більшою частотою порівняно з ГК було зафіксовано гетерозиготне носійство 3801TC у дітей з «синдромом ксеногенної інтоксикації» — 26,7 проти 14 %. Гомозиготний поліморфний варіант 3801CC у дослідній групі не був зареєстрований взагалі, тобто осіб із генотипом *CYP1A1* 3801CC не виявлено (0 %). Цей показник не відрізнявся від показника частоти мутантного варіанта в осіб ГК — 1 %. Встановлені дані, що стосуються зареєстрованого вдвічі частіше порівняно з ГК гетерозиготного носійства, підтверджують той факт, що носії цього генотипу мають підвищену схильність до розвитку екологічно детермінованих захворювань і їхнього більш тяжкого перебігу. Ризик виникнення екологічно детермінованих захворювань і тяжкого їх перебігу у дітей із генотипом 3801TC збільшується удвічі (OR=2,37; 95 % CI: 1,25–4,47,  $p < 0,01$ ). Ймовірно,

знижена кількість ферменту (арилгідрокарбонгідроксилази) без зміни його каталітичної активності призводить до порушення метаболічної рівноваги детоксикаційної системи при потраплянні ксенобіотиків в організм.

### Висновки

Отримані результати доводять, що генетичний поліморфізм відіграє значну роль у маніфестації патологічних станів у пацієнтів.

1. Проведеним дослідженням встановлено частоту розподілу алелів поліморфного локусу T3801C гена *CYP1A1* у дітей — мешканців Івано-Франківської області. Не було виявлено жодних розбіжностей щодо частот алельного поліморфізму T3801C серед дітей, які проживають в умовах несприятливого довкілля, і у дітей контрольної групи, що вказує на їхню генетичну гомогенність.

2. Генотип 3801TC *CYP1A1* можна вважати маркером схильності до формування і тяжкого перебігу екопатології у дітей. Схильність до розвитку екодетермінованих станів у гетерозиготних носіїв при проживанні на територіях з антропогенним навантаженням збільшується вдвічі.

Доцільним є розширення проведення екогенетичних молекулярних досліджень з метою вивчення механізмів патогенезу соматичних мультифакторних захворювань і пошуку

потенційних генів-кандидатів, задіяних у формуванні патологічних станів, особливо у дітей, які мешкають на техногенно забруднених територіях. Вирішення даного завдання матиме велику цінність для передбачення ймовірності розвитку певних патологічних станів, а також застосування заходів предиктивної медицини.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Баранов В. С. Экологическая генетика и предиктивная медицина / В. С. Баранов // Экологическая генетика. — 2003. — Т. 1. — С. 22–29.
2. Микитенко Д. А. Полиморфизмы ДНК как основа развития мультифакторной патологии (данные литературы и собственных исследований) / Д. А. Микитенко, О. И. Тимченко // Актуальные проблемы акушерства и гинекологии, клинической иммунологии та медичної генетики : зб. наук. праць. — 2009. — Вип. 17. — С. 202–211.
3. Colorectal cancer and genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1*: a case-control study in the Grampian region of Scotland / J. Little, L. Sharp, L. F. Masson [et al.] // Int. J. Cancer. — 2006. — N 119. — P. 2155–2164.
4. Borlak J. N-acetyltransferase 2 (*NAT2*) gene polymorphisms in colon and lung cancer patients / J. Borlak, S. M. Reamon-Buettner // BMC Med. Genet. — 2006. — N 7. — P. 58.
5. Nebert D. W. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk / D. W. Nebert // Mutat Res. — 1991. — P. 267–281.
6. Functional significance of different human *CYP1A1* genotypes / F. Crofts, E. Taidi, J. Trachman [et al.] // Carcinogenesis. — 1994. — N 15. — P. 2961–2963.
7. *CYP1A1*, GST gene polymorphisms and risk of chronic myeloid leukaemia / M. Taspinara, S. E. Aydosu, O. Comeza [et al.] // SWISS MED WKLY. — 2008. — N 138. — P. 12–17.
8. Cytochrome P-450 1A1 Gene Polymorphisms and Risk of Breast Cancer: A HuGE Review / L. F. Masson, L. Sharp, S. C. Cotton, J. Little // American Journal of Epidemiology. — 2005. — N 161 (10). — P. 901–915.
9. Polymorphisms in *CYP1A1* gene are associated with male infertility in a Chinese population / N. Lu, B. Wu, Y. Xia [et al.] // Int. J. Androl. — 2007. — N 25. — P. 1–7.
10. Aromatic DNA adducts and polymorphisms of *CYP1A1*, *NAT2* and



*GSTM1* in breast cancer / P. F. Firozi, M. L. Bondy, A. A. Sahin [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2002. – N 23. – P. 301–306.

11. *Characterization of a major aromatic DNA adduct detected in human breast tissues* / D. Li, M. Wang,

P. L. Firozi [et al.] // *Environ Mol. Mutagen.* – 2002. – N 39. – P. 193–200.

12. *Kawajiri K. Identification of allelic variants of the human CYP1A1 gene* / K. Kawajiri, J. Watanabe, S. Hayashi // *Methods Enzymol.* – 1996. – N 272. – P. 226–232.

13. *Primary DNA damage and genetic polymorphisms for CYP1A1, EPHX and GSTM1 in workers at a graphite electrode manufacturing plant* / M. Moretti, M. Dell’Omo, M. Villarini [et al.] // *BMC Public Health*. – 2007. – N 7. – P. 270–275.

УДК 616.36-002-007:616.316-078.33

А. П. Левицький, І. А. Давиденко, О. М. Сенніков, І. О. Селіванська

## ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНА ДІЯ ЕКСТРАКТУ З ЛИСТЯ ВІНОГРАДУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ СТОМАТИТІ

ДУ «Інститут стоматології НАМН України», Одеса

Виноград — багате джерело біологічно активних речовин (БАР), серед яких найбільшу увагу привертають поліфеноли [1]. До складу поліфенолів входять біофлавоноїди, яким притаманна Р-вітамінна активність [2]. Виявилося, що найбільше Р-вітамінних сполук міститься в листі винограду [3].

Нами було отримано водно-спиртовий екстракт, основу якого становлять БАР з листя винограду.

**Мета** даної роботи — вивчення лікувально-профілактичних властивостей виноградного екстракту на моделі експериментального стоматиту.

### Матеріали та методи дослідження

Водно-спиртовий екстракт із листя винограду сорту Ізабела було отримано після попереднього сушіння та подальшого подрібнення листя (отримання виноградного борошна). Екстракцію БАР здійснювали 80%-м етанолом шляхом змішування виноградного борошна зі спиртом у співвідношенні 1:10 протягом 24 год. Після фільтрації отримували водно-спиртовий екстракт із концентрацією екстрактивних речовин близько 3 %. Після часткової сублімації спирту отримували 6%-й екстракт, який використовували для зрошен-

ня ротової порожнини після розведення в 10 разів.

У роботі було використано щурів лінії Вістар (24 самиці віком 7 міс.), яких було поділено на 3 однакові групи: 1-ша — норма; 2-га — експериментальний стоматит + ополіскування порожнини рота питною водою (двічі на день по 2,5 мл); 3-тя — експериментальний стоматит + ополіскування порожнини рота виноградним екстрактом (двічі на день по 2,5 мл, розведеного в 10 разів).

Експериментальний стоматит відтворювали таким способом. Спочатку у щурів 2-ї та 3-ї груп спричинювали гіпосалівацію (давали 3 дні з питною водою атропін сульфат концентрацією 3 мг/л). Починаючи з другого дня досліду, протягом двох днів на слизову оболонку порожнини рота (СОПР) робили аплікації суспензії бджолоїної отрути (0,5 мг/мл). Аплікації розчину отрути робили двічі на день кількістю по 1 мл на сеанс [4].

Через 1 год після аплікації здійснювали ополіскування порожнини рота водою (група 2) або розведеним екстрактом (група 3).

На 4-й день досліду щурів піддавали етаназії під тіопенталовим наркозом (20 мг/мл) і виділяли СОПР (щоки і язика), які зберігали при температурі -30 °С.

У гомогенатах слизової оболонки щоки (20 мг/мл) і язика (50 мг/мл) визначали рівень маркерів запалення [5]: активність еластази, концентрацію малонового діальдегіду (МДА). Показником мікробного обсіменіння служила активність уреазы [6]. Стан захисних систем визначали за рівнем активності антиоксидантного ферменту каталази [5] і антимікробного ферменту лізоциму [6].

За співвідношенням активності каталази та концентрації МДА розраховували антиоксидантно-прооксидантний індекс (АПІ) [5], а за співвідношенням відносних активностей уреазы і лізоциму — ступінь дисбіозу [6].

### Результати дослідження та їх обговорення

На рис. 1 подано результати визначення активності еластази в СОПР щурів з експериментальним стоматитом. Рівень цього маркера запалення суттєво підвищується при стоматиті та дещо знижується при використанні екстракту (однак  $p > 0,05$ ). Рівень другого маркера запалення — МДА (рис. 2) — також суттєво збільшується при моделюванні стоматиту, однак у цьому випадку екстракт вірогідно знизив концентрацію МДА (практично до норми).

