

З. Р. Кочерга

# ОСОБЛИВОСТІ АЛЕЛЬНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ *GST-S* І АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ ГЛУТАТІОНОВОЇ СИСТЕМИ У НОВОНАРОДЖЕНИХ ІЗ ЗАТРИМКОЮ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОГО РОЗВИТКУ

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»,  
Івано-Франківськ, Україна

УДК 575.113+547.466.+613.952+618.333

З. Р. Кочерга

## ОСОБЕННОСТИ АЛЕЛЬНОГО ПОЛІМОРФИЗМА ГЕНОВ *GST-S* И АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ У НОВОРОЖДЕННЫХ С ЗАДЕРЖКОЙ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ ПЛОДА

ГВУЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», Івано-Франківськ, Україна

Для определения аллельного полиморфизма генов глутатион-S-трансфераз *GSTT1* и *GSTM1* и изучения взаимосвязи ферментативной активности глутатионовой системы у здоровых новорожденных и новорожденных с задержкой внутриутробного развития (ЗВУР) проведено исследование пуповинной крови 57 здоровых доношенных детей и 62 со ЗВУР. Выявлено достоверное отличие между частотами делеционного варианта гена *GSTM1* у здоровых новорожденных и новорожденных со ЗВУР (45,61 и 70,58 % соответственно). Доказано преимущество носителей сочетаний делеционных вариантов аллелей генов *GSTM1*«-»/*GSTT1*«-» в группе новорожденных со ЗВУР (12,90 %) по сравнению с таковыми у здоровых новорожденных (3,5 %). Определено достоверное преимущество активности *GPO* и *GST* у здоровых новорожденных в 1,35 и 2,03 раза ( $p < 0,05$ ). Отмечена тенденция к преобладанию фермента *GRD* у здоровых новорожденных по сравнению с новорожденными со ЗВУР.

**Ключевые слова:** аллельный полиморфизм, система детоксикации ксенобиотиков, синдром задержки внутриутробного развития.

UDC 575.113+547.466.+613.952+618.333

Z. R. Kocherga

## CLINICAL FEATURES OF ALLELIC POLYMORPHISM IN *GST-S* GENES AND GLUTATHIONE SYSTEM ENZYME ACTIVITY IN NEWBORNS WITH INTRAUTERINE GROWTH RESTRICTION

*Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine*

Umbilical blood of 57 healthy full-term newborns and 62 with intrauterine growth retardation (IUGR) has been examined with the aim to determine allelic polymorphism in glutathione S-transferase *GSTT1* and *GSTM1* genes and study of functional status of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in healthy and IUGR newborns. Allelic polymorphism of *GST* genes (*GSTT1* and *GSTM1*) was determined due to the use of modified protocol of multiplex polymerase chain reaction by M. Arand, R. Muhlbauer. Homozygous state of deletion allele in a person ("null genotype") coincided with the absence of the corresponding amplifications, indicating the presence of *GSTM1* «+» and *GSTM1* «-» genotypes.  $\chi^2$  Pearson criterion was used to perform the statistical analysis of the acquired data; on the condition that the sample size didn't exceed 10 observations we used  $\chi^2$  criterion with Yates' correction. The glutathione system includes reduced glutathione and enzymes which provide regeneration of reduced glutathione from the oxidized form: glutathione peroxidase (*GPO*), glutathione reductase (*GRD*) and glutathione-S-transferase (*GST*). Significant difference was found between the frequencies of *GSTM1* gene variant in healthy newborns and newborns with IUGR 45.61 and 70.58 % respectively for the allelic variants of *GSTM1* «-» and 54.39 and 29.41% for allelic variants of *GSTM1* «+». It has been established that the number of carriers with combination of allelic variants of *GSTM1* «-»/*GSTT1* «-» genes in group of IUGR newborns (12.90%) prevailed such indices in healthy newborns (3.50%). The study revealed that the *GPO* and *GST* activity levels in healthy newborns were 1.35 and 2.03 times higher ( $p < 0.05$ ). The tendency for *GRD* enzyme predominance was noticed in healthy newborns as compared to IUGR newborns. The obtained findings may be the indicative of better functioning of antiradical protective systems in healthy newborns in comparison with IUGR ones.

**Key words:** allelic polymorphism, xenobiotic detoxification system, syndrome of intrauterine growth restriction.



## Вступ

В умовах сучасного антропогенного навантаження вивчення особливостей функціонування детоксикаційних систем плода і новонародженого від моменту зачаття дитини до неонатального періоду її життя є вкрай актуальним та необхідним. Дослідження останніх років продемонстрували, що генетично детерміновані функції ферментів детоксикації впливають на чутливість організму до дії негативних факторів довкілля та, як наслідок, можуть підвищувати ризик виникнення багатьох патологічних станів [1].

Серед численних генів сімейства *GST* гени *GSTM1* і *GSTT1* найбільш часто вивчали у зв'язку з асоціаціями з розвитком різних захворювань [2]. Найчастішими поліморфними варіантами для генів *GSTT1* і *GSTM1* є великі делеції, які асоційовані з повною відсутністю ферментативної активності, що робить носіїв таких алелів більш чутливими до несприятливих екзогенних впливів [3; 4].

Ефективність детоксикації ксенобіотиків у організмі залежить від функціональної повноцінності ферментних систем, що відповідають за їх біотрансформацію. З позиції функціональної геноміки, вкрай важливим є визначення активності ферментних систем біотрансформації ксенобіотиків, адже існування функціональних відмінностей між алелями в межах одного локусу зумовлюють алельну диференціацію в експресії рівня білка, ефективності транспортної функції, активності, термостабільності ферменту, імунної відповіді тощо, тому поєднане вивчення алельного поліморфізму генів *GST-s* й активності ферментів глутатіонової системи є важливим доповненням до вивчення ролі глутатіонової системи у стійкості до екзо- і ендогенних чинників. До

цих ферментів належать глутатіонпероксидаза (*GPO*), глутатіонредуктаза (*GRD*) та глутатіон-S-трансфераза (*GST*). У зв'язку з вищевикладеним, вивчення стану системи глутатіону, зокрема при синдромі затримки внутрішньоутробного розвитку плода (ЗВУР), може мати не лише науково-теоретичне, а й практичне значення.

**Мета** роботи — вивчення алельного поліморфізму генів глутатіон-S-трансфераз *GSTT1* і *GSTM1* та ферментної активності глутатіонової системи у здорових новонароджених і новонароджених із синдромом затримки внутрішньоутробного розвитку плода.

## Матеріали та методи дослідження

Матеріалом для дослідження була пуповинна кров 119 новонароджених Івано-Франківської області, з них 57 — здорових доношених дітей та 62 новонароджених зі ЗВУР. Алельний поліморфізм *GSTT1* та *GSTM1* генів *GSTs* визначали із використанням модифікованого протоколу мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції за М. Arand, R. Muhlbauer [5]. Ампліфікацію виділеної ДНК проводили в ампліфікаційній суміші з трьома парами специфічних праймерів у автоматичному термоциклері Applied Biosystems 2700. Ампліфіковані фрагменти розділяли із використанням горизонтального електрофорезу в 2 % агарозному гелі із забарвленням бромистим етидієм. Аналізували отримані амплікони за допомогою трансільюмінатора «Біоком» з подальшим архівуванням у персональному комп'ютері за допомогою відеосистеми «ViTran» (Російська Федерація). Гомозиготному стану делеційного алеля в особи («нульовому генотипу») відповідала відсутність відповідних ампліфікатів, що свідчило про наявність генотипів *GSTT1*«-» та *GSTM1*«-».

Функціональний стан ферментативної системи детоксикації ксенобіотиків вивчали у цих же новонароджених. Активність *GPO* оцінювали з реакції взаємодії відновленого глутатіону з гідроперекисом третбутилу [6], *GRD* визначали за швидкістю зміни оптичної щільності при 340 нм, зумовленого окисненням НАДФ • Н [7]. Активність *GST* оцінювали за швидкістю утворення глутатіон-S-кон'югатів між відновленим глутатіоном і 1-хлор-2,4-динітробензолом [8]. Для статистичного аналізу отриманих даних використовували критерій  $\chi^2$  з поправкою Йетса (Програма Statistica 10.0, StatSoft Inc.) та відношення шансів (Odds Ratio (OR)).

## Результати дослідження та їх обговорення

Виявлено, що делеційний варіант гена *GSTT1* реєструвався з однаковою частотою у здорових новонароджених і у новонароджених з недоношеністю або ЗВУР — відповідно 19,30 та 19,35 % [ $\chi^2=0,00$ ; OR=1,00 (0,40–2,50);  $p<0,05$ ] (табл. 1). Була виявлена вірогідна різниця між частотами делеційного варіанта гена *GSTM1* у новонароджених зі ЗВУР і здорових новонароджених Івано-Франківської області — 66,13 та 45,61 % відповідно [ $\chi^2=5,08$ ; OR=2,33 (1,11–4,89);  $p>0,05$ ] для алельного варіанта *GSTM1*«-» та 33,87 і 54,39 % для алельного варіанта *GSTM1*«+» [ $\chi^2=5,08$ ; OR=0,43 (0,20–0,90);  $p>0,05$ ].

При порівнянні частот комбінацій генотипів у здорових новонароджених і новонароджених зі ЗВУР найбільша різниця спостерігалася для поєднань алельних варіантів *GSTM1*«-»/*GSTT1*«-» — 3,50 та 12,90 % відповідно (табл. 2).

У результаті метаболічних перетворень речовин в організмі людини утворюються вільні радикали, які характеризуються високою хімічною активністю, спричинюють процеси пероксидації ліпідів, білків, нук-



Розподіл частот генотипів генів *GSTM1*, *GSTT1* у здорових новонароджених і новонароджених із затримкою внутрішньоутробного розвитку

Ген	Генотип	ЗВУР, n=62	Здорові, n=57	$\chi^2$	OR	95%CI	p
<i>GSTM1</i>	<i>GSTM1</i> «-»	41 (66,13 %)	26 (45,61 %)	5,08*	2,33	1,11–4,89	<0,05
	<i>GSTM1</i> «+»	21 (33,87 %)	31 (54,39 %)	5,08*	0,43	0,20–0,90	<0,05
<i>GSTT1</i>	<i>GSTT1</i> «-»	12 (19,35 %)	11 (19,30 %)	0,00	1,00	0,40–2,50	>0,05
	<i>GSTT1</i> «+»	50 (80,65 %)	46 (80,70 %)	0,00	0,99	0,40–2,48	>0,05

Примітка. \* — різниця достовірна

Таблиця 2

Розподіл частоти поєднань генотипів генів *GSTM1*, *GSTT1* у новонароджених Прикарпаття

Поєднання генотипів	ЗВУР, n=62	Здорові, n=57	$\chi^2$	OR	95%CI	p
<i>GSTM1</i> «+»/ <i>GSTT1</i> «+»	17 (27,42 %)	22 (38,60 %)	1,68	0,60	0,28–1,30	>0,05
<i>GSTM1</i> «+»/ <i>GSTT1</i> «-»	4 (6,45 %)	9 (15,79 %)	2,66	0,37	0,11–1,27	>0,05
<i>GSTM1</i> «-»/ <i>GSTT1</i> «+»	33 (53,23 %)	24 (42,11 %)	1,47	1,56	0,76–3,20	>0,05
<i>GSTM1</i> «-»/ <i>GSTT1</i> «-»	8 (12,90 %)	2 (3,50 %)	2,29	4,07	0,83–20,01	>0,05

лейнових кислот. Вони вступають у взаємодію зі структурами клітини, призводять до їх пошкодження, найчастіше мембрани, і зумовлюють розвиток патологічного процесу [8]. Ушкоджувальний вплив вільних радикалів зменшують ферменти антиоксидантного захисту, зокрема системи глутатіону. У нашому дослідженні ферментів глутатіонової системи встановлено, що активність глутатіонпероксидази (*GPO*) у здорових новонароджених статистично достовірно у 1,35 разу переважала таку у новонароджених зі ЗВУР. Цей факт може бути доказом того, що при ЗВУР антиоксидантний статус організму є нижчим, ніж у здорових новонароджених, оскільки глутатіонпероксидаза — один із найважливіших ферментів, що запобігає виникненню і розвитку процесів пероксидації. За рахунок руйнування та інактивації перекису водню і гідроперексидів, зниження активності *GPO* у дітей зі ЗВУР опосередковано може вказувати на накопичення пероксидних радикалів токсичних сполук кисню.

Відомо, що у реакціях, які каталізуються *GPO*, утворюється окиснений глутатіон (*GSSG*), для його відновлення в клітинах існує спеціальний фер-

мент — *GRD* [8]. Саме *GRD* підтримує високу внутрішньоклітинну концентрацію відновленого глутатіону (*GSH*), каналізуючи зворотне *NAFDFH*-залежне відновлення *GSSG* з утворенням двох молекул *GSH*. Нами виявлено тенденцію до переваги *GRD* у здорових новонароджених порівняно із такою у новонароджених зі ЗВУР. Не менш важливими в системі детоксикації ксенобіотиків і зниження активності прооксидантних чинників є глутатіон-S-трансфераза, яка кон'югує з *GSH* токсичні продукти і тим самим сприяє їх виведенню з організму [9]. Отримані результати переконливо доводять високу активність *GST* у здорових новонароджених — у 2,05 разу порівняно із новонародженими зі ЗВУР.

Отримані результати можуть свідчити про краще функціонування у здорових новонароджених захисних протирадикальних систем порівняно із такими у новонароджених зі ЗВУР. Об'єктивним показником функції генів детоксикації ксенобіотиків є активність ферментів, які кодуються генами.

### Висновки

Виявлена достовірна різниця між частотами поліморфного

варіанта *GSTM1*«-» у новонароджених зі ЗВУР і здорових новонароджених: 66,13 % у новонароджених із недоношеністю або ЗВУР і 45,61 % — у здорових новонароджених [ $\chi^2=5,08$ ;  $OR=2,33$  (1,11–4,89);  $p>0,05$ ].

При порівнянні частот комбінацій генотипів у здорових новонароджених і новонароджених зі ЗВУР найбільша різниця спостерігалась для поєднань алельних варіантів *GSTM1*«-»/*GSTT1*«-» — 3,50 та 12,90 % відповідно.

Виявлено достовірну перевагу активності *GPO* та *GST* у здорових новонароджених у 1,35 та 2,03 разу ( $p<0,05$ ) порівняно з такою у дітей зі ЗВУР.

Встановлено тенденцію до збільшення активності ферменту *GRD* у здорових новонароджених Прикарпаття порівняно із такою у новонароджених зі ЗВУР.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Children's health and the environment: public health issues and challenges for risk assessment* / P. J. Landrigan, C. A. Kimmel, A. Correa, B. Eskenazi // *Environ Health Perspect.* — 2004. — Vol. 112, № 2. — P. 257–265.

2. *Interaction between GSTM1/GSTT1 polymorphism and blood mercury on birth weight.* / B. E. Lee, Y. C. Hong, H. Kim [et al.] // *Environ Health*



Perspect. – 2010. – Vol. 118. – P. 437–443.

3. Шунько Є. Є. Впровадження Концепції подальшого розвитку перинатальної допомоги в Україні / Є. Є. Шунько // Неонатологія, хірургія та перинатальна медицина. – 2011. – Том I, № 1. – С. 10–16.

4. Low level maternal smoking and infant birth weight reduction: genetic contributions of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms / A. Danileviciute, R. Grazuleviciene, A. Paulauskas [et al.] // BMC Pregnancy Child birth. – 2012. – Vol. 26, N 12. – P. 161.

5. 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.] // Anal. Biochem. – 1996. – Vol. 236. – P. 184–186.

6. Власова С. Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С. Н. Власова, Е. И. Шабунина, И. А. Переслягина // Лабораторное дело. – 1990. – № 8. – С. 19–21.

7. A longitudinal study of the effect of GSTT1 and GSTM1 gene copy number on survival / L. Christiansen, C. Brasch-Andersen, L. Bathum [et al.] // Mech Ageing Dev. – 2006. – Vol. 127, N 7. – P. 597–599.

8. Hayes J. D. Glutathione Transferases / J. D. Hayes, J. U. Flanagan, I. R. Jowsey // Ann Rev Pharm Toxicol. – 2005. – Vol. 45. – P. 51–88.

9. Особливості активності глутатион-S-трансферази в організмі дітей в умовах дії різних факторів забруднення довкілля / С. О. Печеник, Н. С. Лук'яненко, Г. Р. Акоюн [та ін.] // Одеський медичний журнал. – 2007. – № 3 – С. 76–80.

#### REFERENCES

1. Landrigan P.J., Kimmel C.A., Correa A., Eskenazi B. Children's health and the environment: public health issues and challenges for risk assessment. *Environ Health Perspect* 2004; 112, 2: 257-265.

2. Lee B.E., Hong Y.C., Kim H. et al. Interaction between GSTM1 GSTT1 polymorphism and blood mercury on birth weight. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 437-43.

3. Shunko Ye.Ye. Implementation of the further development of perinatal care concept in Ukraine. *Neonatology, khirurgiia ta perynatalna medytsyna* 2011; 1: 10-16.

4. Danileviciute A., Grazuleviciene R., Paulauskas A. et al. Low level maternal smoking and infant birth weight reduction: genetic contributions of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms. *BMC*

*Pregnancy Child birth* 2012; 26, 12: 161.

5. Arand M., Muhlbauer R., Hengstler J. et al. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal. Biochem.* 1996; 236: 184-186.

6. Vlasova S.N., Shabunina E.I., Pereslyagina I.A. Activity of glutathione-dependent enzymes of erythrocytes at chronic liver diseases in infants. *Laboratornoe delo* 1990; 8: 19-21.

7. Christiansen L., Brasch-Andersen C., Bathum L., Kruse T.A., Christensen K. A longitudinal study of the effect of GSTT1 and GSTM1 gene copy number on survival. *Mech Ageing Dev* 2006; 127, 7: 597-599.

8. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione Transferases. *Ann Rev Pharm Toxicol* 2005; 45: 51-88.

9. Pechenyk S.O., Lukianenko N.S., Akopian H.R., et al. Clinical features of glutathione-S-transferase in child's organism under the influence of different contamination factors. *Odeskyi medychnyi zhurnal* 2007; 3: 76-80.

Надійшла 3.02.2017

Рецензент д-р мед. наук,  
проф. О. О. Старець

УДК 616.31-002-06-084

А. В. Пасечник, Л. С. Кравченко, А. М. Пасечник, В. И. Лунгу, П. А. Лозенко

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕСТНОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ЭКСТРАКЦИИ ЗУБОВ

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

УДК 616.31-002-06-084

А. В. Пасечник, Л. С. Кравченко, А. М. Пасечник, В. И. Лунгу, П. А. Лозенко  
ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕСТНОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ЭКСТРАКЦИИ ЗУБОВ

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Проведенные нами исследования доказывают высокую эффективность сочетанного локального применения нового мукозального геля «Апиор» и пульсирующего электромагнитного поля для профилактики и лечения воспалительных осложнений у пациентов в раннем послеоперационном периоде после экстракции зубов. По сравнению с пациентами, у которых противовоспалительная терапия проводилась традиционными методами, у больных, в схему лечения которых включали местное применение апиогеля и магнитотерапию, отмечено снижение частоты выявления отека, гиперемии слизистой оболочки десен, дискомфортных ощущений в области проведенной операции. Наблюдались более быстрое уменьшение болезненности, воспаления, нормализация скорости кровотока в тканях слизистой полости рта после операции. Новый метод сокращает сроки восстановления структурно-функциональной целостности слизистой оболочки, способствует профилактике развития воспалительных осложнений, повышая эффективность лечения.

**Ключевые слова:** магнитотерапия, мукозальный апигель, воспаление, микроциркуляция, экстракция зубов.

