

качестве скринингового лабораторного признака в условиях Украины. Предложен алгоритм диагностики SCID. Обсуждается целесообразность внедрения в практику неонатального скрининга SCID.

**Ключевые слова:** тяжелый комбинированный иммунодефицит, дети, инфекционные осложнения, ранняя диагностика.

## EARLY DIAGNOSTICS OF SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENCIES

*L.V. Kostiuchenko*

**Abstract.** Severe combined immunodeficiency is a big group of genetically determined immunological defects with a profound quantitative and/or functional deficiency of T- and B-cells, and sometimes NK-cells. The article contains our own experience of observation of patients with severe combined immunodeficiencies to establish early clinical and laboratory markers of SCID. A clinical, genealogical and laboratory analysis of 22 SCID patients and a comparison group was performed, the most common symptoms of this kind of PID and the time of their appearance were identified. It was found that the SCID patients do not have specific signs up to the manifestation of clinical symptoms of infections, and as early signs of the disease can be considered an eventful family history with children deaths at early age and lymphopenia below  $3.0 \times 10^9 / l$  in 77,3 % of patients that can be used as screening laboratory finding in our country. An algorithm for diagnosis of SCID was proposed and the feasibility of practical implementation of neonatal screening for this disease was discussed.

**Key words:** severe combined immunodeficiency, children, infectious complications, early diagnostics.

Western Ukrainian Specialized Children's Medical Center (Lviv)

Рецензент – доц. Г.Д. Коваль

Buk. Med. Herald. – 2014. – Vol. 18, № 4 (72). – P. 63-69

Надійшла до редакції 14.10.2014 року

© Л.В.Костюченко, 2014

УДК 618.19-006.6-02:575.224]-036.8(477.85)

<sup>1</sup>Т.В. Крук, <sup>1</sup>О.П. Пересунько, <sup>2</sup>Р.А. Волков

## МУТАЦІЇ ГЕНІВ ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗИ У ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ТА ЇХ БЛИЗЬКИХ РОДИЧІВ У ЧЕРНІВЕЦЬКІЙ ОБЛАСТІ

<sup>1</sup>Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

<sup>2</sup>Чернівецький національний університет ім. Ю. Федьковича

**Резюме.** На основі проведеного дослідження генотипування двох варіантів (GSTP1 та GSTT1) мутацій гена глутатіон-S-трансферази у плазмі крові хворих на рак молочної залози, родичів I ступеня спорідненості та практично здорових жінок Чернівецької області, робиться висновок про доцільність використання цього

дослідження як додаткового молекулярно-генетичного маркера визначення групи високого ризику захворювання, як прогностичного фактору для подальшого нагляду та уточнюючої діагностики.

**Ключові слова:** глутатіон-S-трансфераза, генотипування мутацій, рак молочної залози, родичі, прогноз.

**Вступ.** Рак молочної залози (РМЗ) – гетерогенне за етіологією захворювання, від 5 % до 18 % випадків якого є генетично детермінованими [1, 8, 10]. За даними молекулярно-генетичних досліджень, мутації таких генів, як p53, BRCA1 та BRCA2, GST, PTEN та інші, пов'язані з високим ризиком розвитку раку молочної залози.

Відомо, що однією з груп генів, які асоціюються з розвитком різних захворювань, у тому числі й онкологічних, є гени ферментів детоксикації ксенобіотиків [3, 4, 9].

Глутатіон-S-трансфераз (GST) (фермент II фази детоксикації ксенобіотиків) відіграє суттєву роль у забезпеченні захисту клітин від вільних радикалів, регуляції процесів перекисного окиснення ліпідів, алкілуванні білків, метаболізмі великої групи ксенобіотиків, у тому числі хіміо-

терапевтичних препаратів [1, 4]. Гени GST характеризуються вираженим природним поліморфізмом, зумовленим відмінностями в послідовності нуклеотидів. Нині найбільш вивченим є поліморфізм генів GSTT1, GSTM1 та GSTP1. Приблизно половина осіб європейської раси – гомозиготи за делецією гена GSTM1, близько 15 % – за делецією гена GSTT1 [7, 6].

Поліморфізм гена GSTP1 пов'язаний зі зміною нуклеотиду аденіну (A) на гуанін (G), що призводить до заміни амінокислоти в пептидного ланцюга молекули ферменту, викликаючи зниження його активності і, отже, збільшення накопичення в організмі токсичних речовин. За рахунок цього носії генотипу G/G мають підвищений ризик розвитку різних форм раку. В осіб, що мають варіант G, може бути підвищена чутливість до

© Т.В. Крук, О.П. Пересунько, Р.А. Волков, 2014

препаратів, які використовуються для хіміотерапії раку, та при цьому погіршити її переносимість.

Ген GSTT1 кодує амінокислотну послідовність ферменту тета-1, глутатіон-S-трансферази, який міститься в еритроцитах і бере участь в очищенні організму від багатьох ксенобіотиків (зокрема хлорметанів та інших промислових канцерогенів). У разі делеції (відсутності) гена GSTT1 фермент тета-1, глутатіон-S-трансфераза не утворюється, у результаті чого здатність організму позбавитися від деяких шкідливих сполук значно знижується. Це призводить до підвищення ризику розвитку різних форм раку, а також ішемічної хвороби серця [2, 5, 7].

У літературі існує багато праць щодо вивчення поліморфізму генів GST для визначення молекулярно-генетичних факторів прогнозу токсичності хіміотерапевтичного лікування хворих на РМЗ. Подальші дослідження необхідні для розробки не тільки індивідуального підходу до призначення хіміотерапії, але й для визначення ризику розвитку раку.

**Мета дослідження.** Вивчити варіанти мутації гена глутатіон-S-трансферази (GST) – GSTT1 та GSTP1 у хворих на рак молочної залози, родичів I ступеня спорідненості та практично здорових жінок.

**Матеріал і методи.** Генотипування мутацій 313A→G у гені GST P1, GST-T1del у гені GST T1 та CGC→CCC у гені p53 проведені в крові 101 хворої на РМЗ, 50 родичів I ступеня спорідненості, 50 пацієнтів – практично здорові (контрольна група).

Загальну геномну ДНК виділяли з крові згідно зі стандартним протоколом з використанням протеїнази K та додецилсульфату натрію як детергенту [6, 9].

Для генотипування проводили ампліфікацію відповідного фрагменту ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням розроблених нами пар праймерів RV1001+ RV1002, RV1003 + RV1004 для гена BRCA1, RV1103+ RV1104 для гена GST T1, RV1301+ RV1302 для гена GST P1, RV1303+ RV1304 для гена p53. Кількість ДНК для проведення ПЛР становила 50 нг на реакцію. Ампліфікацію ДНК проводили в середовищі такого складу: 1× буфер для ПЛР (PCR-buffer, Qiagen, США), MgCl<sub>2</sub>- 2 мМ, суміш dNTP – 0.4 мМ кожного, праймери – 1 мМ кожного, ДНК-полімераза (HotStartTaq, Qiagen) – 3 од. активності на реакцію. Загальний об'єм реакційної суміші складав 50 мкл. ПЛР проводили з використанням ампліфікатора PTC-100 (MJ Research Inc, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази – 95°C, 2 хв; (2) денатурація ДНК – 94°C, 45 с; (3) гібридизація праймерів – 54°C для праймерів RV1001+ RV1002 та RV1003 + RV1004; 58 °C для всіх інших праймерів, 40 с; (4) синтез ДНК – 72°C, 1 хв; (5) закінчення ампліфікації – 72°C, 8 хв; (6) припинення реакції – 4°C. Загальна кількість циклів ампліфікації – 35.

Аналіз результатів ПЛР проводили методом електрофорезу у 2 % агарозному гелі (Маниатис и др., 1984). Для візуалізації ДНК гель забарвлювали етидієм бромідом та фотографували в ультрафіолетовому світлі на установці GelDoc 2000 (BioRad, США). Для визначення довжини отриманих фрагментів їх електрофоретичну рухливість порівнювали з рухливістю ДНК-маркера Gene Ruler DNA Leader Mix (Fermentas, Литва).

Для виявлення поліморфізму в генах, GST P1, p53 отримані продукти ПЛР обробляли рестриктазами. Для гена GST P1 використовували рестриктазу Alw 26I; для гена p53 - рестриктазу Bsh 1236I. Реакцію проводили згідно з рекомендаціями виробника ферментів (Fermentas, Литва). Отримані рестриктні фрагменти аналізували методом електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі у випадку коротких фрагментів або 2 % агарозному гелі в інших випадках (Маниатис и др., 1984). Виявлення делецій у ген GSTT1 здійснювали методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Як позитивний контроль успішності ПЛР використовували ампліфікацію фрагментів гена BRCA1. Гомозиготні форми із делецією обох копій гена GSTT1 ідентифікували за відсутністю відповідного фрагмента на електрофореграмі. Відповідно, наявність цих фрагментів на електрофореграмах свідчила про гомо- або гетерозиготність за нормальною копією гена. Очікувані довжини фрагментів ДНК та розташування сайтів пізнавання застосованих рестриктаз проводили за допомогою пакета програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR із використанням послідовності відповідних генів, яка наявна в базі даних Genbank.

**Результати дослідження та їх обговорення.** При визначенні частоти алелів, генотипів, генотипів простого одонуклеотидного поліморфізму GSTP1 промоторної зони гена GST у хворих на рак молочної залози вивчено наступне.

Встановлено, що „дикий” алель траплявся в досліджуваних хворих на рак молочної залози у 49,5 % (n=50) (табл. 1), тоді як патологічний „мутантний” P1 варіант ідентифікували у 8,9 % (n=9) випадків. Серед жінок контрольної групи „дикий” алель траплявся в 48 % (n=24), а мутація в гомозиготі – 4 % (n=4).

Статистична обробка отриманих результатів (табл. 1) засвідчила, що „мутантний” алель однаково часто траплявся як серед хворих на РМЗ, так і серед практично здорових осіб контрольної групи (p>0,05).

Розподіл генотипів за поліморфним варіантом GTSP1 гена GST серед досліджуваних відповідає очікуваному при рівновазі Харді-Вайнберга (табл. 2). Серед досліджуваних хворих однаково часто виявлені як гомозиготи за домінтними алелями (50 %), так і гетерозиготи (41,6 %; табл. 2).

При аналізі груп дослідження встановлено, що домінуючим генотипом серед хворих на РМЗ

Таблиця 1

**Результати досліджень гена GST – P1 у хворих на рак молочної залози,  
родичів та контрольної групи, абс., %**

Ген GST – P1			
Хворі на рак молочної залози (n=101)	«ii» 50	Гомозигота норма	49,5%
	«vv» 9	Гомозигота мутант	8,9%
	«iv» 42	Гетерозигота	41,6%
Родичі (n=50)	«ii» 25	Гомозигота норма	50%
	«vv» 3	Гомозигота мутант	6%
	«iv» 22	Гетерозигота	44%
Контрольна група (n=50)	«ii» 24	Гомозигота норма	48%
	«vv» 4	Гомозигота мутант	8%
	«iv» 22	Гетерозигота	44%
Контрольна група+родичі (n=100)	«ii» 49	Гомозигота норма	49%
	«vv» 7	Гомозигота мутант	7%
	«iv» 44	Гетерозигота	44%

Таблиця 2

**Частоти генотипів GTSP1 поліморфізму гена GST у хворих на рак молочної залози**

Групи	Генотип			Pii	Pvv	Ho	He	D	$\chi^2$	P
	ii	vv	iv							
Хворі на РМЗ (n=101)	50	9	42	0,43	0,28	0,36	0,37	0,32	3,06	0,04
Контрольна (n=50)	24	4	22	0,34	0,36	0,73	0,52	0,33	3,39	0,06
Всього	74	13	64	0,62	0,51	0,31	0,58	0,19	0,89	0,32

Примітка. 1. Pii – відносна частота алеля ii, Pvv – відносна частота алеля vv. 2. Ho і He – фактична і очікувана гетерозиготності відповідно. 3. D – відносне відхилення очікуваної гетерозиготності від фактичної. 4.  $\chi^2$  – критерій справедливості „нульової“ гіпотези між фактичною і очікуваною гетерозиготністю

Таблиця 3

**Результати досліджень гена GSTT1 у хворих на рак молочної залози,  
родичів та контрольної групи**

Ген GSTT1			
Хворі на рак молочної залози (n=101)	«+» 68	здорові	67,3 %
	«-» 33	мутант	32,7 %
Родичі (n=50)	«+» 44	здорові	88 %
	«-» 6	мутант	12 %
Контрольна група (n=50)	«+» 39	здорові	78 %
	«-» 11	мутант	22 %
Контрольна група+родичі (n=100)	«+» 83	здорові	83 %
	«-» 17	мутант	17 %

Таблиця 4

**Частоти дикого та мутаційного алеля поліморфізму гена GSTT1**

Групи спостереження	алель (дикий)	алель (мутант)	Статистична обробка	
			$\chi^2$	P
Хворі на ХС (n=101)	68 (67,3%)	33 (32,7%)	7,06;	<0,05
Контрольна (n=50)	39 (78%)	11 (22%)		

був гомозиготний СС варіант (49,5 %), у той час як частки інших двох – меншими (41,6 % гетерозигот і 8,9 % Т-„мутантних” гомозигот відповідно (табл. 1).

Контрольна група характеризувалася вищим відсотком гомозигот (48 %; n=24) при менших частках гетерозигот за іv – варіантом генотипів (44 %; n=22) (табл. 1). У той же час частка гомозигот за мутантним іі – генотипом (8 %; n=4) практично збігалася з аналогічними показниками у хворих на РМЗ (8,9 %; n=9).

Аналіз розподілу часток генотипів за поліморфним віриантом GSTP1 гена GST засвідчив, що в контрольній групі даний розподіл відповідає очікуваному при рівновазі Харді-Вайнберга (табл. 2) при наявності тенденції до збільшення рівня гетерозиготності ( $p > 0,05$ ). Серед хворих на РМЗ відмічене статистично вірогідне збільшення фактичної гетерозиготності ( $p > 0,05$ ).

Також нами проведено вивчення частоти алелів, гаплотипів, генотипів простого однонуклеотидного поліморфізму промоторної зони гена GSTT1 у хворих на РМЗ, родичів та контрольної групи (табл. 3).

Серед 101 хворої на РМЗ у 33 випадках були виявлені мутації гена GSTT1 (32,7 %). У контрольній групі ці мутації спостерігалися у 22 % випадків (n=11). У родичів хворих мутаційно алель траплявся у 12 % (n=6).

У результаті молекулярно-генетичного дослідження встановлено, що „дикий” алель виявлено в більшості досліджуваних (табл. 4): у 67,3 % (n=68) випадків, тоді як патологічний „мутантний” варіант ідентифікували у 32,7 % (n=33) випадків.

Характерним для контрольної групи було переважання дикою алеля – 78 % (n=39).

### Висновки

1. Вперше проведено генотипування мутацій генів глутатіон-S-трансферази показало наявність мутантних гомозиготних варіантів за GSTP1 – у 9 (8,5 %) хворих на рак молочної залози, 3 (6 %) родичів, 4 (8 %) пацієнок контрольної групи; за GSTT1 – у 33 (23,7 %) хворих на рак молочної залози, 6 (12 %) родичів, 11 (22 %) пацієнок контрольної групи.

## МУТАЦИИ ГЕНОВ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИХ БЛИЗКИХ РОДСТВЕННИКОВ В ЧЕРНОВИЦКОЙ ОБЛАСТИ

*Т.В. Крук, А.П. Пересунько, Р.А. Волков*

**Резюме.** На основе проведенного исследования генотипирование двух вариантов (GSTP1 и GSTT1) мутаций гена глутатион-S-трансферазы (GST) в плазме крови больных раком молочной железы, родственников I степени родства и практически здоровых женщин Черновицкой области, делается вывод о целесообразности использования этого исследования в качестве дополнительного молекулярно-генетического маркера определения группы высокого риска заболевания как прогностического фактора для дальнейшего наблюдения и уточняющей диагностики.

**Ключевые слова:** глутатион-S-трансфераза, генотипирование мутаций, рак молочной железы, родственники, прогноз.

2. Високі значення показників GSTP1, GSTT1 не тільки у хворих на рак молочної залози, але й у практично здорових родичів та контрольній групі – можуть бути рекомендовані як додатковий молекулярно-генетичний маркер високого ризику захворювання на рак молочної залози як прогноз для жінок Карпатського регіону України.

### Література

1. Вікові особливості поліморфізму генів глутатіон-S-трансфераз M1 і T1 у мешканців Одеської області / О.О. Сметюк, М.М. Чеснокова, Ю.І. Бажора // Досягнення біол. та мед. – 2009. – № 2 (14). – С. 65-67.
2. Поліморфізм в генах людини, асоціюючихся з біотрансформацією ксенобіотиків / В.А. Спицын, С.В. Макаров, Г.В. Пай [и др.] // Вестн. ВОГиС. – 2006. – Т. 10, № 1. – С. 97-105.
3. Расса Х. Сравнительная оценка способов выделения ДНК из гистологических срезов опухолей молочной железы / Х. Расса // Актуал. пробл. акуш. і гінекол., клін. імунол. та мед. генетики: Зб. наук. праць. Вип. 14. – Київ-Луганськ, 2007. – С. 282-288.
4. Фетисова И.Н. Поліморфізм генів глутатіон-S-трансфераз в семьях с первичным бесплодием / И.Н. Фетисова // Мед. генетика. – 2006. – Т. 5, № 11 (53). – С. 31-34.
5. Association between glutathione-S-transferase GSTP1 genotypes, GSTP1 over-expression, and outcome in epithelial ovarian cancer / R.E. Howells, K.K. Dhar, P.R. Hoban [et al.] // Int. J. Gynecol. Cancer. – 2004. – Vol. 14. – P. 242-250.
6. Association of GSTP1 Polymorphism and Survival for Esophageal Cancer / J.M. Lee, T.M. Wu, Y.C. Lee [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2005. – Vol. 11. – P. 4749-4753.
7. Cisplatin-induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione S-transferase genotypes in testicular cancer survivors / J. Oldenburg, S.M. Kraggerud, M. Cvancarova [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2007. – Vol. 25. – P. 708-714.
8. Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study / D.M. Gertig, M. Stampfer, C. Haiman [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2004. – Vol. 7, № 11. – P.1001-1005.
9. Glutathione S-Transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy / T. Lecomte, B. Landi, P. Beaune [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2006. – Vol. 12. – P. 3050-3056.
10. McIlwain C.C. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy / C.C. McIlwain, D.M. Townsend, K.D. Tew // Oncogene. – 2006. – Vol. 25. – P.1639-1648.

**MUTATIONS IN THE GENES OF GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE IN PATIENTS WITH BREAST CANCER AND THEIR CLOSE RELATIVES LIVING IN CHERNIVTSI REGION***T.V. Kruk, O.P. Peresunko, R.A. Volkov*

**Abstract.** Based on genotyping study of two variants (GSTP1 and GSTT1) of gene mutations glutathione-S-transferase (GST) in the blood plasma of patients with breast cancer, relatives of I degree of kinship and healthy women of Chernivtsi region, we made a conclusion as to the usefulness of this study as additional molecular genetic marker, determining high-risk disease as a prognostic factor for further observation and specifying diagnostics.

**Key words:** glutathione-S-transferase, genotyping mutations, breast cancer, relatives, prognosis.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. Т.В. Сорокман

Buk. Med. Herald. – 2014. – Vol. 18, № 4 (72). – P. 69-73

Надійшла до редакції 21.10.2014 року

© Т.В. Крук, О.П. Пересунько, Р.А. Волков, 2014

УДК 615.273:[616.314-77:616:379-008.64

*О.О. Максимів***ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ КВЕРЦЕТИНУ ЯК ТЕРАПІЇ СУПРОВОДУ ПРИ ПРОТЕЗУВАННІ ПОВНИМИ ЗНІМНИМИ ПРОТЕЗАМИ У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2-ГО ТИПУ**

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

**Резюме.** Вивчено ефективність застосування кверцетину як терапії супроводу при протезуванні повними знімними протезами для обробки слизової оболонки протезного ложа для профілактики запальних та дистрофічних розладів. Доведено високу ефективність запропонованих профілактичних заходів відносно підготовки слизової оболонки у хворих на цукровий діабет 2-го типу. Застосування кверцетину із комбінованим ентеральним та місцевим способом (аплікація на тканини протезного ложа) вірогідно зменшує клінічні прояви запалення, призводить до відновлення балансу оксидантно-

протиоксидантної системи і, за ефективністю, вище від традиційного ентерального введення препарату. Враховуючи те, що ефект від лікувально-профілактичних заходів нестійкий, редукується за деякими показниками упродовж шести місяців після закінчення курсу лікування, тому потребує проведення повторних курсів у даній категорії пацієнтів два рази на рік.

**Ключові слова:** протезне ложе, цукровий діабет 2-го типу, перекисне окиснення ліпідів, протиоксидантна дія, профілактика.

**Актуальність проблеми.** Захворювання тканин пародонта та слизової оболонки (СО) на сьогоднішній день характеризуються високою розповсюдженістю в популяції [1, 5, 6]. Частота та тяжкість цих захворювань є значно вищими в осіб, обтяжених загальносоматичними захворюваннями, зокрема, захворюваннями ендокринної системи. Серед захворювань ендокринних залоз найбільш розповсюдженим є цукровий діабет (ЦД) [5]. За даними різних авторів, поширеність захворювань пародонта в осіб, хворих на ЦД, становить 46-86 % [1, 5, 6], а захворювань СО порожнини рота було встановлено, що при ЦД спостерігаються виразні зміни в СО, де відмічаються дистрофічні процеси, які сприяють її легкій подразливості та гальмують регенерацію [7, 8]. При цьому у пацієнтів даної категорії встановлені мікроангіопатії, особливо артеріоло- та капілярнопатії, зміни реологічних показників крові та гемостазу [1, 6]. Важливе значення в розвитку запальних змін тканин протезного ложа при ЦД відіграє посилення патогенного впливу мікрофлори ротової порожнини, зниження загальної

реактивності організму, зростання інтенсивності оксидативного та нітрозитивного стресу на тлі недостатньої активності чинників протиоксидантного захисту [1, 3-6].

Таким чином, легка подразливість СО ротової порожнини та загальмованість процесів регенерації у ній, з одного боку, та мікробна агресія з іншого, створюють несприятливі умови для адаптації до знімних протезів у хворих на ЦД.

Оптимізація процесів адаптації принесе б суттєву користь при протезуванні цього контингенту пацієнтів. Для покращення адаптації до повних знімних протезів використовували пірацетам, який позитивно впливає на метаболічні процеси в мозку, стимулює створення енергії, покращує кровопостачання мозкових структур. Все це призводить до зменшення психоемоційної напруги, яка зумовлена наявністю протеза. Однак суттєвого впливу пірацетаму на стан СО ротової порожнини не встановлено [9].

Для підвищення ефективності процесів адаптації до знімних зубних протезів за допомогою використання природного адаптогена – елеутеро-