

УДК 616.441-053.2:577.21

С.О.Печеник

ОСОБЛИВОСТІ АКТИВНОСТІ ГЛУТАТІОНТРАНСФЕРАЗИ В ДІТЕЙ ІЗ ЗАБРУДНЕНИХ РЕГІОНІВ З УРАХУВАННЯМ ЇХ ГЕНОТИПУ

ДУ «Інститут спадкової патології АМН України», м. Львів

Резюме. Вивчали розподіл алелей генів GSTM та активність глутатіонтрансферази в дітей із проявами екологічно детермінованих захворювань в умовах техногенного забруднення довкілля. Встановлено відмінності в активності ферменту в групах дітей залежно від їх генотипу, виду ксенобіотиків та шляху їх надходження

до організму. Рівень активності GST може використовуватися для прогнозування маніфестації екопатології.

Ключові слова: ксенобіотики, екопатологія в дітей, розподіл алелей генів, активність ферментів.

Вступ. На території нашої держави щороку виникають нові вогнища техногенного забруднення. Все більше людей вимушені постійно проживати в умовах значного ксеногенного навантаження. Характер забруднення довкілля стає все більш складним, багатокомпонентним. Все це створює реальну загрозу здоров'ю дітей, які за анатомо-фізіологічними особливостями є більш чутливими до впливу ксенобіотиків [4].

Діагностика екологічно детермінованих захворювань викликає великі труднощі, оскільки для значної кількості ксенобіотиків неможливо виділити специфічні симптоми, характерні тільки для одного виду впливу [2].

Ефективність 3-фазного процесу детоксикації ксенобіотиків в організмі безпосередньо залежить від функціональної повноцінності ферментних систем, що відповідають за їх трансформацію. Продукція цих ферментів кодується відповідними генами. Наявність у генотипі певних алелей може спричинити зниження активності ферменту, що робить носіїв таких алелей більш чутливими до несприятливого екзогенного впливу [3, 7, 8, 10, 11]. Іншою причиною зниження ферментативної активності може виступати безпосередній вплив ксенобіотиків на ферментні системи, що відповідають за їх метаболізм. Відомо, що найбільш токсичні компоненти можуть виступати як потужні індуктори чи інгібітори даних ферментів і змінювати швидкість детоксикації і захисний потенціал клітин [5, 12]. Важливу роль серед ферментів, що беруть участь у 2-й фазі, відіграє глутатіон-S-трансфераза (GST). Детоксикація за допомогою глутатіону забезпечує резистентність клітин до дії вільних радикалів, перекисного окиснення ліпідів, алкілювання білків та запобігає поломкам ДНК. Принципово важливою є наявність глутатіон-S-трансфераз в еритроцитах, що відкриває можливість детоксикації екзогенних гідрофільних сполук уже на перших етапах їх проникнення в організм [8]. Вивчення активності ферментів, що забезпечують процеси метаболізму й детоксикації ксенобіотиків, набуває першочергового значення в оцінці ризику для здоров'я дітей, що проживають на забруднених територіях.

У Долинському районі Івано-Франківської області загрозою для здоров'я населення створюють

продукти нафтопереробки, що потрапляють у питну воду. Щільність викидів тут сягає 28,1 т на 1 км² або 167 кг на одну особу. У м. Калусь та прилеглому районі небезпека зумовлена насамперед діяльністю хімічного комбінату ЗАТ «Лукор», що виробляє бензол, етилен, поліетилен, пропілен, хлорвініл, каустичну соду та ін. Щільність викидів сягає 170,0 тис. т на 1 км² або 100,4 кг на одну особу. У структурі викидів переважають речовини, що перебувають у газоподібному та рідкому стані, зокрема: сірчистий ангідрид (59,3 % до загального обсягу викидів, або 107,4 тис. т), вуглеводні без летких органічних сполук (9 %, або 16,4 тис. т), окисли азоту (7,4 % або 13,5 тис. т). Серед викидів твердих речовин (38,5 тис. т) найбільше сланцевої золи (37,3 тис. т або 96,8 % твердих викидів). Для порівняння, в умовно чистому Городенківському районі щільність викидів становить від 1,7 до 11 кг за рік на одну особу [1].

Мета дослідження. Встановити розподіл алелей генів, що кодують GST, та біохімічну активність глутатіонтрансферази в дітей із забруднених регіонів у взаємозв'язку з клінічними проявами екопатології для використання виявлених особливостей у системі прогнозування екопатологічних станів.

Матеріал і методи. Активність ферменту та розподіл алелей генів GSTM1 та GSTT1 визначали в 53 зразках крові дітей із екологічно несприятливого регіону (ЕНР) із забрудненням питної води нафтопродуктами (НП) (Долинський район Івано-Франківської області, група ЕНР-НП) та 62 зразках крові дітей із регіону з високим рівнем хімічного атмосферного забруднення (АЗ) (Калуський район, група ЕНР-АЗ). Отримані результати порівнювали з даними 61 дитини із екологічно чистого регіону $\frac{3}{4}$ група ЕЧР (Городенківський район Івано-Франківської області). Всі проби крові отримано з урахуванням норм біоетики. Визначення активності GST проводили за методом Mannervick B., Danielson U.H. [9]. Розподіл алелей генів GSTM1 та GSTT1 визначали за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції [6]. Статистична обробка результатів – у середовищі Excel-7. Для порівняння відносних чисел частоти та розподілу і оцінки значимості різниці між ними застосовували критерій

Пірсона (χ^2). Критичний рівень значимості при перевірці статистичних гіпотез у даному дослідженні приймали рівним 0,05.

Результати досліджень та їх обговорення.

Всього обстежено 207 дітей, 132 з яких з моменту народження проживали в екологічно несприятливих районах Івано-Франківської області – 57 дітей у м. Долина (група ЕНР-НП) та 75 дітей у м. Калуш (група ЕНР-А3). Діти, які з народження проживали в умовно екологічно чистому районі Івано-Франківської області (ЕЧР) – м. Городенка (73 особи), сформували контрольну групу. Територія, на якій проживають діти групи ЕНР-НП (м. Долина), тривалий час була і залишається нафто- і газовидобувним регіоном. Несприятлива ситуація для здоров'я населення, зокрема дитей, зумовлена потраплянням нафтопродуктів у питну воду. Діти групи ЕНР-А3 живуть у безпосередній близькості до хімічного комбінату. Загроза для їх здоров'я, насамперед, пов'язана із забрудненням повітря, а також – із потраплянням ксенобіотиків у воду та ґрунт. Якщо діти групи ЕНР-НП контактують із шкідливими чинниками, що надходять переважно через шлунково-кишковий тракт, то діти групи ЕНР-А3 отримують ксеногенне навантаження аерогенним чином.

Всі діти на момент обстеження були у віковому інтервалі від 1 до 16 років. Проаналізовано частоту скарг у дітей у регіонах із різним характером забруднення порівняно з даними пацієнтів з екологічно чистого району. Вірогідно частіше дітей, що постійно проживали на забруднених територіях, незалежно від чинника забруднення довкілля, турбували головний біль, зниження апетиту і втомлюваність ($p < 0,01$). Це, на нашу думку, пояснювалося проявами загальної інтоксикації, наявністю в обстежених дітей синдрому екологічної дезадаптації. Відмічено також вірогідно більшу частоту скарг на частий біль у животі

і нудоту в дітей із несприятливих регіонів ($p < 0,01$), адже вони в обох випадках отримували істотне ксеногенне навантаження на слизову оболонку шлунково-кишкового тракту.

Загальний стан всіх обстежених дітей на момент огляду оцінено як задовільний. Клінічні прояви синдрому загальної інтоксикації реєстрували в дітей усіх груп – ЕНР та ЕЧР. Блідість шкірних покривів вірогідно частіше спостерігали в групі дітей із переважно інгаляційним надходженням ксенобіотиків ($p < 0,01$). Гіпертрофія мигдаликів вірогідно частіше траплялися в групі дітей, що контактували із забрудненою водою ($p < 0,01$), а мікрополіаденіт – в обох групах дітей із несприятливих регіонів порівняно з контролем ($p < 0,01$). Це, можливо, пояснювалося особливостями імунної відповіді в умовах, що склалися, і потребує подальшого вивчення. Вірогідно вищою, порівняно з контролем, виявилася частота болючості живота при пальпації в дослідних групах ($p < 0,01$). Відмічено також вірогідно вищу частоту ураження зубів в обстежених дітей – гіпоплазії емалі різного ступеня тяжкості та карієсу ($p < 0,01$). Особливо високою виявилася частота гіпоплазії емалі зубів I ступеня в дітей із м. Долина, де домінував контакт із продуктами нафтопереробки, що потрапляють у питну воду. У цій же групі зареєстровано найвищу частоту карієсу. Слід відмітити, що випадків гіпоплазії емалі зубів II–III ступенів серед дітей контрольної групи взагалі не зареєстровано, а частота карієсу виявилася вірогідно нижчою ($p < 0,01$). Відомо, що окремі ксенобіотики конкурують з іонами кальцію в активних центрах ферментів, які транспортують його до кісток. Таким чином, в умовах забруднення, кісткова тканина отримує недостатню кількість кальцію, погіршується ступінь її мінералізації, що негативно відбивається, у тому числі, на емалі зубів.

Таблиця

Аналіз активності глутатіонтрансферази залежно від особливостей генотипу

Групи дітей	Активність GST (U/ml) у підгрупах дітей (M±m)								
	GSTT1 0/0 генотип	GSTT1 AB генотип	Достовірність різниці, p	GSTM1 0/0 генотип	GSTM1 AB генотип	Достовірність різниці, p	GSTT1 0 /0 + GSTM1 0/0 генотип	GSTT1 AB + GSTM1 AB генотип	Достовірність різниці, p
ЕНР-А3, n=60	1,46±0,13	3,32±0,19	<0,001	2,13±0,18	3,61±0,24	<0,001	1,19±0,1	4,08±0,22	<0,001
ЕНР-НП, n=53	4,28±0,80	4,78±0,40	>0,05	3,80±0,40	5,06±0,50	>0,05	4,27±1,30	5,43±0,50	>0,05
ЕЧР Контроль, n=52	1,93±0,28	2,10±0,23	>0,05	1,99±0,23	2,11±0,26	>0,05	2,06±0,40	2,18±0,30	>0,05
p між ЕНР-А3/ЕЧР	>0,05	<0,01		>0,05	<0,001		<0,001	<0,001	
p між ЕНР-НП/ЕЧР	<0,02	<0,001		<0,001	<0,001		>0,05	<0,001	

При ультразвуковому обстеженні внутрішніх органів у дітей, що проживали в умовах забрудненого довкілля, виявлено вірогідно вищу частоту проявів дисметаболічної нефропатії ($p < 0,01$), що слугує одним із характерних маркерів забруднення довкілля, а також – запального стану нирок. Іншим характерним проявом екопатології, зареєстрованим, у даному та попередніх дослідженнях, а також багатьма іншими авторами, є збільшення розмірів щитоподібної залози при ехографічному обстеженні. Особливо поширеним виявилось збільшення щитоподібної залози I–III ступенів у групі дітей із м. Калуш, що перебували в середовищі з комплексним хімічним забрудненням та переважно інгаляційним шляхом надходження ксенобіотиків.

Отже, характерними особливостями клінічної картини в дітей, що постійно проживали в умовах хімічного забруднення, за винятком проявів хронічної неспецифічної інтоксикації, виявились ознаки подразнення шлунково-кишкового тракту, ураження кісткової системи, у тому числі, зубів, нирок, переважно у вигляді дисметаболічної нефропатії, збільшення щитоподібної залози.

Аналіз особливостей розподілу алелей генів GSTM1 та GSTT1 у групах дітей, що проживають на територіях із різним техногенним навантаженням, не виявив статистично вірогідних відмінностей за частотою реєстрації алелей GSTT1 0/0 та GSTM1 0/0, або їх поєднання порівняно з групою контролю.

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» алелей GSTT1 0/0 та GSTM1 0/0, або їх поєднання (табл.).

Отже, аналіз активності глутатіонтрансферази (GST) залежно від розподілу алелей генів, що її кодують, у групах дітей із забруднених регіонів та ЕЧР виявив наступні закономірності. У контрольній групі активність ферменту в підгрупах дітей носіїв «нульових алелей» — GSTT1 0/0, GSTM1 0/0 та поєднання GSTT1 0/0 + GSTM1 0/0 не відрізнялася від активності в підгрупах носіїв алелей GSTT1 AB, GSTM1 AB, GSTT1 AB + GSTM1 AB. У дітей, що проживали в Долинському районі, забрудненому нафтопродуктами, спостерігалось вірогідне підвищення активності GST порівняно з контролем у носіїв всіх комбінацій алелей, за винятком поєднання GSTT1 0/0 + GSTM1 0/0, де розмір підгрупи не дозволив виявити закономірності. Однак усередині групи між носіями функціонально повноцінних та «нульових» алелей не виявлено вірогідних розбіжностей у показниках активності ферменту (табл.). Інакше виглядав розподіл активності GST у групі ЕНР-А3 із переважно інгаляційним надходженням ксенобіотиків хімічної природи. У даному випад-

ку носії алелей GSTT1 AB, GSTM1 AB та їх поєднання демонстрували вірогідно вищу активність глутатіонтрансферази порівняно з носіями «нульових» алелей, а також носіями повноцінних алелей контрольної групи (табл.).

Відмічено також, що носії поєднання несприятливих алелей із групи ЕНР-А3 демонстрували достовірно нижчу активність GST, ніж носії комбінації GSTT1 AB + GSTM1 0/0 ($p < 0,01$). Слід вважати, що фракція GSTT1 вирізнялася більшим впливом на активність кінцевого продукту, ніж GSTM1.

На нашу думку, підвищення активності глутатіонтрансферази в крові дітей із забруднених регіонів є позитивною, адекватною реакцією організму на ксеногенне навантаження. У Долинському районі, де негативний вплив пов'язаний із забрудненням води продуктами нафтопереробки, спостерігали вірогідне зростання активності GST у всіх підгрупах дітей, у тому числі, у носіїв «нульових» алелей, порівняно з контролем. Можливо, у цих дітей продукцію функціонально повноцінного ферменту забезпечували інші алелі генів сімейства GST. Не виключено також, що самі ксенобіотики в даному випадку виступали як індуктори продукції ферменту.

Серед дітей із м. Калуш носії «нульових» алелей демонстрували вірогідно нижчу активність ферменту, ніж діти з генетичними передумовами до нормальної продукції GST. Це, на нашу думку, може призвести до підвищення ризику виникнення різних форм екопатології.

Висновки

1. У дітей, які проживають у двох регіонах із різним характером техногенного забруднення довкілля, в клінічній картині, окрім проявів хронічної неспецифічної інтоксикації, вірогідно домінують ознаки подразнення шлунково-кишкового тракту, ураження кісткової системи, у тому числі – зубів; нирок, збільшення ехографічних та пальпаторних розмірів щитоподібної залози.

2. У підгрупах дітей із генетичними передумовами до нормальної продукції GST, що проживали в умовах інтенсивного забруднення атмосфери, кінцева біохімічна активність ферменту достовірно вища, ніж у носіїв алелей GSTT1 0/0, GSTM1 0/0 та їх поєднання ($p < 0,001$). Носії поєднання несприятливих алелей із цього регіону демонстрували достовірно нижчу активність GST, ніж носії комбінації GSTT1 AB + GSTM1 0/0 ($p < 0,01$).

3. У групах дітей із регіону з високими концентраціями нафтопродуктів у воді та в контрольній групі не виявлено вірогідних відмінностей активності GST між носіями різних комбінацій алелей.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з пошуками нових інформативних маркерів прогнозування екологічно зумовлених захворювань дітей.

Література

1. Довкілля Івано-Франківщини: Статистичний збірник / [за ред. Зброй Л.О.]. – 2004. – 133 с.
2. Обзор научно-исследовательских работ по педиатрии, выполненных в 1998 году / А.А.Ефимова, Н.Б.Рудченко, С.Н.Вахрамеева [и др.] // Педиатрия. – 1999. – № 6. – С. 38-44.
3. Полиморфизм в генах человека, ассоциирующихся с биотрансформацией ксенобиотиков / В.А.Спицын, С.В.Макаров, Г.В.Пай [и др.] // Вестн. ВОГиС. – 2006. – Т. 10, № 1. – С. 97-105.
4. Трахтенберг И.М. Приоритетные аспекты фундаментальных исследований в токсикологии: материалы I з'їзду Токсикологів України, Київ, 11-13 жовтня 2001 р.: тези доповідей / [редкол.: Проданчук Н.Г., (відпов. ред.) та ін.]. – К.: Інститут екологієни і токсикології ім. Л.І.Медведя, 2001. – 124 с.
5. Тутельян В.А. Изучение метаболизма действия ксенобиотиков: значение для оценки безопасности жизни / В.А.Тутельян // Вестн. АМН СССР. – 1984. – № 8. – С. 94-89.
6. A 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. – № 236. – P. 184-186.
7. Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response / H.Autrup // Mutat. Res. – 2000. – № 464. – P. 65-76.
8. Hayes J.D. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences / J.D.Hayes, R.C.Strange // Pharmacology. – 2000. – № 61. – P. 154-166.
9. Mannervick B. Glutathione transferases – structure and catalytic activity / B.Mannervick, U.H.Danielson // CRC Crit. Rev. Biochem. – 1988. – Vol. 23. – P. 283-337.
10. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations / S.Garte, L.Gaspari, A.K.Alexandrie [et al.] // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2001. – № 10. – P. 1239-1248.
11. The Role of Genetic Polymorphisms in Environmental Health / N.Samir, I.Kelada, L.David [et al.] // Environ Health Perspect. – 2003. – № 111. – P. 1055-1064.
12. Vessel E. Dynamically interacting genetic and environmental factors that affect the response of developing individuals to toxicants / E.Vessel, V.R.Hunt, M.K.Smith [et al.] // Environmental Factors in Human Growth and Development. – Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. – P. 107-124.

ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗЫ У ДЕТЕЙ ИЗ ЗАГРЯЗНЁННЫХ РЕГИОНОВ С УЧЁТОМ ИХ ГЕНОТИПА

С.О.Печеник

Резюме. Исследовали распределение аллелей генов GSTM и активность глутатионтрансферазы у детей, страдающих от экологически обусловленных заболеваний в условиях техногенного загрязнения среды. Выявлены особенности активности фермента в группах детей в зависимости от их генотипа, вида ксенобиотиков и пути их поступления в организм. Уровень активности GST может быть использован для прогнозирования манифестации экопатологии.

Ключевые слова: ксенобиотики, экопатология у детей, распределение аллелей генов, активность ферментов.

PECULIARITIES OF GLUTATION TRANSFERASE ACTIVITY IN CHILDREN FROM POLLUTED REGIONS, DEPENDING ON THEIR GENOTYPE

S.O.Pechenyk

Abstract. The author has studied the distribution of the alleles of GSTM genes and the activity of glutathione transferase in children with manifestations of ecologically determined diseases under the conditions of technological environmental pollution. Distinctions of the activity of the enzyme in the groups of children, depending on their genotype, xenobiotic type and the way of their entry into the organism have been established. The level of the activity of GST may be used to prognosticate ecopathology manifestations.

Key words: xenobiotics, ecopathology in children, allele gene distribution, enzymatic activity.

SI."Institute of Hereditary Pathology of Ukraine's AMS" (L'viv).

Рецензент – проф. О.К.Колоскова

Buk. Med. Herald. – 2010. – Vol. 14, № 2 (54). – P. 77-80

Надійшла до редакції 8.02.2010 року