

РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЙНИХ
ТА НАУКОВО-ДОСЛІДНИХ РОБІТ

УДК: 575.113+613.952/477.84/

З.Р. Кочерга, С.В. Подольська*,
Н.Г.Горовенко*ДВНЗ «Івано-Франківський національний
медичний університет» МОЗ України
(м.Івано-Франківськ, Україна),
Національна медична академія
післядипломної освіти імені П. Л. Шупика*
(м. Київ, Україна)АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ
GSTS У НОВОНАРОДЖЕНИХ
ІВАНО-ФРАНКІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Ключові слова: алейний поліморфізм, гени глутатіон-S-трансфераз, здорові новонароджені, недоношені діти, новонароджені із затримкою внутрішньоутробного росту.

Резюме. З метою визначення алейного поліморфізму генів глутатіон-S-трансфераз *GSTT1* та *GSTM1* у здорових новонароджених, недоношених дітей та новонароджених із затримкою внутрішньоутробного росту (ЗВУР) проведено дослідження крові пуповини 119 новонароджених Івано-Франківської області (57 здорових доношених дітей, 34 новонароджених зі ЗВУР та 28 недоношених новонароджених). Матеріалом для молекулярно-генетичного дослідження була кров пуповини новонароджених. Алейний поліморфізм генів *GSTT1* та *GSTM1* визначали згідно модифікованого протоколу мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції за М. Arand, R. Muhlbauer. Гомозиготному стану делеційного аляля у особи («нульовому генотипу») відповідає відсутність відповідних ампліфікатів, що свідчило про наявність генотипів *GSTT1*«-» та *GSTM1*«-». Для статистичного аналізу отриманих даних використано критерій χ^2 Пірсона; при об'ємі вибірки не більше 10 спостережень – критерій χ^2 з поправкою Йетса.

За результатами аналізу отриманих даних встановлено, що частота поліморфного варіанту *GSTM1*«+» у всіх новонароджених області склала 43,70 %, частота поліморфного варіанту *GSTM1* «-» – 56,30 %. Виявлено вірогідну різницю між частотами делеційного варіанту гена *GSTM1* у здорових новонароджених та новонароджених із ЗВУР: 45,61 та 70,58 % відповідно. Алейний варіант *GSTM1*«+» склав відповідно 54,39 та 29,41 % . Доведено перевагу носіїв поєднань делеційних варіантів алей генів *GSTM1*«-»/*GSTT1*«-» у групі новонароджених зі ЗВУР (14,70 %) порівняно з такими у здорових новонароджених (3,50 %). Отримані нами дані також продемонстрували асоціацію нефункціонального аляля гена *GSTM1* і ЗВУР у обстежених новонароджених Прикарпаття.

Вступ

Прогрес сучасної перинатології виявив нові проблеми, пов'язані з гестаційним процесом і антенатальною охороною плода. Особливої уваги у цьому напрямку заслуговують питання профілактики народження дітей з низькою масою тіла та затримкою внутрішньоутробного розвитку (ЗВУР), що визначено одним з пріоритетних напрямів охорони здоров'я в Україні [1, 2].

Оскільки останнім часом зберігається тенденція до зростання антропогенного навантаження та поєданого впливу екзогенних шкідливих чинників на ембріон та плід, виникла необхідність у

з'ясуванні ролі генетичних факторів у реалізації цього впливу на майбутню дитину. Аналіз токсичної і мутагенної дії ксенобіотиків показав, що шкідливий вплив цих сполук у значній мірі залежить від індивідуальних особливостей функціонування метаболічних систем організму. Дослідження останніх років довели, що зміни функцій систем детоксикації ксенобіотиків призводять до підвищеної чутливості організму до шкідливих впливів.

Ключову роль у захисті організму від продуктів оксидативного стресу, різноманітних токсичних сполук, ендогенних метаболітів, зокрема, відіграє

велика родина ферментів II фази детоксикації – глутатіон-S-трансфераз (GSTs). Гени, що кодують ферменти цієї родини, характеризуються значними коливаннями частот поліморфних варіантів у різних популяціях. Алейні варіанти асоційовані як з розвитком захворювань, так і з особливостями їх перебігу. Так, рядом дослідників було виявлено асоціацію антенатальної патології плодів і перинатальної патології новонароджених, у тому числі й окремих неонатальних синдромів, зі спадково-обумовленими порушеннями біосинтезу GSTs [3]. Наявність функціонально неактивних генів глутатіон-S-трансфераз зумовлюють порушення детоксикації екзо- та ендогенних ксенобіотиків, підвищують ризик виникнення мультифакторної патології. Серед останньої значне місце займає антенатальна патологія плодів та перинатальна патологія новонароджених, які погіршують адаптацію дитини у ранньому неонатальному періоді, створюють високий ризик формування хронічної патології та інвалідності у подальшому [4].

Впровадження комплексних підходів до обстеження і лікування таких дітей дозволяє виявити новонароджених, які потребують більшої уваги, що створює передумови до зменшення перинатальної захворюваності і смертності. Проведені епідеміологічні дослідження підтвердили наявність впливу порушення живлення плода і новонародженого на ріст, розвиток і захворюваність у наступні роки життя [4]. Тому вивчення генетичної складової захворювань немовлят є перспективним напрямком у розвитку предиктивної медицини плода, яка дозволить прогнозувати ризик розвитку патологічних станів в антенатальному та неонатальному періодах життя. Суперечливі дані про алейний поліморфізм генів GST у недоношених новонароджених і новонароджених зі ЗВУР зумовлює актуальність дослідження, яке дасть змогу прогнозувати та попереджувати виникнення даних патологічних станів. Виявлення делеційних алелей у новонароджених зі ЗВУР та у вагітних з плацентарною дисфункцією та синдромом ЗВУР плода дозволить розробити заходи преемпліонаційної профілактики.

Метою даної роботи було визначення алейного поліморфізму генів глутатіон-S-трансфераз GSTT1 та GSTM1 у здорових новонароджених, недоношених дітей та новонароджених зі ЗВУР.

Матеріал та методи дослідження

Матеріалом для дослідження була пуповинна кров 119 новонароджених Івано-Франківської області, з них 57 – здорових доношених дітей, 34 новонароджених зі ЗВУР та 28 недоношених новонароджених. Постнатальну діагностику недоношеності та затримки внутрішньоутробного розвитку плода здійснювали на підставі клінічних даних та антропометричних показників згідно протоколу [5]. Алейний поліморфізм GSTT1 та GSTM1 генів GSTs визначали з використанням

модифікованого протоколу мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції [6]. Ампліфікацію виділеної ДНК проводили в ампліфікаційній суміші з трьома парами специфічних праймерів в автоматичному термоциклі Applied Biosystems 2700. Ампліфіковані фрагменти розділяли з використанням горизонтального електрофорезу в 2 % агарозному гелі із забарвленням бромистим етидієм. Аналізували отримані амплікони за допомогою транслюмінатора «Біоком», з подальшим архівуванням у персональному комп'ютері за допомогою відеосистеми «ViTran» (Російська Федерація). Гомозиготному стану делеційного алеля у особи («нульовому генотипу») відповідає відсутність відповідних ампліфікатів, що свідчило про наявність генотипів GSTT1«-» та GSTM1«-». Для статистичного аналізу отриманих даних використовували критерій χ^2 Пірсона; за умови, коли об'єм вибірки не перевищував 10 спостережень, застосовували критерій χ^2 з поправкою Йетса (Програма Statistika10.0, Stat Soft Inc.) та відношення шансів (Odds Ratio (OR)).

Отримані результати та їх обговорення

В результаті аналізу отриманих даних встановлено, що частота поліморфного варіанту GSTM1«+» у всіх новонароджених області склала 43,70 %, а GSTM1 «-» – 56,30 % (рис. 1).

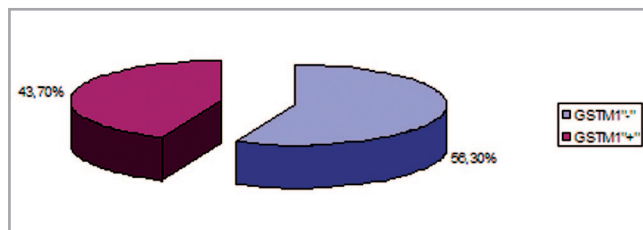


Рис.1. Частота алейних варіантів гена GSTM1 у новонароджених Прикарпаття

Частота поліморфного варіанту GSTT1«+» у всіх новонароджених області становила 80,67 %, а GSTT1«-» – 19,33 % (рис. 2).

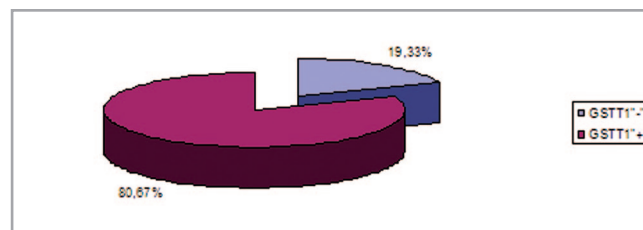


Рис.2. Частота алейних варіантів гена GSTT1 у новонароджених Прикарпаття

Дослідженням розподілу різних алейних варіантів генів GSTM1 і GSTT1 доведено їх відмінності у різних групах новонароджених. Виявлено вірогідну різницю між частотами делеційного варіанту гена GSTM1 у здорових новонароджених та новонароджених із ЗВУР. У останніх він зустрічається в 1,54 рази частіше ($\chi^2=4,44$; OR=0,35 (0,14–0,86), $p<0,05$) ніж у здорових новонароджених (табл. 1).

Таблиця 1

Розподіл частот генотипів генів GSTM1, GSTT1 у здорових новонароджених та у новонароджених із ЗВУР

Ген	Генотип	ЗВУРН=34		ЗдоровіN=57		χ^2	OR	95%CI	p
		n	%	n	%				
GSTM1	GSTM1«-»	24	70,58	26	45,61	4,44*	0,35	0,14-0,86	<0,05
	GSTM1«+»	10	29,41	31	54,39	4,44*	2,86	1,16-7,06	<0,05
GSTT1	GSTT1«-»	8	23,52	11	19,30	0,05	0,78	0,28-2,18	>0,05
	GSTT1«+»	26	76,47	46	80,70	0,05	1,29	0,46-3,60	>0,05

* -різниця достовірна

Делеційний варіант гена GSTT1 у новонароджених зі ЗВУР переважав у 1,25 рази такий у здорових новонароджених. У недоношених новонароджених делеційний варіант гена GSTM1 з недоношеністю також переважав у 1,21 рази частіше порівняно з

здоровими новонародженими ($\chi^2=1,23$; OR=0,52 (0,20–1,35), $p>0,05$) (табл. 2). Щодо алельного варіанта GSTT1«-», простежувалася тенденція до його переваги у недоношених новонароджених у 1,48 рази ($\chi^2=0,47$; OR=0,60 (0,21–1,71), $p>0,05$).

Таблиця 2

Розподіл частот генотипів генів GSTM1, GSTT1 у здорових та недоношених новонароджених

Ген	Генотип	Недоношені N=28		Здорові N=57		χ^2	OR	95%CI	p
		n	%	n	%				
GSTM1	GSTM1«-»	16	57,14	26	45,61	1,23	0,52	0,20-1,35	>0,05
	GSTM1«+»	10	35,71	31	54,39	1,23	1,91	0,74-4,92	>0,05
GSTT1	GSTT1«-»	8	28,57	11	19,30	0,47	0,60	0,21-1,71	>0,05
	GSTT1«+»	20	71,42	46	80,70	0,47	1,67	0,58-4,47	>0,05

При аналізі частот поєднань алельних варіантів у загальній групі новонароджених було виявлено поєднання генотипів GSTM1«+»/GSTT1«+» в 32,78, GSTM1«+»/GSTT1«-» — в 10,92, GSTM1«-»/GSTT1«+» в 47,90, GSTM1«-»/GSTT1«-» в 8,40 % випадків (рис. 3).

При порівнянні частот комбінацій генотипів у здорових новонароджених і новонароджених зі ЗВУР, найбільша відмінність спостерігалася для поєднань алельних варіантів GSTM1«-»/GSTT1«-» – 3,50 та 14,70 %, відповідно. Проте ця різниця, як і для інших поєднань алелей, не була достовірною (табл. 3).

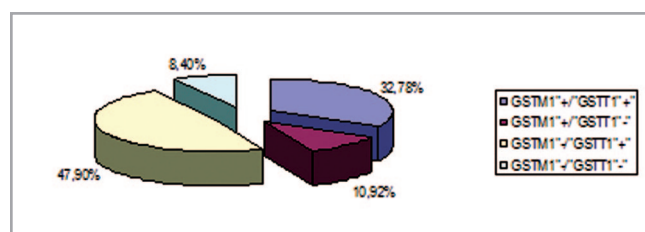


Рис. 3. Частота комбінацій алельних варіантів генів GSTM1 і GSTT1 в загальній групі новонароджених Прикарпаття

Таблиця 3

Розподіл частот поєднань генотипів генів GSTM1, GSTT1 у новонароджених та у новонароджених із ЗВУР

Поєднання генотипів	ЗВУР	Недоношені N=28		Здорові N=57		χ^2	OR	95%CI	p
		N=34	Здорові	n	%				
N=57	χ^2	OR	95%CI	p	45,61	1,23	0,52	0,20-1,35	>0,05
	n	%	n	%					>0,05
GSTM1«+»/ GSTT1«+»	10	29,41	22	38,60	2,40	0,18	0,03-1,10	>0,05	>0,05
	GSTM1«+»/ GSTT1«-»	4	11,76	9	15,79	3,84	0,18	0,02-1,34	>0,05
GSTM1«-»/ GSTT1«+»	15	44,12	24	42,11	1,45	0,25	0,04-1,46	>0,05	
GSTM1«-»/ GSTT1«-»	5	14,70	2	3,50	2,40	0,18	0,03-1,10	>0,05	

Аналізом частот комбінацій генотипів у здорових новонароджених і недоношених новонароджених також виявлено найбільшу різницю

для поєднань алельних варіантів GSTM1«-»/GSTT1«-» – 3,50 та 10,71 % відповідно (табл. 4). У багатьох дослідженнях проаналізовано

Таблиця 4

Розподіл частот поєднань генотипів генів GSTM1, GSTT1 у здорових та недоношених новонароджених

Поєднання генотипів	Недоношені	Недоношені N=28		Здорові N=57		χ^2	OR	95%CI	p
		N=28	Здорові	n	%				
N=57	χ^2	OR	95%CI	p	45,61	1,23	0,52	0,20-1,35	>0,05
	n	%	n	%					>0,05
GSTM1«+»/GSTT1«+»	7	25,0	22	38,60	2,0	0,21	0,03-1,54	>0,05	>0,05
	GSTM1«+»/GSTT1«-»	2	7,14	9	15,79	1,19	0,15	0,01-1,56	>0,05
GSTM1«-»/GSTT1«+»	16	57,14	24	42,11	0,14	0,44	0,07-2,96	>0,05	
GSTM1«-»/GSTT1«-»	3	10,71	2	3,50	1,20	0,21	0,03-1,54	>0,05	

вплив стану організму жінки та способу її життя на здоров'я новонародженого. Показано, що куріння матері та тютюновий дим у навколишньому середовищі асоційовані з низькою масою дитини при народженні, зменшенням гестаційного віку та передчасними пологами [7]. При обстеженні жінок з Каунасу виявлено, що поліморфізм генів GSTM1 і GSTT1 впливає на індивідуальну чутливість організму до дії тютюнового диму. Генотип матері GSTM1«-» та поєднання алельних варіантів GSTM1«-»/GSTT1«-» підвищували ризик низької ваги та затримки внутрішньоутробного розвитку дитини при народженні [8]. Виявлено залежність маси тіла дитини від генотипу жінки та пренатального впливу ртуті: за наявності генотипів GSTM1«-» та GSTT1«-» у матері був підвищений вміст ртуті в крові, що асоціювалось з низькою масою тіла дитини при народженні [9]. Збільшення споживання під час вагітності продуктів та дієтичних добавок, що містять залізо, впливало на збільшення маси тіла тільки тих новонароджених, матері яких мали генотип GSTM1«+». При генотипі жінок GSTM1«-» кількість заліза в раціоні на масу тіла новонародженого не впливала [10]. Дослідники продемонстрували, що збільшення ризику передчасних пологів у відповідь на вплив токсичних факторів навколишнього середовища асоційований з генотипом жінки GSTM1«-».

Вивченням ролі функціональної неспроможності плаценти, як органу, який забезпечує взаємодію двох організмів - матері і плода, показано, що зниження буферної ємності глутатіонзалежної ланки антиоксидантного захисту в плаценті на тлі інтенсифікації процесів перекисного окислення ліпідів, відіграє ключову роль її дисфункції. Відносний ризик розвитку плацентарної недостатності, а саме ЗВУР плода, у обстежених,

що мали генотип GSTM1«-» в плацентах, підвищений майже в 3 рази [7, 8]. Отримані нами дані також продемонстрували асоціацію нефункціонального алеля гена GSTM1 зі ЗВУР у обстежених новонароджених Прикарпаття.

Висновки

1. Частота поліморфного варіанта GSTM1«+» у всіх новонароджених Івано-Франківської області склала 43,70, частота поліморфного варіанта GSTM1«-» – 56,30 %.

2. Частота поліморфного варіанта GSTT1«+» у всіх новонароджених Івано-Франківської області склала 80,67, а GSTT1«-» – 19,33 %.

3. Виявлено вірогідну перевагу в 1,54 делеційного варіанту гена GSTM1 у новонароджених із ЗВУР на противагу до здорових новонароджених ($\chi^2=4,44$; OR=0,35 (0,14–0,86), $p<0,05$).

4. Вірогідної різниці поєднань алельних варіантів GSTM1«+»/GSTT1«+», GSTM1«+»/GSTT1«-», GSTM1«-»/GSTT1«+», GSTM1«-»/GSTT1«-» у обстежених новонароджених виявлено не було, проте найбільша різниця спостерігалась для поєднань алельних варіантів GSTM1«-»/GSTT1«-» як в групі порівняння здорових новонароджених і новонароджених зі ЗВУР (3,50 та 14,70 %) відповідно, так і в групі порівняння здорових новонароджених і недоношених новонароджених (3,50 та 10,71 % відповідно).

Перспективи подальших досліджень у даному напрямку полягають у вивченні алельного поліморфізму генів глутатіон-S-трансфераз GSTT1 та GSTM1 у вагітних з плацентарною дисфункцією та діагностованим синдромом ЗВУР плода з наступною розробкою профілактичних заходів для жінок з обтяженим анамнезом за даною патологією.

Література

1. Шунько Є.Є. Впровадження Концепції подальшого розвитку перинатальної допомоги в Україні / Є.Є. Шунько // Неонатологія, хірургія та перинатальна медицина. – 2011. – Т.І, №1.- С.10-16.
2. Знаменская Т.К. Приоритетные направления развития перинатальной службы в Украине / Т.К. Знаменская // Неонатологія, хірургія та перинатальна медицина. – 2011. – Т. I, №2.- С.6-11.
3. Горovenko Н.Г. Роль спадкових факторів у розвитку перинатальної патології новонароджених / Н.Г.Горovenko, З.І. Россоха, С.В. Подольська // Сучасна педіатрія. – 2007. – №1 (14). – С. 162-168.
4. Аналіз внеску поліморфних варіантів генів GSTT1, GSTM1, GSTP1 у розвиток критичних станів та органних дисфункцій у недоношених новонароджених з низькою масою тіла / Н.Г. Горovenko, Є.Є. Шунько, З.І. Россоха [та ін.] // Здоров'я жінчини. – 2010. – №5 (51). – С.180–184.
5. Про затвердження Протоколу медичного догляду за новонародженою дитиною з малою масою тіла при народженні // Наказ МОЗ України № 584 від 29.08.2006р. – К., 2006.
6. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms / M. Arand, R. Muhlbaue, J. Hengstler [et al.] // Anal. Biochem. – 1996. – Vol. 236. – P. 184-186.
7. Maternal Smoking, GSTM1 and GSTT1 polymorphism and susceptibility to adverse pregnancy outcomes / R. Grazuleviciene, A. Danileviciute, R. Nadisauskiene [et al.] // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2009. – Vol.6.– P.1282-1297.
8. 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 Childbirth.– 2012.– Vol. 26., №12.–P.161.
9. Interaction between GSTM1/GSTT1 polymorphism and blood mercury on birth weight / B.E. Lee, Y.C. Hong, H. [et al.] // Environ Health Perspect. – 2010.– Vol.118.– P.437-43.
10. Birth weight of Korean infants is affected by the interaction of maternal iron intake and GSTM1 polymorphism / J.Hur, H. Kim, E.H. Ha [et al.] // J. Nutr. – 2013.– Vol.143.– P. 67-73.

**АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ GSTS
НОВОРОЖДЕННЫХ
ИВАНО - ФРАНКОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

З.Р. Кочерга, С.В. Подольская, Н.Г. Горovenko**

**ГВУЗ «Ивано-Франковский национальный медицинский университет» МЗ Украины (г.Ивано-Франковск, Украина),
Национальная медицинская академия
последипломного образования
имени П. Л. Шупика
(г. Киев, Украина)**

Резюме. С целью определения аллельного полиморфизма генов глутатион-S- трансфераз GSTT1 и GSTM1 у здоровых новорожденных, недоношенных детей и новорожденных с задержкой внутриутробного роста (ЗВУР) проведено исследование пуповинной крови 119 новорожденных Ивано-Франковской области (57 – здоровых доношенных детей, 34 – со ЗВУР и 28 недоношенных новорожденных). Материалом для молекулярно-генетического исследования была пуповинная кровь новорожденных. Аллельный полиморфизм GSTT1 и GSTM1 генов GSTs определяли с использованием модифицированного протокола мультиплексной полимеразной цепной реакции по М. Arand, R. Muhlbaue. Гомозиготному состоянию делеционного аллеля при «нулевом генотипе» соответствовало отсутствие соответствующих амплификатов, что свидетельствовало о наличии генотипов GSTT1 «-» и GSTM1«-». Для статистического анализа полученных данных использовали критерий χ^2 Пирсона, при условии, когда объем выборки не превышал 10 наблюдений, применяли критерий χ^2 с поправкой Йетса.

В результате анализа полученных данных установлено, что частота полиморфного варианта GSTM1 «+» у всех новорожденных области составила 43,70 %, частота полиморфного варианта GSTM1«-» - 56,30 %. Выявлено достоверное отличие между частотами делеционного варианта гена GSTM1 у здоровых новорожденных и новорожденных со ЗВУР: 45,61 и 70,58 % соответственно. Аллельный вариант GSTM1 «+» составил соответственно 54,39 и 29,41%. Доказано преимущество носителей сочетаний делеционных вариантов аллелей генов GSTM1 «-» / GSTT1 «-» в группе новорожденных со ЗВУР (14,70%) по сравнению с таковыми у здоровых новорожденных (3,50%). Полученные нами данные также продемонстрировали ассоциацию нефункциональных аллелей гена GSTM1 с недоношенностью или ЗВУР у обследованных новорожденных Прикарпатья.

Ключевые слова: аллельный полиморфизм, гены глутатион-S-трансфераз, здоровые новорожденные, недоношенные дети, новорожденные с задержкой внутриутробного роста.

**ALLELIC POLYMORPHISM IN GSTS GENES IN
NEWBORNS
OF IVANO-FRANKIVSK REGION**

Z.R. Kocherha, S.V. Podolska, N.H. Horovenko**

**SHEI «Ivano-Frankivsk National Medical University»
HM of Ukraine
(Ivano-Frankivsk, Ukraine),
The Shupyk National Medical Academy
of Postgraduate Education
(Kiev, Ukraine)**

Summary. Umbilical blood of 119 newborns (57 healthy full-term newborns, 34 with intrauterine growth retardation (IUGR) and 28 premature neonates) from Ivano-Frankivsk region was examined with the aim to determine allelic polymorphism in glutathione- S-transferase GSTT1 and GSTM1 genes in healthy, premature and IUGR newborns. Newborns' umbilical blood was used as a material for molecular-genetic investigation. 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. Muhlbaue. Homozygous state of deletion allele in a person ("zero genotype") coincided with the absence of the corresponding amplifications, indicating the presence of GSTM1 «+» and GSTM1«-» genotypes. χ^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 χ^2 criterion with Yates' correction.

The analysis of the data revealed that the frequency of polymorphic variants of GSTM1 «+» genes in all newborns of the region was 43,70%, the frequency of polymorphic variants of GSTM1 "-" genes was 56,30%. Reliable 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 proved the advantage of bearers with combinations of allelic variants of GSTM1«-»/ GSTT1«-» genes in group of IUGR newborns (14,70%) in comparison with such indices in healthy newborns (3,50%). Our data also showed an association of non-function allele of GSTM1 gene with prematurity or intrauterine growth retardation in the examined newborns from the region.

Keywords: allelic polymorphism, glutathione-S-transferase genes, healthy newborns, premature, newborns with intrauterine growth retardation .