

відмічено на території м. Вільногірськ, у містах Нікополь і Павлоград стан ґрунтів за їх токсико-мутагенною активністю оцінено як "незадовільний" з "загрозливим" станом біосистем. Екологічний стан ґрунтів на контрольній території оцінено як "еталонний" і рівень ушкодженості біосистем менше в 3,5–5,2 раз у порівнянні з промисловими центрами Дніпропетровської області.

3. За загальною токсико-мутагенною активністю об'єктів навколишнього середовища, оціненою за комплексом біотестів, виявлено на території міст Жовті Води і Вільногірськ "катастрофічну" екологічну ситуацію, у містах Нікополь і Павлоград - "незадовільну". Інтегральна еколого-генетична оцінка території ЛОК "Солоний лиман" виявила "еталонний" стан об'єктів навколишнього середовища з "сприятливим" станом біосистем. Токсико-мутагенна активність об'єктів навколишнього середовища на територіях промислових міст у 3,8-5 раз більша ніж на контрольній території, яка має мінімальний рівень техногенного навантаження.

Література

1. Сердюк А. М. Навколишнє середовище і здоров'я населення / А. М. Сердюк // Довкілля та здоров'я. – 1998. – № 4(7). – С. 2–6.

2. Екологічний паспорт Дніпропетровської області. – Д., 2007. – 112 с.

3. Дуган А.М., Баріляк І.Р., Журков В.С. Выявление и оценка суммарной мутагенной активности аэрозольной части химических загрязнений атмосферного воздуха некоторых промышленно развитых городов Украины // Цитология и генетика. – 1993. – 27, №4, С.34–39.

4. Методологические аспекты оценки мутагенного фона и генетического риска для человека и биоты от действия мутагенных экологических факторов / А.И. Горовая, Л.Ф. Бобырь, Т.В. Скворцова и др. // Цитология и генетика. – 1996. – №6(30). – С.78–86.

5. Горовая А.И., Павличенко А.В. Методология эколого-социального мониторинга горно-промышленных регионов, как составляющая устойчивого развития Украины // Гігієна населених місць: Зб. наук. праць. Київ, 2004. – Вип. 43. – С. 552–559.

6. МР 2.2.12-141-2007. Обстеження та районування території за ступенем впливу антропогенних чинників на стан об'єктів довкілля з використанням інтегральних цитогенетичних методів оцінки. // Упоряд.: Горова А. І., Риженко С. А., Скворцова Т. В.// – Київ: „Полімед”, 2007.

Резюме

Визначені рівні токсико-мутагенної активності ґрунтів та атмосферного повітря за допомогою цитогенетичних методів біоіндикації. Проведена екологічна оцінка стану об'єктів навколишнього середовища на території гірничопромислових центрів Дніпропетровської області.

The levels of toxic and mutagenic activity of soils and atmosphere air by means of cytogenetic methods of bioindication are defined. The ecological assessment of environmental objects state at the territories of mining and industrial centers of Dnipropetrovsk region is conducted.

ГРА О.А.^{1,2}, КОЖЕКБАЕВА Ж.М.^{1,3}, ГРА Д.В.⁴, ФЕДОРОВА М.Д.⁴, СКОТНИКОВА О.И.⁵, КИСЕЛЕВА Н.П.⁴, КИСЕЛЕВ Ф.Л.⁴, НАСЕДКИНА Т.В.², ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.¹

¹Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Россия, Москва, Ул. Губкина 3. 119991,

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,

³University of Miami Miller School of Medicine Institute for Human Genomics,

⁴НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН,

⁵Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ В ЭТИОЛОГИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВИРУСНЫХ МНОГОФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Инфекционные заболевания – это группа заболеваний, вызываемых проникновением в организм патогенов (бактерий, вирусов и др.). Восприимчивость организма к инфекционным заболеваниям зависит от множества факторов: от возраста, перенесенных и сопутствующих заболеваний, питания, социальных и экологических условий, иммунного статуса.

Наиболее распространенной и социально-значимой бактериальной инфекцией является туберкулез (ТБ), которая занимает первое место среди причин смерти от инфекционных заболеваний. ТБ представляет собой острое или хронически протекающее инфекционное заболевание, вызываемое микобактериями туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*, МБТ) и характеризующееся развитием клеточной аллергии и специфических гранул в различных тканях и органах. В мире ежегодно регистрируется около 8 млн. новых случаев заболевания ТБ органов дыхания, и прогноз дальнейшей динамики эпидемической ситуации остается неблагоприятным. В России эпидемиологическая ситуация по ТБ также остается напряженной: заболеваемость по итогам 2007 года составила 83.2 на 100 000 населения, распространенность – 194.5 на 100 000 населения, смертность – 21.3 на 100 000 населения. Предполагается, что МБТ инфицировано около 2/3 населения планеты. Однако у большинства инфицированных никогда не развивается туберкулез: считается, что инфицированный человек обладает ~10% риском развития активной формы туберкулеза. Это происходит только у людей с ослабленной иммунной системой, при этом на развитие ТБ влияют как неблагоприятные условия внешней среды, так и индивидуальные характеристики организма индивида [Сельцовский, 2004; Lin, 2007].

Среди вирусных инфекций особое место занимают онкогенные вирусы, которые инфицируют клетки и, тем самым, нарушают нормальные клеточные сигнальные связи и обеспечивают условия для активной клеточной пролиферации. Ярким примером онкогенных вирусов являются вирусы папиллом человека (HPV), которые составляют группу ДНК-содержащих вирусов, характеризующихся тропизмом к эпителию и вызывающих субклинические формы инфекции, способные индуцировать развитие такого социально-значимого заболевания как рак шейки матки (РШМ). В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения РШМ занимает 6-е ранговое место, что соответствует 5.2% от общего числа заболевших онкологическими заболеваниями. В России доля РШМ в структуре заболеваемости максимальна в возрастной группе 15–39 лет (19.2%). В возрастной группе 40–54 года она составляет 8.9% и занимает 2-е ранговое место после рака молочной железы, при этом смертность от РШМ составляет 4.2% от общего числа умерших от злокачественных новообразований. Женщина может одновременно заражаться несколькими типами папилломавирусов, при этом для папилломавирусной инфекции характерно латентное течение. Интересно отметить, что у 90% женщин HPV инфекция исчезает самостоятельно через год после инфицирования под воздействием иммунной системы организма и лишь у незначительного числа инфицированных под влиянием различных факторов происходит активация вируса, его усиленное размножение и переход болезни в стадию клинических проявлений [Хансон, 2002; Киселев, 2004].

На сегодняшний день подтверждена гипотеза, что предрасположенность к инфекционным заболеваниям зависит от эффективности активации клеточного иммунитета и определяется генетическим статусом. Также есть данные, что факторами

риска развития ТБ и РШМ помимо сниженных показателей иммунного статуса являются курение и неблагоприятные условия окружающей среды. В связи с этим, помимо уже известных генов кандидатов предрасположенности к данным социально-значимым многофакторным заболеваниям становится актуальным изучение генов, белковые продукты которых участвуют в метаболизме ряда ксенобиотиков (в том числе компонентов табачного дыма), то есть анализ полиморфизма генов системы биотрансформации.

Материалы и методы

Для выяснения роли генов системы биотрансформации в развитии ТБ в настоящей работе с помощью аллель-специфичной гибридизации на биологическом микрочипе определены частоты полиморфных вариантов генов *CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *MTRR*, *NQO1*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2* у 73 больных ТБ (возраст от 19 до 82 лет) и проведено сравнение с частотами полиморфных вариантов данных генов у 352 здоровых индивидов (возраст от 20 до 65 лет). Для выявления генетических факторов риска развития РШМ определены частоты полиморфных вариантов данных генов системы биотрансформации у 85 женщин с диагнозом РШМ (возраст от 24 до 72 лет), и проведено сравнение с частотами полиморфных вариантов данных генов у 82 здоровых доноров женского пола (возраст от 43 до 102 лет).

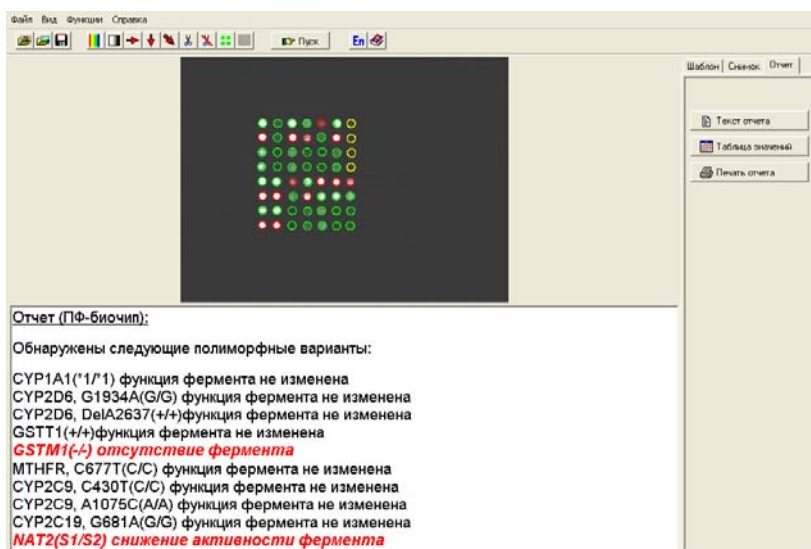


Рис.1. Пример гибридизационной картины, полученной на биочипе для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации, и интерфейс программы «ImageWare» для определения полиморфизма в данных генах.

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью набора Wizard genomic DNA purification system («Promega», США). ДНК из опухолей шейки матки выделены стандартным гуанидинизотиоционатным методом с разделением ДНК и РНК центрифугированием в плотной среде CsCl [Sambrook, 1989]. Статистический анализ был проведен с применением прикладной программы GraphPad InStat (США).

Результаты и обсуждение

С помощью биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации *CYP1A1* (4887C>A, 4889A>G, 6235T>C), *CYP2D6* (1934G>A, 2637delA), *GSTT1* (делеция), *GSTM1* (делеция), *MTHFR* (677C>T, 1298A>C), *MTRR* (66A>G), *NQO1* (609C>T), *CYP2C9* (430C>T, 1075C>T), *CYP2C19* (681G>A) и *NAT2* (341T>C, 481C>T, 590G>A, 857G>A) были изучены ассоциации полиморфных вариантов данных генов с риском развития ТБ и РШМ во взрослом возрасте.

У больных ТБ обнаружено статистически значимое увеличение частоты «нулевого» *GSTT1* генотипа (OR = 3.26, p = 2.8E-5) и двойного «нулевого» *GSTT1/GSTM1*

генотипа (OR = 4.05, $p = 3.4E-5$), по сравнению с группой здоровых доноров. Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым «нулевые» генотипы генов *GSTT1* и *GSTM1* чаще обнаруживали у пациентов с различными заболеваниями легких. Известно, что глутатион-S-трансферазы участвуют в детоксикации полициклических ароматических углеводородов, а именно бензопирена и других компонентов табачного дыма, катализируя конъюгацию промежуточных метаболитов с восстановленным глутатионом и, тем самым, предотвращая образование ДНК-аддуктов. Наличие двух «нулевых» аллелей гена *GSTT1* и/или *GSTM1* приводит к отсутствию ферментативной активности кодируемых данными генами ферментов и способствует развитию окислительного стресса и деструкции, что обуславливает повышение уровня аддуктов ДНК и может потенцировать развитие различных заболеваний многофакторной этиологии.

При анализе распределения частот у больных ТБ обнаружено увеличение частоты генотипа *NAT2* *5/*5 по сравнению с группой здоровых индивидов (OR = 1.58, $p = 0.163$). При анализе сочетанных взаимодействий впервые показано, что у больных ТБ генотип *NAT2* *5/*5 в комбинации с «нулевым» *GSTT1* генотипом и двойным «нулевым» *GSTT1/GSTM1* генотипом встречается достоверно чаще, чем в популяционном контроле (OR = 5.56, $p = 0.0216$ и OR = 12.21, $p = 0.0135$, соответственно). Известно, что ариламин-N-ацетилтрансферазы играют важную роль в детоксикации и метаболической активации ксенобиотиков, катализируя перенос ацетильной группы с ацетил-СоА к концевому атому азота арилгидразинов и ариламин-содержащих канцерогенов, аллергенов и токсинов. Полученные в данной работе результаты позволяют предположить, что преобладание «медленного» генотипа *NAT2* в сочетании с «нулевым» *GSTT1* и/или *GSTM1* генотипом приводит к элиминации активности основных ферментов II фазы биотрансформации, отвечающих за окончательный метаболизм ксенобиотиков и трансформацию их в неактивные водорастворимые соединения. Подобный дисбаланс в работе системы биотрансформации может приводить к аккумуляции реактивных и цитотоксичных метаболитов, и тем самым провоцировать развитие различных многофакторных заболеваний, а также обуславливать снижение иммунного статуса.

У больных РШМ обнаружено статистически значимое увеличение частоты гетерозигот по *7 аллелю гена *NAT2* (OR = 4.08, $p = 0.0316$), по сравнению с группой здоровых женщин. Наличие данного аллеля соответствует замене G на A в позиции 857 (Gly286Glu) и определяет фенотип «промежуточного» или «медленного» ацетилирования *NAT2*, приводя к образованию менее стабильного фермента.

При анализе сочетанных взаимодействий впервые показано, что аллель *NAT2**7 в сочетании с генотипом *CYP2D6* 1934G/G достоверно чаще встречается у женщин, больных РШМ, чем в контрольной группе (OR = 20.49, $p = 0.0032$). Ген *CYP2D6* является самым полиморфным геном суперсемейства CYP, при этом большинство полиморфных аллелей данного гена характеризуются сниженной активностью. Фермент *CYP2D6*, кодируемый данным геном, участвует в биотрансформации большого количества субстратов, включая полициклические ароматические углеводороды, метаболиты которых характеризуются выраженным канцерогенным действием. Полученные в настоящей работе результаты позволяют предположить, что преобладание быстрых метаболизаторов по гену *CYP2D6* в сочетании с носительством «медленного» аллеля *NAT2**7 может приводить к высокоэффективной активации проканцерогенов с последующим образованием генотоксичных интермедиатов, способных вызывать повреждения ДНК, и, как следствие, индуцировать развитие РШМ у инфицированных HPV женщин.

Выводы: Анализ полиморфизма генов системы биотрансформации методом аллель-специфичной гибридизации ДНК на биочипе позволяет точно определять генотипы и аллели, а также распределение частот аллелей и генотипов в популяционных выборках больных и здоровых индивидов, и может быть эффективно использован для ассоциативных исследований генетического полиморфизма с целью установления

кореляції передисположеності к захворюванням данного індивіда в залежності от генетического статусу.

Робота виконана при підтримці Російського Фонду Фундаментальних Исследований (грант № 07-04-00708-а и № 08-04-12225-офи).

Литература

1. *Сельцовский П.П., Литвинов В.И.* Социальные аспекты эпидемиологической ситуации по туберкулезу. – Москва: МНПЦБТ.- 2004.- 224с.
2. *Lin H.H., Ezzati M., Murray M.* Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis // *PLoS Med.*- 2007.- vol. 4, № 1.- P.173-189.
3. *Хансон К.П., Имянитов Е.Н.* Современные представления о канцерогенезе рака шейки матки // *Практическая онкология.*- 2002.- т. 3, № 3.- С.145-155.
4. *Киселев Ф.Л., Мазуренко Н.Н., Волгарева Г.М., Киселева Н.П.* Взаимодействие вирусных и клеточных генов в опухолях шейки матки // *Молекулярная биология.*- 2004.- т. 38, № 2.- С.224-232.
5. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A Laboratory manual.* – New York: Cold Spring Harbor Lab. Press.- 1989.

Резюме

Проведен сравнительный анализ полиморфизма генов системы биотрансформации с риском развития туберкулеза легких и рака шейки матки с помощью биочипов. Показано, что полиморфные варианты генов *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1* и *NAT2* могут служить прогностическими факторами риска развития данных многофакторных патологий у жителей Европейской части России во взрослом возрасте.

The comparative analysis of polymorphism in xenobiotic-metabolizing genes with the risk of development of pulmonary tuberculosis and cervical cancer was done using microarray. It was shown that polymorphic variants of genes *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1* and *NAT2* may consider as predictive markers for risk of development of the given multifactorial pathologies in residents of European part of Russia at adult age.

ГУЛЕЮК Н.Л.

ДУ "Інститут спадкової патології АМН України"

Україна, 79003, Львів, вул. Лисенка, 31а, e-mail: huleyuk@yahoo.com

МОЗАЙЦИЗМ В КУЛЬТУРАХ АМНІОЦИТІВ: АНАЛІЗ ВИПАДКІВ У ЛЬВІВСЬКОМУ ММГЦ

Мозаїцизм є характерною рисою живих організмів. Цитогенетики під мозаїцизмом мають на увазі присутність у обстежуваного декількох клітинних ліній з різним каріотипом. При істинному (генералізованому) мозаїцизмі різні клони клітин зустрічаються у всіх досліджуваних тканинах організму. При обмеженому мозаїцизмі клітини з хромосомними аномаліями зустрічаються тільки в одній тканині.

Вважається, що мозаїцизм є наслідком нерозходження хромосом на доімплантаційній стадії розвитку зиготи. Частка різних клонів клітин та їх локалізація залежить від того, на якій стадії розвитку ембріона відбулось нерозходження, від проліферативних властивостей та життєздатності клітин з аномальним каріотипом [1].

Останні дослідження показують, що ~5% людей мають декілька цитогенетично відмінних клітинних ліній. Відомі синдроми, для яких характерний хромосомний мозаїцизм. Зокрема, до хвороб з обмеженим мозаїцизмом, належить с.Паллістера-Кілліана (тетрасомія по коротким плечам 12-ї хромосоми, переважно у вигляді i12p) [2]. Тканинно обмежений мозаїцизм описаний для тетрасомій 5p [3], 8p [4], 9p та 18p [5]. Зафіксовані