

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**РОБОТА**

*НА ЗДОБУТТЯ НАУКОВОГО СТУПЕНЯ*

*МАГІСТРА МЕДИЦИНИ*

*ЗА СПЕЦІАЛЬНІСТЮ «ТЕРАПІЯ»*

на тему:

«Зв'язок поліморфізму глутатіон-s-трансферази-р з особливостями перебігу легеневого туберкульозу»

**Термін виконання: з 10.10.2011 по 10.06.2013 рр.**

**Наукові керівники:**

д.мед.н., професор, зав. кафедрою  
сімейної медицини та загальної практики

**Попік Г.С.**

д.мед.н., зав. кафедрою  
сімейної медицини та загальної практики

**Величко В.І.**

**Виконавець:**

магістрант кафедри сімейної медицини  
і загальної практики

**Єрмуракі П.П.**

Одеса – 2013

**ЗМІСТ**

ВСТУП.....	3
РОЗДІЛ 1. ОСНОВНІ ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ ДОСЛІДЖУВАНОЇ ТЕМИ.....	4
1.1. Епідеміологія туберкульозу у світі, Україні та Одеської області.....	7
1.2. Методика вивчення поліморфізму ферменту глутатіон-s-трансферази- $\pi$ : історія, актуальність, перспективи використання.....	11
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	21
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	27
1.1. Особливості перебігу туберкульозу легенів залежно від поліморфних варіантів ферменту глутатіон-s-трансферази- $\pi$ .....	27
1.2. Трагування результатів дослідження.....	29
1.3. Використання отриманих результатів у практичній охороні здоров'я.....	31
ВИСНОВКИ.....	32
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	33

## ВСТУП

Туберкульоз є основною причиною смерті від виліковних інфекційних хвороб. На підставі результатів спостережень про перевагу тих або інших хвороб і інфекцій, даних систем спостереження та зареєстрованих випадків смерті було виявлено 8,9 мільйонів знову виявлених випадків туберкульозу в 2004 році. Про менш ніж половині з них стало відомо громадським організаціям і ВООЗ. Проблема туберкульозу органів дихання з давніх часів продовжує привертати пильну увагу не тільки лікарів-фтизіатрів, але та усієї медичної громадськості. Це вказує на необхідність всебічного обстеження хворих туберкульозом, у випадках поєднаних або супутніх захворювань у верхніх дихальних шляхах або інших органах, своєчасної постановки діагнозу, що надзвичайно важливо для ефективної комплексної терапії або хірургічного лікування.

Слід зазначити, що Одеська область є однією з найбільш проблемних відносно туберкульозу в Україні.

Систематичні спостереження багатьох дослідників показують, що різна чутливість людей у популяції до факторів середовища залежить від індивідуальних спадкоємних особливостей, що у свою чергу приведе до адаптації або дезадаптації, що проявляється виникненням різних захворювань. Впливаючі на організм фактори навколишнього середовища підрозділяються на біотичні та абиотичні. Варто відзначити відносно “нові”, тому що серед них є не тільки техногенні речовини, але та що брати участь в ендогенному метаболізмі, – ксенобіотики. Це речовини, що є сторонніми для нормального метаболізму із сильним біологічним ефектом, зокрема цитотоксичним та генотоксичним, що поряд зі шкідливим впливом інших середовищних факторів робить свій внесок у зниження адаптаційних можливостей організму та ріст захворюваності населення. Частка генного поліморфізму (варіації ДНК-послідовності, викликані заміщенням, вставкою

або делецією гена чи його ділянки) припадає на внутрішньопопуляційний рівень, що пояснює істотна відмінність реакцій людей однієї популяції на вплив того самого фактора навколишнього середовища.

У метаболізмі ксенобіотиків беруть участь близько 35 ферментів. У ньому розрізняють дві фази: 1) модифікація, що створює або звільняюча функціональні групи, 2) кон'югація - приєднання до останніх інших груп або молекул. Найбільш важливі ферменти другої фази відносяться до класу трансфераз.

Систематичні спостереження багатьох дослідників показують, що різна чутливість людей у популяції до факторів середовища залежить від індивідуальних спадкоємних особливостей, що у свою чергу приведе до адаптації або дезадаптації, що проявляється виникненням різних захворювань. Впливаючі на організм фактори навколишнього середовища підрозділяються на біотичні та абиотичні. Варто відзначити відносно “нові”, тому що серед них є не тільки техногенні речовини, але та що брати участь в ендогенному метаболізмі, – ксенобіотики. Це речовини, що є сторонніми для нормального метаболізму із сильним біологічним ефектом, зокрема цитотоксичним та генотоксичним, що поряд зі шкідливим впливом інших середовищних факторів робить свій внесок у зниження адаптаційних можливостей організму та ріст захворюваності населення. Частка генного поліморфізму (варіації ДНК-послідовності, викликані заміщенням, вставкою або делецією гена чи його ділянки) припадає на внутрішньопопуляційний рівень, що пояснює істотна відмінність реакцій людей однієї популяції на вплив того самого фактора навколишнього середовища.

У метаболізмі ксенобіотиків беруть участь близько 35 ферментів. У ньому розрізняють дві фази: 1) модифікація, що створює або звільняюча функціональні групи, 2) кон'югація - приєднання до останніх інших груп або молекул. Найбільш важливі ферменти другої фази відносяться до класу трансфераз.

На початку 60-х років, а саме з 1961 року, з'явилися перші звістки про глутатіон-s-трансферази, коли в печінках пацюків були відкриті ферменти, каталізуючі кон'югацію глутатіона (GSH) з галогенізованими ароматичними з'єднаннями. Каталітична активність глутатіон-s-трансферази забезпечує клітину механізмом захисту від шкідливого впливу цих речовин. Багатофункціональне сімейство глутатіон-s-трансфераз відіграє істотну роль як у метаболізмі канцерогенів, ліпідів, продуктів вільнорадикальних реакцій і т.д., а також в обміні катехолестрогенів, що володіють сильними генотоксичними властивостями, забезпечуючи кон'югацію метаболітів із глутатіоном, що викликає їхню інактивацію.

GST (ГСТ) (глутатіон-s-трансферази) - ферменти, відповідальні за кон'югацію сульфгідрильної SH<sub>2</sub> групи з електрофільними атомами C, N, S, O молекул ксенобіотиків. GST каталізує реакцію глутатіона з різними аліфатичними, ароматичними, епоксидними та гетероциклічними радикалами екзогенних шкідливих речовин. GST знайдені у всіх ссавців, а також рослин. У людини виділяють чотири основні класи GST: «α» - GSTA, «μ» - GSTM, «θ» - GSTT і «π» - GSTP. Відомо, що ферменти GST експресуються в основному в печінці, бруньках, тканинах головного мозку, щитовидній залозі, надниркових залозах, передміхуровій залозі у чоловіків, а також у тканинах легень (клітини бронхіального епітелію – GSTP1).

GSTP-1, або глутатіон-s-трансфераза-π-1 - один з ферментів другої фази системи детоксикації гідрофобних та електрофільних ксенобіотиків та канцерогенів (ліків, токсинів, продуктів окисного стресу при впливі УФ-променів, важких металів), який здійснює їхнє перетворення з активних метаболітів у нетоксичні водорозчинні компоненти та запобігає, таким чином, руйнування ДНК. Є також основним ферментом, що забезпечує перетворення поліароматичних вуглеводнів тютюнового диму в канцерогенні похідні.

Метою дослідження було виявити частоту поліморфізму ферменту глутатіон-s-трансферази-п (GSTP1) і його зв'язок з розвитком і особливостями перебігу легеневого туберкульозу в Одеській області.

Дослідження проводилося на базі Одеського обласного туберкульозного Диспансеру та Одеської туберкульозної лікарні. У процесі роботи використовувалися анонімні опитувачі універсального зразка, які дозволяли врахувати генетичну схильність до туберкульозу та іншим легневим захворюванням, несприятливі впливи навколишнього середовища у зв'язку з місцем проживання та характером роботи батьків, фактор паління і т.д. Також були враховані дані історій хвороби, аналізів, що зробили пацієнтів, а також зібрані нами кров, мочачи та конденсат видихуваного повітря. Генетичні дослідження проводилися на базі Центральної клінічної лабораторії ОНМедУ, згідно з існуючими нормативами.

## **РОЗДІЛ 1. ОСНОВНІ ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ ДОСЛІДЖУВАНОЇ ТЕМИ**

### **1.1. ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ТУБЕРКУЛЬОЗУ У СВІТІ, УКРАЇНІ ТА ОДЕСЬКОЇ ОБЛАСТІ.**

Туберкульоз є основною причиною смерті від виліковних інфекційних хвороб. На підставі результатів спостережень про перевагу тих або інших хвороб і інфекцій, даних систем спостереження та зареєстрованих випадків смерті було виявлено 8,9 мільйонів знову виявлених випадків туберкульозу в 2004 році. Про менш ніж половину з них стало відомо громадським організаціям і ВООЗ. Близько 3,9 мільйонів випадків були бактерiovиделителями, що є найнебезпечнішою формою захворювання туберкульозом.

Африканський підрозділ ВООЗ зареєстрував найбільшу частоту захворюваності (356 випадків на 100000 людей у рік). Але більшість пацієнтів з туберкульозом живуть у найбільш населених країнах Азії. Бангладеш, Китай, Індія, Індонезія та Пакистан разом формують близько половини (48%) нових випадків, що виявляються в рік. Близько 80% знову виявлених випадків туберкульозу в рік припадають на 22 самі населені країни миру.

Туберкульоз – це, насамперед, захворювання людини. Там, де рівень передачі Мікобактерії Туберкульозу (МТ) стабільно росте протягом багатьох років, найбільше часто хворіють люди молоді та середнього віку. І найчастіше це гострі випадки інфекції або реінфекції. Там же, де рівень зараженості падає – частіше занедужують люди вікові. При цьому виявляються випадки поновлення (реактивації) латентних інфекцій. У країнах західної Європи та Північної Америки, де рівень захворюваності низький, виявляються або літні пацієнти з туберкульозом, або іммігранти з густонаселених країн, переважно молодого або середнього віку.

Враховуючи труднощі у виявленні дитячого туберкульозу, можна пояснити факт досить низкою статистики випадків захворюваності у віці від 0 до 14 років, навіть в областях з високим рівнем передачі МТ (10% нових випадків в Африці в 2004 році, 2% у розвинених країнах).

В 2004 році було виявлено 1, 4 мільйони бактеріовиділювачів у чоловіків і 775 тисяч у жінок. У деяких випадках можна сказати, що жінки мають менший доступ до діагностичних центрів. Але в цілому, це співвідношення розкриває реальні епідеміологічні відмінності між статями, як у прояві інфекції, так і в схильності до переходів в активні форми.

Незважаючи на те, що частота виявлення туберкульозу на душу населення поступово росте у світі в цілому, захворюваність у регіонах Південно-Східної Азії та Океанії, розвинених країнах, центральній Європі, Латинській Америці та країнах східного середземномор'я залишається на стабільному рівні або навіть знижується. Глобальний ріст обумовлений високою захворюваністю в країнах східної Європи (в основному - Радянського Союзу) з 1990 року та Центральної та Північної Африки із середини 80-х. Проте, існують дані про поступове вповільнення росту інфікування в цих регіонах із середини 90-х років, що на даний момент дозволяє взяти під сумнів дані по східній Європі. Особливо це стосується Росії та прибалтійських республік. У той же час у таких країнах, як Таджикистан і Узбекистан, одержати достовірну інформацію не завжди вдається, що дозволяє припускати ріст захворюваності.

Зібравши воедино дані з 9 регіонів можна одержати загальні цифри захворюваності. Так, частота виявлення випадків туберкульозу найбільше швидко (на 1,5%) росла в 1995 році, але, завдяки динаміці в Африці та східній Європі, з тих пор стала падати. Триваючий зріст глобальної захворюваності, виявлений в 2004 році, обумовлений, на наш погляд, ситуацією у двох регіонах Африки.



Ситуація з високою захворюваністю туберкульозом у східній Європі пояснюється низьким економічним рівнем країн, недостатньо розвиненій системі туберкульозного контролю та відсутністю стандартів охорони здоров'я з 1991 року. На підставі результатів регулярних спостережень, більш ніж 10% знову виявлених випадків туберкульозу в Естонії, Латвії та деяких областях Росії є полірезистентними (ПР). Тобто лікування їх за допомогою ізоніазида та рифампіцину – двох найбільш ефективні препаратів при туберкульозі – не дає результату. Медикаментозна стійкість з'явилася, імовірно, через події, що призвели до загального розвитку туберкульозної інфекції в цих країнах, а не стала причиною її появи. Незважаючи на те, що деякі регіони східної Європи є справжніми « гарячими точками» ПР-туберкульозу, усього 3% випадків знову виявленого туберкульозу у світі можна віднести до цієї групи. При цьому частота виявлення ПР значно зростає у випадках із вторинним і хронічним туберкульозом.

Багато в чому глобальний ріст захворюваності туберкульозом з 1980 року пов'язаний з поширенням СНІДу в Африці. У цілому по миру, 13% дорослих, у яких був виявлений первинний туберкульоз, були заражені СНІДом (2004 рік). Але при цьому дані сильно різнилися по регіонах: так, 34% таких випадків довелося на Африку та усього 1,4% на Океанію. А в таких країнах, як Бангладеш, Індонезія, Китай і Пакистан частота виявлення СНІДу у хворих туберкульозом була менше 1%. В африканських поселеннях з високим рівнем захворюваності СНІДом, досить велике була кількість жінок хворих туберкульозом у віці 15-24 років.

При цьому частота випадків туберкульозу в Африці поступово знижується, дуже імовірно, тому що стабілізувалася або навіть сповільнилася захворюваність СНІДом. СНІД впливає на прояв тих або інших форм туберкульозу, чому на загальну частоту захворюваності, тому що ВІЛ значно знижує рівень імунітету в пацієнтів з туберкульозом. Там, де рівень захворюваності СНІДом високий у загальному серед населення, значний він і

серед хворих туберкульозом. У таких країнах, як Ботсвана, ПАР, Замбія та Зімбабве він, наприклад, перевищив 50% в 2004 році.

Незважаючи на те, що ВІЛ-інфекція має значний ефект на епідеміологію туберкульозу, інші потенційні фактори ризику теж не можна скидати з рахунків. У найближчі кілька років необхідно буде приділити увагу взаємовпливу туберкульозу та хронічних хвороб: діабету, кахексії та захворювань органів подиху, викликаних тютюнокурінням і забрудненням повітря.

Туберкульоз залишається ключовим моментом у міжнародній статистиці захворюваності, в основному, тому що він «убиває» людей молодого та середнього віку. Більш ніж 80% проблем, викликаних туберкульозом, проявляються в тому, що вражаються люди працездатного віку. Це найчастіше приводить не тільки до тривалої хвороби, але та до передчасної смертності. Близько 1,7 мільйона людей померло від туберкульозу в 2004 році, з них 264 тисячі пацієнтів, інфікованих при цьому СНІДом. Оскільки деякі країни поєднують статистику причин смертності, дані смертності від туберкульозу по деяких регіонах і миру в цілому можуть бути трохи неточними. Але все-таки, ґрунтуючись на різних дослідженнях, можна зробити висновок, що частота смертності від туберкульозу почала падати з 200 року, після підйому в 90-х.

Згідно зі зводом законів, прийнятих на засіданні ООН «Міленіум – Мети Розвитку» (ММР 6, ціль 8): « до 2015 року повинен бути зупинений зріст і початися зниження поширення малярії та інших інфекцій (включаючи туберкульоз) – і мета ця не є важкою для досягнення». При цьому, у самої ММР передбачена програма «Партнерство – Зупинимо Туберкульоз», чия мета – знизити смертність від туберкульозу в період з 1990 по 2015 рік. Особливо уважно ця організація буде працювати на території Африки та східної Європи.

## **1.2. МЕТОДИКА ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ФЕРМЕНТУ ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗИ-П: ІСТОРІЯ, АКТУАЛЬНІСТЬ, ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ.**

### **1.2.1. БУДОВА ТА БІОЛОГІЧНА РОЛЬ ГЛУТАТІОН-ТРАНСФЕРАЗ.**

GST — суперсімейство цитозольних ферментів другої фази системи детоксикації, каталізуючих ковалентне приєднання глутатіона до електрофільних молекул широкого спектра ксенобіотиків, перетворюючи їх у полярні, водорозчинні, нетоксичні з'єднання, що підлягають виведенню з організму. Субстратами для ферментів GST є: органічні фосфати, епоксиди, бензо(а)пирен, гетероциклічні радикали екзогенних токсинів; деякі хіміотерапевтичні препарати, що включають антрацикліни, метаболіти циклофосфаміду, алкіллучі агенти.

Відмінності у ферментативній активності деяких класів GST можуть бути обумовлені генетичними поліморфізмами відповідних генів. У генах GSTM1 і GSTT1 виявлений генетичний поліморфізм, представлений наявністю протяжної делеції ділянки гена, у результаті чого білковий продукт не буде утворюватися. Один з поліморфізмів, описаних для гена GSTP1, являє собою однонуклеотидну заміну 1578A-G (Ile157Val), яка визначає низьку функціональну активність білка.

Внутрішньовидові відмінності у ферментативній активності ферментів GST завдяки поліморфізму генів визначають різний ступінь схильності до різних захворювань. Є дані про асоціацію деяких генотипів GSTM1, GSTT1 і GSTP1 з такою патологією, як бронхіальна астма (GSTM1 0/0), ендометріоз (GSTM1 0/0), звичне невнесення вагітності (GSTP1-val/Val) і ін. Крім того, є дані про роль у патогенезі таких онкологічних захворювань, як рак легенів у курців (GSTT1 0/0, GSTM1 0/0), рак сечового міхура (GSTP1-val/Val), рак

молочної залози (GSTP1-alleleO5, GSTM1 0/0), пухлини шлунково-кишкового тракту та системи кровотворення (GSTM1 0/0, GSTT1 0/0).

### **1.2.2. ВЗАЄМОДІЯ ГЕНЕТИЧНИХ І ЗОВНІШЬОСЕРЕДОВИЩНИХ ФАКТОРІВ У ПРОЦЕСІ РОЗВИТКУ ХВОРОБ ЛЕГЕНІВ.**

Проблема взаємодії генетичних і зовнішньосередовищних факторів не втрачає актуальності протягом багатьох десятиліть. У загальних словах еколого-генетичні взаємодії можна охарактеризувати як неаддитивний внесок генетичних факторів і факторів навколишнього середовища в експресію фенотипу. Ідентифікація специфічних генів і екзогенних факторів, які, взаємодіючи між собою, формують норму реакції стійкості людину до середовища проживання, становить величезний інтерес для генетики людини. Своєрідною моделлю для дослідження взаємодії генетичних і зовнішньосередовищних факторів є мультифакторіальні захворювання (МФЗ), а вивчення їх генетичної природи представляється однією з фундаментальних завдань медичної генетики.

При аналізі молекулярно-генетичної природи МФЗ принципову важливість здобуває питання: у чому полягає біологічний зміст асоціації між поліморфними генами та МФЗ. Один з варіантів відповіді припускає, що відповідний ген має безпосереднє відношення до формування схильності, тому що його продукт прямим або непрямим образом задіяний у патогенезі МФЗ. Оскільки в патогенез МФЗ утягується багато різних функціонально взаємозалежних генів, програма молекулярно-генетичних досліджень природи МФЗ є найбільш повною та всебічною, коли в аналіз включаються не тільки головні гени, але та гени-модифікатори, ефект яких багато в чому визначається зовнішньосередовищними впливами.

Вільні радикали, вдихувані з повітря (тютюновий дим і поллютанти) і виділювані нейтрофілами, інактивують інгібітори протеаз, підвищуючи активність еластази, яка ушкоджує органі подиху, руйнуючи еластин, білки екстрацелюлярної мембрани та сурфактанта. Компоненти тютюнового диму, пил і інфекції активують діяльність альвеолярних макрофагів і нейтрофілів, що також сприяє підвищенню рівня нейтрофільної еластази та металопротеїнази, що відіграють важливу роль у патогенезі ХОЗЛ. Таким чином, оксиданти тютюнового диму та інгалюємих газів формують дисбаланс у системі протеолізу та анти-протеолізу, що веде до руйнування структурних елементів альвеол і формуванню емфіземи.

Найважливішими компонентами системи антипротеолізу є  $\alpha$ -1-антитрипсин (ААТ) і  $\alpha$ -1-антихімотрипсин. ААТ ставиться до сироваткових білок групи  $\alpha$ -1-глобулінів і обумовлює близько 90% усієї трипсинінгібуючої здатності плазми. ААТ є основним інгібітором серінових протеаз, до яких ставляться трипсин, хімотрипсин, нейтрофільна еластаза, колагеназа. Найбільша концентрація ААТ виявлена в сироватці крові, і близько 10% його сироваткового рівня визначається на поверхні епітеліальних кліток дихальних шляхів. Відомо, що ААТ належить до білків « гострої фази» і його концентрація в сироватці збільшується при запальних процесах в 2-3 рази. Таке підвищення концентрації ААТ має великий біологічний зміст, тому що дозволяє запобігти ушкодженню тканин протеолітичними ферментами в місцях гострого запалення. Недостатнє зростання рівня ААТ при вірусних і бактеріальних респіраторних інфекціях, обумовлене дефіцитом ААТ, може сприяти ушкодженню тканин еластазою нейтрофілів і іншими протеолітичними ферментами. У зв'язку з тим, що ААТ є важливим компонентом складної системи інгібіторів протеаз, порушення рівноваги, обумовлене вродженим дефіцитом ААТ, може, за певних умов, привести до надлишкової дії ферментів, руйнуванню найтонших міжальвеолярних перегородок і злиттю окремих альвеол у великі емфізематозні порожнини з

поступовим зменшенням загальної дихальної поверхні легенів. В основі молекулярного дефекту ААТ лежать мутації гена інгібітору протеїназ (proteinase inhibitor, Pi). Ген Pi розташований на довгому плечі хромосоми 14 в області q31-32. Переважно він експресується у двох типах кліток (макрофаги та гепатоцити). До теперішнього часу ідентифіковане не менш 90 різних генетично детермінованих варіантів ААТ, що становлять Pi-Систему. Алелі гена Pi підрозділені на 4 групи: нормальні, асоційовані з фізіологічним рівнем концентрації ААТ у сироватці крові; дефіцитні, при наявності яких рівень концентрації інгібітору знижується до 35% від норми, і нульові, у присутності яких інгібітор у сироватці не визначається або зміст інгібітору в нормі, але його активність різко знижена. Дефіцитні алелі гена Pi виникають внаслідок крапкових мутацій і позначаються як Z і S. У гомозиготних носіїв алеля Z (тип Pizz) спостерігається різке зниження концентрації ААТ у плазмі та в 80% випадків розбудовується важка первинна емфізема легенів, що нерідко сполучається із цирозом печінки [41,42]. У гетерозигот Pims і Pimz (M — алель дикого типу) відзначається зниження рівня ААТ до 80-60% від нормального рівня, тоді як у носіїв генотипу Pisz концентрація ААТ нижче норми всього на 40%. У курців з генотипом Pisz підвищений ризик розвитку ХОБЛ. Залишається остаточно не вирішеним питання про значення гетерозиготних форм ААТ у розвитку ХОЗЛ. Існують суперечливі думки по цім питанню, однак більшість дослідників вважає, що гетерозиготне носійництво дефіцитних форм ААТ є лише фактором ризику, на тлі якого більшою мірою проявляється патогенна дія екзогенних і інших ендогенних факторів.

Основні захисні системи організму від вільнорадикальних ушкоджень умовно можна розділити на три групи: антиоксидантні ферменти, низькомолекулярні з'єднання та комплекси іонів металів змінної валентності. Основу антиоксидантної ферментативної захисної системи становлять супероксиддисмутаза, каталаза, гемоксигеназа та ферменти глутатіон-

редоксицикла. Вони розривають ланцюг вільноорадикальних реакцій шляхом зниження концентрації вільних радикалів, що ініціюють цей процес.

До головного антиоксиданту в легенях ставиться позаклітинна супероксиддисмутаза (ВК-СОД), яка є секреторним глікопротеїдом, концентрованим в інтерстиціальному просторі. ВК-СОД має високу спорідненість до глікозаміногліканів, таких, як гепарин-сульфат. Більш ніж 98% ВК-СОД пов'язане із сульфатом гепарину в матриксі сполучної тканини. Це ідеальна локалізація для того, щоб претендувати на головну роль у захисті тканин від дії, що ушкоджує, АФК. Ген ВК-СОД складається із трьох екзонів, картований на хромосомі 4 в області 4Pter-Q21. Показане, що заміна аргініну на гліцин у положенні 213 білка ВК-СОД (мутація Arg213Gly) зустрічається в різних популяціях із частотою від 2% до 6%. Дана заміна торкається гепаринзв'язуючий домен молекули ферменту, що, у свою чергу, приводить до 10-кратного збільшення концентрації ВК-СОД у крові та зниження його концентрації в тканинах. Незважаючи на очевидну патогенетичну значимість цього ферменту в розвитку ХОЗЛ, у літературі поки немає даних про частоту цієї мутації у хворих ХОЗЛ і її асоціації з розвитком патологічного процесу при даному захворюванні.

Іншим ферментом антиоксидантної системи організму є гем-оксигеназа-1 (Heme oxygenase-1, HMOX1), яка бере участь у розкладанні гема до білівердину, здійснюючи, тим самим, клітинний захист проти гема та негемових оксидантів. У промоторній частині гена HMOX1 виявлений динуклеотидний (СГ) поліморфізм, що впливає на рівень транскрипції гена. Установлена зворотна кореляція між числом Gt-Повторів і активністю гена: чим більше Gt-Повторів, тем менше активність промоторної ділянки гена та, отже, вище ймовірність розвитку емфіземи легенів.

Глутатионова антиоксидантна система ефективно захищає клітини від оксидативного стресу. Глутатіон — це низькомолекулярний трипептид, який є присутнім у високих концентраціях у кожній клітці, а також позаклітинно.

Зокрема, він утримується в надлишку в рідині, що вистилає епітелій легенів, яка є першою лінією оборони від інгальованих оксидантів. Глутатіон-s-трансферази — мультигенне сімейство відповідних ферментів, яке бере участь у детоксикації великого числа електрофільних ксенобіотиків шляхом їхньої кон'югації із глутатіоном, а також у метаболізмі деяких ендогенних з'єднань (гормонів, ліпідів, простагландинів, лейкотриєнів). Глутатіонопосередована детоксикація відіграє ключову роль у забезпеченні стійкості кліток до перекісного окиснення жирів, вільних радикалів, алкілювання білків, у формуванні резистентності до лікарських препаратів і запобіганні поломок ДНК.

Експресія глутатіон-s-трансфераз здійснюється у всіляких тканинах, але особливо вона висока в печінці, легенів, мозку, нирках, кишечнику, плаценті. Синтез глутатіон-s-трансфераз контролюється різними генами, у кожному з них виявлені поліморфізми, що суттєво впливають на їхні функції. До теперішнього часу в ссавців відомо 6 підкласів глутатіон-s-трансфераз: alpha, mu, kappa, tetha, pi і sigma, подібних за своїми амінокислотними послідовностями.

GSTP-1, або глутатіон-s-трансфераза- $\pi$ -1 - один з ферментів другої фази системи детоксикації гідрофобних та електрофільних ксенобіотиків та канцерогенів (ліків, токсинів, продуктів окисного стресу при впливі УФ-променів, важких металів), який здійснює їхнє перетворення з активних метаболітів у нетоксичні водорозчинні компоненти та запобігає, таким чином, руйнування ДНК. Є також основним ферментом, що забезпечує перетворення поліароматичних вуглеводнів тютюнового диму в канцерогенні похідні.

Ген GSTP1 локалізовано на хромосомі 11 (11q13) і переважно експресується в альвеолярних клітинах, альвеолярних макрофагах, бронхіолах і в плаценті. Описано 4 типу поліморфних варіанта гена GSTP1, які виходять при комбінації двох діалельних поліморфізмів гена: P1e05Val



(5-й екзон) і Alal4Val (6-й екзон). При мутації 105Val в 7 раз збільшується каталітична активність ферменту стосовно поліциклічних ароматичних з'єднань, але в 3 рази знижена активність стосовно хлор-2, динітро-бензену. Було виявлено, що індивіди з алелем 105Val мають підвищений ризик розвитку рака легенів. Дані літератури по асоціації поліморфних алелей гена GSTP1 із хронічним обструктивним бронхітом, суперечливі. Так, дослідниками з Японії була виявлена асоціація даної патології дихальної системи з алелем 105Ile, у той же час у хворих корейців такої асоціації не виявлено, у хворих з Великобританії була виявлена асоціація з алелем 105Val.

Тривала експозиція аероірітантів є основним патогенетичним фактором у розвитку хронічного запалення дихальних шляхів. Ефективний захист від різних шкідливих речовин, що надходять із вдихуванням повітрям, здійснюється складною системою узгоджено функціонуючих захисних механізмів. Компонентами цієї системи є метаболізм і детоксикація токсичних продуктів. Біотрансформація ксенобіотиків — процес багатоступінчастий, у якому беруть участь багато ферментів детоксикації. Усі ферменти, що становлять цю складну систему, функціонують як єдиний чітко скоординований комплекс. Основні фази знешкодження ксенобіотиків індуцибельні та функціонально взаємозалежні, що має важливе значення в біології та медицині. Будь-які якісні або кількісні відхилення функцій її складових супроводжуються порушенням процесів знешкодження ксено- і ендобіотиків, нагромадженням недоокиснених проміжних продуктів, що веде до непередбачених, найчастіше шкідливим наслідкам для організму.

Таким чином, комбінація факторів ризику навколишнього середовища (паління, забруднення повітря, інфекції) і генетичної схильності сприяє виникненню захворювань дихальних шляхів, зокрема туберкульозу. Вивчення взаємодії генетичних і зовнішньосередовищних факторів є важливим внеском у розуміння патогенетичних механізмів туберкульозу. У

рамках розглянутої проблеми ідентифікація специфічних генів, залучених у патогенез туберкульозу, і аналіз взаємодії генома та навколишнього середовища при розвитку захворювань органів подиху є важливим медико-генетичною проблемою, розв'язок якої буде сприяти формуванню фундаментальних вистав про патогенетичних механізмах розвитку туберкульозу.

### **1.2.3. ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ та ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ХІМІОТЕРАПІЇ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ЛЕГЕНІВ.**

Традиційні мікробіологічні дослідження відіграють велику роль у специфічній діагностиці туберкульозу легенів. Однак у зв'язку з недостатньою чутливістю бактеріоскопічного дослідження та тривалістю методу посіву роль даних методів у діагностиці туберкульозу як з легеневої, так і із позалегеневою локалізацією процесу нерідко залишається обмеженою.

Молекулярно-генетичні методи, зокрема метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), застосовуються в лабораторній діагностиці туберкульозу з початку 90-х років минулого століття. Метод ПЛР зарекомендував себе як специфічний, високочутливий і швидкий для виявлення та ідентифікації збудників туберкульозу та мико-бактеріозів у діагностичних матеріалах.

При використанні ПЛР-аналізу істотне значення мають не тільки сама система ампліфікації специфічних фрагментів ДНК і способи її детекції, але та спосіб виділення ДНК, оскільки ця процедура є щодо трудомісткою та впливає на рівень чутливості аналізу у зв'язку з ефективністю виділення ДНК і присутністю інгібіторів ПЛР у діагностичних матеріалах.

Імуномагнітний сорбент, використовуваний у процесі виділення ДНК, являє собою покриття оксидом кремнію феромагнітні мікрочастинки розміром 2-5 мкм, які зв'язані хелатним методом з більшою кількістю антитіл до мікобактерій туберкульозу (МБТ) класу Igg, отриманих з високотитражних сироваток кроликів, багаторазово імунізованих МБТ, інактованими  $\gamma$ -Опромінням (3 млн радий).

Імуномагнітна сепарація полягає в наступному: мокротиння лізують додаванням рівного обсягу 4% розчину NaOH, при густих зразках додають 50-

80 мг сухого Ацетил-В-Цистеїна; потім зразки нейтралізують додаванням рівного обсягу 1М розчину соляної кислоти (рН 1,7), що містить 40 мг/л кольорового індикатору фенолового червоного. Нейтралізацію визначають по переходу фарбування зразка від вишневої до жовтувато-червоної.

0,1 мол суспензії імуномагнітного сорбенту вносять у досліджуваний матеріал і інкубують при неінтенсивному перемішуванні 40-50 хв. Після чого комплекс магнітних мікрочастинок із МБТ видаляють зі зразка за допомогою простого магнітного обладнання – магнітної палички, що вставляється усередину одноразового наконечника для автоматичної піпетки ємністю 5 мол. Переносять у мікропробірку типу Еппендорф, що містить 0,7 моль нейтрального 1-буферного розчину. Потім до осаду мікрочастинок додають 20-30 мкл 2% розчину тритону Х-100 і прогрівають при 90°C протягом 30 хв. Супернатант використовують для аналізу в ПЛР. Результати ПЛР детектують за допомогою традиційного агарозного гель-електрофореза з фарбуванням бромистим етидієм і визначенням, що виявляються флюоресцюючих смуг ДНК стосовно контрольних зразків.

Чутливість ПЛР-аналізу при використанні імуномагнітної сепарації становить для різних клінічних форм уперше виявленого туберкульозу легенів 76%, якщо при цьому частка пацієнтів з відносно невеликими процесами, без деструкції легеневої тканини становить у досліджуваній групі 29%.

За даних умов ПЛР-аналіз ефективний в 56% випадків, тоді як культуральне дослідження — лише в 22% випадків. Специфічність дослідження мокротиння методом ПЛР становить 99,4%, діагностична ефективність — 94,3%. Контроль за бактеріовидільництвом за допомогою ПЛР у процесі успішної хіміотерапії туберкульозу легенів суттєво більш ефективний у порівнянні із традиційними мікробіологічними методами. При ПЛР-Аналізі бактеріовидільництво у хворих з деструктивними формами туберкульозу легенів виявляється на 2-2,5 місяця довше, чим при

традиційних методах, і припиняється при ефективній хіміотерапії. Отримані результати адекватно характеризують клініку туберкульозу легенів і чітко корелюють зі зникненням клініко-рентгенологічних ознак активності туберкульозного процесу.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводилося на базі Одеського обласного туберкульозного диспансеру та Одеської туберкульозної лікарні. У процесі роботи використовувалися анонімні опитувачі універсального зразка, які дозволяли врахувати генетичну схильність до туберкульозу та іншим легенеvim захворюванням, несприятливі впливи навколишнього середовища у зв'язку з місцем проживання та характером роботи батьків, фактор паління і т.д. Також були враховані дані історій хвороби, аналізів, що зробили пацієнти, а також зібрані кров та сеча. Генетичні дослідження проводилися на базі Центральної клінічної лабораторії ОНМедУ, згідно з існуючими нормативами.

Для первинного етапу роботи випадковим образом було відібрано 45 зразків крові хворих туберкульозом. Діагноз туберкульозу був поставлений на підставі загальноприйнятих клінічних, рентгенологічних, лабораторних і функціональних досліджень.

Для вторинного етапу роботи в декількох групах студентів ОНМедУ були зроблені зіскрібки буккального епітелію зі слизуватої щоки за допомогою стерильних одноразових ендоцервикальних щіточок з наступним транспортуванням в еппендорфах обсягом до 1000 мкл у прикладеній до набору для виділення ДНК «Днк-Сорб-А» транспортному середовищу («Амплісенс», Москва);

Оцінка наявності або відсутності поліморфізму по GSTP1 проводилася за допомогою електрофореza в 2% агарозному гелю. Використані методи дозволяли розрізнити гомозиготну делецію (одна смуга на електрофореграммі) від гетерозиготи та нормальної гомозиготи (дві смуги на електрофореграммі).

## **МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ.**

Справжнє дослідження проводилося по системі, що включає 3 послідовних етапу: випадкову вибірку, виділення ДНК і ПЛР-діагностика та статистичний аналіз отриманих даних. Таким чином, дана система обробки даних включала якісний і кількісний етапи відбору та аналізу.

### **2.1. Принципи формування групи дослідження. Проведення аналізу статистичних даних.**

У фтизіатрії для характеристики епідемічної ситуації та різних сторін протитуберкульозної роботи використовують велику кількість показників. Тільки для оцінки ендемії туберкульозу застосовують до півтора десятків показників. При цьому, як правило, автори досліджень проводять відбір показників, що відбивають оцінювані властивості об'єктів, або ґрунтуючись на власному досвіді та своїх пристрастях, або покладаючись на думку інших дослідників.

Дотепер не існує науково обґрунтованої системи формування наборів показників для оцінки умов, а також того або іншого розділу протитуберкульозної роботи. Роль подібного відбору зростає при використанні методів одержання інтегральних оцінок. Очевидно, що інтегральні оцінки залежать від того, які показники взяті в групу. Тим часом, судячи з багатьом науковим роботам, відбір показників для оцінювання відбувається безсистемно та без наукового обґрунтування. Якщо обрані показники використовуються для простого наукового аналізу властивостей об'єкта, то дослідник може вибрати будь-які ознаки в довільній кількості. Завдання вибору показників стає більш відповідальним, якщо в результаті аналізу потрібно врахувати управлінський розв'язок, адекватний результатам оцінювання. Наприклад, коли на основі обраних показників проводиться

оцінка об'єктів з поділом їх на умовно «гарні» і «погані» з метою прийняття певного управлінського розв'язку.

### **2.1.1. Випадкова вибірка.**

На першому етапі було випадковим образом обрано 50 хворих туберкульозом, що перебували на лікуванні або обліку в Одеському Обласному Туберкульозному Диспансері та Одеській Туберкульозній Лікарні.

Для вивчення стану хворих туберкульозом легких була розроблена та використана анкета-опитувач універсального зразка, яка дозволяла врахувати генетичну схильність до туберкульозу та іншим легеневим захворюванням, несприятливі впливи навколишнього середовища у зв'язку з місцем проживання та характером роботи батьків, фактор паління і т.д. Анкета заповнювалася самими хворими (у декількох випадках, коли це було неможливе, заповнювалася за згодою хворих під їхнє диктування медичним персоналом). Відомо, що методики анкетування, у яких випробуваний відповідає на запитання самостійно, більш повно відбивають досліджувані показники, чому ті, у яких результати отримані за допомогою інтерв'юера. Кожний анкетуємий письмово підтверджував свою згоду брати участь у дослідженні. Його доводили до відома про те, що обстеження анонімне і його прізвище ніде не буде фігурувати, аналізуються тільки його відповіді. Анкетування займало в середньому 5 хв.

Після анкетування оброблялися дані, внесені в історії хвороби.

Ураховувалися наступні показники:

1. Дата вступу в лікарню;
2. Діагноз при вступі в лікарню;
3. Клінічний і остаточний діагнози;
4. Дані анамнезу хвороби. Тривалість перебігу хвороби;



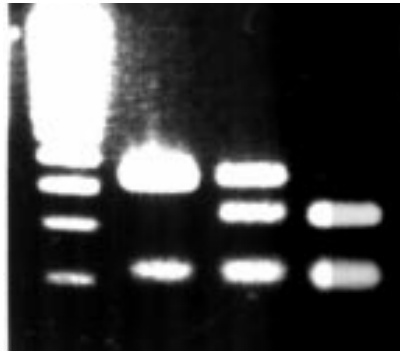
5. Дані анамнезу життя. Фактори, що визначають схильність хворого до туберкульозу;
6. Генетичний анамнез. Схильність хворого до захворювань легенів, інфекційним хворобам. Наявність туберкульозу в родички;
7. Дані клініко-лабораторних досліджень;
8. Тактика та строки лікування;
9. Результат захворювання.

Номер	№IX	П.І.Б.	Вік	Стать	Діагноз	МГ	Кінець	Лік.	Р
003	1340	Стоянов Г.Г.	49	М	Акт. лег. Ть I кат. инф. с распадом	ОТД	вип	нет	-
004	1444	Фартушняк А.П.	25	М	Акт. Ть лимфоузлов I кат.	ОТД	вип	нет	+
006	1441	Антонюк Л.В.	54	Ж	Акт. лег. Ть IV кат. с расп., дисс.	ОТД	вип	да	+
007	1458	Пешихин А.В.	37	М	Акт. лег. Ть I кат. инф., с расп.	ОТД	вип	нет	+
009	15	Константинов В.С.	29	М	Акт. лег. Ть II кат. инф.	ОТД	вип	да	+
011	322	Захаров А.В.	50	М	Акт. лег. Ть II кат. с расп., дисс.	ОТБ	вип	да	+
019	515	Телегуз С.В.	64	М	Акт. лег. Ть I кат. инф., с расп.	ОТД	вип	нет	+
021	503	Зеленов И.В.	28	М	Акт. лег. Ть I кат. с расп., дисс.	ОТД	вип	нет	+
022	514	Филенко Е.В.	44	Ж	Акт. лег. Ть I кат. с расп., дисс.	ОТД	вип	нет	+
023	516	Коваленко В.В.	22	М	Акт. лег. Ть I кат. инф.	ОТБ	вип	нет	+
024	526	Лопушанский В.В.	44	М	Акт. лег. Ть I кат. с расп., дисс.	ОТД	вип	нет	+
026	551	Помеленко В.В.	41	М	Акт. лег. Ть II кат. дисс.	ОТБ	вип	да	+
028	518	Зобков В.И.	71	М	Акт. лег. Ть I кат. с расп., фибр-кав.	ОТД	вип	нет	-
030	500	Красинский Л.В.	50	М	Акт. лег. Ть I кат. инф., с расп.	ОТБ	вип	нет	-
031	502	Зеленов В.И.	55	М	Акт. лег. Ть I кат. инф.	ОТД	вип	нет	+
032	501	Яценко В.Г.	22	М	Акт. лег. Ть I кат. инф., с расп.	ОТБ	вип	нет	+
033	494	Бурмистенко В.П.	46	М	Акт. лег. Ть I кат. дисс.	ОТД	умер	нет	-
034	513	Котельникова М.В.	71	Ж	Акт. лег. Ть I кат. дисс.	ОТД	вип	нет	+
035	431	Тополчан А.Н.	58	М	Акт. лег. Ть I кат. инф.	ОТБ	вип	нет	+
036	452	Атавин В.Н.	47	М	Акт. лег. Ть I кат. инф.	ОТБ	вип	нет	+
038	470	Матернюк И.П.	34	М	Акт. лег. Ть I кат. с расп., дисс.	ОТД	вип	нет	+
040	574	Лаврентьев А.А.	36	М	Акт. лег. Ть I кат. с расп., дисс.	ОТД	вип	да	+
043	562	Тершин С.И.	37	М	Акт. лег. Ть I кат. инф., с расп.	ОТД	вип	нет	+
044	549	Михайлуца И.Н.	40	М	Акт. лег. Ть I кат. с расп., дисс.	ОТД	вип	нет	+
045	559	Привалов М.В.	53	М	Акт. лег. Ть II кат. инф.	ОТД	вип	да	+
046	544	Венгер Ж.М.	39	Ж	Акт. лег. Ть I кат. с расп., дисс.	ОТД	вип	нет	+
047	553	Птичкин В.В.	62	М	Акт. лег. Ть I кат. инф., с расп.	ОТД	вип	нет	+
048	558	Авраменко В.В.	35	М	Акт. лег. Ть IV кат., дисс.	ОТД	вип	да	-
049	529	Шудра Я.И.	40	М	Акт. лег. Ть I кат. с расп., дисс.	ОТБ	вип	нет	-
050	554	Шамотин А.А.	39	М	Акт. лег. Ть I кат. инф., с расп.	ОТД	вип	нет	-
052	530	Алексеев В.Д.	55	М	Акт. лег. Ть II кат., дисс.	ОТБ	вип	да	+
053	535	Гуцу Ф.Ф.	41	М	Акт. лег. Ть I кат. инф.	ОТД	вип	нет	+
054	586	Чернишева Е.А.	64	Ж	Акт. лег. Ть I кат. дисс.	ОТД	вип	нет	+
055	539	Заобурний В.Б.	36	М	Акт. лег. Ть I кат. с расп., дисс.	ОТБ	вип	нет	-
057	627	Стрелец О.В.	31	М	Акт. лег. Ть II кат. очаг.	ОТД	вип	да	+
060	613	Харченко Л.А.	51	М	Акт. лег. Ть I кат. с расп., дисс.	ОТД	вип	нет	+
062	541	Орлов В.И.	59	М	Акт. лег. Ть I кат. с расп., дисс.	ОТБ	вип	нет	+
063	608	Малидов О.С.	29	М	Акт. лег. Ть I кат. инф., с расп.	ОТД	вип	нет	+
064	601	Греков Е.П.	42	М	Акт. лег. Ть IV кат. фибр-кав.	ОТБ	вип	да	-
067	610	Аль А.Х.	72	М	Акт. лег. Ть I кат. инф., с расп.	ОТБ	вип	нет	+
068	648	Довгань А.Б.	40	М	Акт. лег. Ть I кат. инф.	ОТБ	вип	нет	+
070	599	Калитка Я.В.	51	М	Акт. лег. Ть II кат. инф., с расп.	ОТД	вип	да	+
076	651	Козак Л.И.	39	Ж	Акт. лег. Ть I кат. дисс.	ОТБ	умер	нет	+
079	629	Рейх Ю.В.	25	М	Акт. лег. Ть I кат. дисс.	ОТД	вип	нет	+

## 2.2. Виділення ДНК та ПЛР-діагностика.

ПЛР – це здійснювана *in vitro* специфічна ампліфікація нуклеїнових кислот, ініціюєма синтетичними оліго-нуклеотидними праймерами. ПЛР-цикл складається з теплової денатурації ДНК, її віджигу із праймером і подовження ланцюга (елонгації); зміна цих етапів відбувається в результаті простої зміни температури. Праймери при цьому орієнтуються на матриці так, що число раундів реплікації росте експоненціально, відповідно збільшується і число копій специфічної нуклеотидної послідовності.

Для ампліфікації поліморфних варіант екзону 5 використовуються праймери EX5-1 5'-GTAGTTTGCCCAAGGTCAAG-3', починаючи з 2306 п.н. повного коду GSTP1 та EX5-2 5'-AGCCACCTGAGGGGTAAG-3', починаючи з 2721 п.н. 8 мкл виділеної ДНК додається до суміші ПЛР, що містить 0,5 U Taq-полімерази, 11 пмоль кожного праймера, 1,5 мкл 10' ПЛР буфер (містять 25 mM MgCl<sub>2</sub>) та 2,5 мкл 10xdNTPmix в кінцевому обсязі 15 мкл. «Гарячий старт» використовується для запобігання неспецифічної затравки в першому циклі ПЛР. Після початкової денатурації протягом 12 хв при 95°C, виконуються наступні 15 циклів ПЛР (денатурація протягом 30 сек при 95°C, відпал протягом 30 сек при 58°C, елонгація протягом 60 сек при 72°C), після чого виконуються 25 циклів ампліфікації (денатурація протягом 30 сек при 95°C, відпал протягом 30 сек при 55°C, елонгація протягом 60 сек при 72°C) і один цикл елонгації при 72°C впродовж п'яти хвилин. ПЛР-продукти розрізаються протягом двох годин при 37°C з п'ятьма одиницями Alw26I (Fermentas Inc, Вільнюс, Литва). Під час електрофорезу в 2% агарозному гелі при наявності алеллю 105Ile в гомозиготному стані спостерігаються фрагменти розміром 329 та 104 п.н., при наявності алеллю 105Val в гомозиготному стані – фрагменти розміром 222 та 107 п.н., у гетерозигот – всі чотири фрагменти ДНК [4].



Мал.1. Електрофореграма зразків ДНК людини, що містять поліморфізм поліморфізму 105Ile/Val гену *GSTP1*. 1 – молекулярні сходи; 2 – гомозигота 105Ile/Ile; гетерозигота 105Ile/Val; гомозигота 105 Val/Val.

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 1.1. ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ЛЕГЕНІВ ЗАЛЕЖНО ВІД ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ФЕРМЕНТУ ГЛУТАТІОН-S-ТРАНСФЕРАЗИ-п.

Хронічне тютюнокуріння – один з головних факторів ризику для розвитку легеневого туберкульозу, але тільки у відносно маленькій пропорції курців фактично розвивається туберкульоз. Спадкоємні фактори, пов'язані із цією сприйнятливістю, включають гени, що регулюють взаємодію антиокислювача-окиснювача й антипротеази-протеази. Було нещодавно припущено, що генетичні поліморфізми цитохрому P450, мікросомальної гідролази епоксида (mEPHX) та фактора некрозу пухлини (factor- $\alpha$ 21) можуть бути пов'язані з туберкульозом і ХОЗЛ.

Був вивчений розподіл генотипу поліморфізмів у положеннях 105 і 114 в *GSTP1*, що є, як було зазначено, ферментом, що приймає безпосередню участь в захисті легенів від ксенобіотиків. 105 Ile-Генотип перебував більш часто у хворих групи туберкульозу, ніж в контрольній групі, і відношення розбіжностей для гомозигот по 105Ile було 3.5. Діяльність цього ферменту

перебуває під впливом замін у положенні 105, яке розташовано в гідрофобній єднальній ділянці. Ефект цього поліморфізму змінюється залежно від типу хімічної реакції — наприклад, у реакціях доповнення Майкла, нуклеофільного доповнення та кон'югації епоксиду та каталітичної діяльності GSTP1. Також було доведено, що люди з 105 Val-алеллю мають більш високий ризик розвитку раку легенів, ніж ті, що мають 105 Ile-алель. Також існує припущення, що в GSTP1/Val105 була більш висока каталітична ефективність, ніж в GSTP1/Ile105 для канцерогенних ароматичних епоксидів [39]. Ці результати в такий спосіб дозволяють припустити, що GSTP1 могла б каталізувати детоксифікацію деяких ксенобіотиків тютюнового диму, і що ця реакція могла б також каталізуватись GSTM, mEPHX, і цитохромом P4501A1, але ніяк не глутатіон-пероксидазою. Крім того, GSTP1 відрізняється від інших GST відсутністю активності глутатіон-пероксидази. Епоксиди можуть бути знешкоджені переважно GST або епоксид-гідролазами.

Крім того, експресія гена GSTP1 в альвеолах, альвеолярних макрофагах і дихальних бронхіолах більш виражена, ніж у GSTM та інших GST, які не експресуються в легенів [41], і тому можливо, що GSTP1 може відігравати важливу роль у місцевому знешкодженні ксенобіотиків, наче mEPHX у легенях.

Відомо, що GSTP1 запобігає гальмуванню ембріонального синтезу ретиноевої кислоти альдегідами ліпідного окиснення [23]. Було також недавно визначено, що обробка ретиноевої кислоти підвищувала експресію гена GSTP1 значним образом у клітинах MGR3 (клітинна лінія людської глиобластомы), тому також можливо, що профілактична роль GSTP1 у розвитку туберкульозу може бути пояснена його взаємодією з ретиноевою кислотою.

Таким чином, 105Ile-Генотип в екзоні №5 GSTP1 може бути пов'язаний з патогенезом туберкульозу. З погляду числа об'єктів це дослідження -

попередня робота, і подальше дослідження з використанням більшої кількості хворих необхідно, щоб з'ясувати більш докладний зв'язок поліморфізмів в екзоні №5 гена GSTP1 з окремою сприйнятливістю до розвитку туберкульозу. Крім того, на додаток до можливого зв'язку між терпх і туберкульозом, дослідження функції інших ферментів метаболізму ксенобиотика, на зразок GSTP1, може забезпечити більше можливостей для проникнення в суть патогенезу туберкульозу зокрема в курців

## 1.2. ТРАКТУВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для отримання більш достовірних результатів планується збільшити кількість обстежених в обох групах.

Розподіл частот генотипів			
Досліджувані групи	Ile/ Ile	Ile/Val	Val/Val
Хворі на туберкульоз легенів (n=45)	23 (51,1%)	15 (33,3%)	7(15,6%)
Здорові (n=34)	18 (52,9%)	13(38,3%)	3 (8,8%)
$\chi^2$ (p)	0,02 (0,87)	0,20 (0,65)	0,79 (0,37)

Табл.1. Розподіл частот алелей та генотипів поліморфізму *GSTP1105Ile/Val* серед здорових та хворих на туберкульоз легенів мешканців Одеси та Одеської області

Характер перебігу захворювання	Ile/Ile n= 23 (51,1%)	Ile/Val n= 15 (33,3%)	Val/Val n= 7 (15,6%)
<b>Форма туберкульозного процесу</b>			
Дисемінована	12 (52,2 %)	10 (66,7 %)	4 (57,1 %)
Інфільтративна	9 (39,1 %)	9 (60,0 %)	2 (28,6 %)
Фіброзно-кавернозна	-	2 (13,3 %)	-
Вогнищева	2 (8,7 %)	-	1 (14,3 %)
Інша	-	-	-
<b>Наявність бактеріовиділення</b>			
За бактеріологічним методом	16 (69,6 %)	11 (73,3 %)	5 (71,4 %)
За методом бактеріоскопії	12 (52,2 %)	7 (46,7 %)	4 (57,1 %)
Тривалість бактеріовиділення на стаціонарному етапі (дні)	107±38,9	97±28,9	101±30,1
<b>Наявність деструктивних процесів</b>			
Наявність	13 (54,2 %)	10 (66,1 %)	6 (85,7 %)
Відсутність	10 (41,6 %)	5 (33,3 %)	1 (14,3 %)
Поєднання з ХОЗЛ	9 (37,6 %)	9 (60,0 %)	5 (83,3 %)

Табл. 2 Характеристика туберкульозного процесу у хворих на ВДТБ легенів залежно від поліморфних варіантів *GSTP1*

У хворих на туберкульоз з наявністю алеля Val частіше спостерігаються деструктивні процеси в легенях, а також поєднання туберкульозу з ХОЗЛ.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням критерію Стюдента (коефіцієнта ймовірності) і критерію Пірсона (критерій відповідності).

### 1.3. ВИКОРИСТАННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ У ПРАКТИЧНІЙ ОХОРОНІ ЗДОРОВ'Я

Отримані результати можуть бути використані для удосконалення ефективності лікування туберкульозу, оскільки дозволяють своєчасно визначити групу епідеміологічно небезпечних хворих з підвищеною ймовірністю несприятливого перебігу захворювання.

Частота поліморфізму GSTP1 може бути використана як контрольні дані при вивченні її асоціації зі збільшенням ризику різних мультифакторіальних захворювань.

Визначення наявності даної мутації може бути використане в якості:

- додаткової ланки клініко-лабораторного комплексу;
- при профвідборі для професій, пов'язаних з контактом із ксенобіотиками
- діагностики та профілактики легеневого туберкульозу та інших захворювань бронхо-легеневої системи.;
- при виборі напрямків і тенденцій лікування;

На основі проведених досліджень був оцінений ризик розвитку легневих форм туберкульозу та інших захворювань бронхо-легеневої системи. Обґрунтовано клініко-лабораторний комплекс молекулярно-генетичних критеріїв профвідбору для професій, пов'язаних із ксенобіотиками. Також, проведена оцінка ступеня індивідуального ризику в батьківщинах зі спадкоємною схильністю до захворювань, для яких виявлена асоціація поліморфізму GSTP-1 з підвищеним ризиком розвитку та ускладненням перебігу легневих форм туберкульозу.

## ВИСНОВКИ

1. Частота поліморфізму у здорових мешканців Одеси та Одеської області (n=34) та серед хворих на туберкульоз легенів (n=45) статистично достовірно не відрізнялась, але спостерігається тенденція до збільшення кількості гомозигот за мутацією Val/Val серед хворих на туберкульоз.

2. Виявлених відмінностей за формою туберкульозного процесу та тривалості бактеріовидільництвом в залежності від поліморфізму за геном *GSTP-1* не виявлено.

3. В носіїв алелі Val/Val достовірно відмічається підвищення вірогідності приєднання ХОЗЛ до туберкульозного процесу.



## ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Артапетян А.Б. Полімеразная цепная реакция. // Молекулярная биология (1991) 25:4, 926-936
2. Вавилин В.А., Макарова С.И., Ляхович В.В., Гавалов С.М. // Ассоциация полиморфных генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с предрасположенностью к бронхиальной астме у детей с наследственной отягощенностью и без таковой // Генетика, 2002, том 38, №4.-с.539-545
3. Гавалов С.М., Рябова О.А., Вавилин В.А., Ляхович В.В., Макарова С.И.. Ассоциация полиморфизма генов ферментов биотрансформации и детоксикации ксенобиотиков с особенностями бронхиальной астмы у детей // Аллергология (2000) №3
4. Зотова Е.В., Савостьянов К.В., Чистяков Д.А., Бурса Т.Р., Галеев И.В., Строков И.А., Носиков В.В. Поиск ассоциация полимерных маркеров генов, кодирующих ферменты антиокислительной защиты, с развитием диабетической полинейропатии у больных сахарным диабетом типа1 // Молекулярная биология (2004) 38:2, 244-249
5. Иллариошкин С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование. - М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 207 с.: ил.
6. И.Н. Фетисова Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз в семьях с первичным бесплодием // Медицинская генетика, 2006, том 5, №11 (53).- с.31-34
7. Казначеева Л.Ф., Вавилин В.А., Ляпунова А.А., Сафронова О.Г., Мананкин Н.А. Полиморфизм ферментов биотрансформации ксенобиотиков у детей с атопичным дерматитом // Аллергология (2002) №4
8. Кулинский В.И. Обезвреживание ксенобиотиков // СОЖ.1999.№1.с. 8-12

9. Куценко С.А. Метаболизм ксенобиотиков // Основы токсикологии (Март 2003)ТОМ 4, 119с.
10. Керри Б. Мюллис. Необычная история о том, как родилась полимеразная цепная реакция // В мире науки (1990) №6, 26-34
11. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Гуткина Н.И., Лактионова И.П., Макарова С.И., Митрофанов Д.В., Осташевский В.А., Часовникова О.Б. Гени и ферменты системы метаболизма ксенобиотиков в онкопатологии // Вопросы современной химии.(1997) Т43, №5.- с.330-338
12. Ляхович В.В., Гавалов С.М., Вавилин В.А., Рябова О.А., Макарова С.И., Гуткина Н.И., Часовникова О.Б., Сусякова О.В., Лиханов А.В. Полиморфизм генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков и особенности бронхиальной астмы у детей // Пульмонология (2002), Т12, № 2
13. Молекулярно-генетические и биофизические методы исследования в медицине / Под ред. Бажора Ю.И., Кресюн В.И., Запорожан В.Н. К.: Здоров'я, 1996. -207 с.
14. Роль ферментов биотрансформации ксенобиотиков в предрасположенности к бронхиальной астме и формировании особенностей ее клинического фенотипа / В.В. Ляхович, В.А.Вавилин, С.И.Макарова [и др.] // Вестник Российской академии наук. – 2000. – Т.41, № 12. – С.36– 41
15. С. А. Куценко метаболизм ксенобиотиков // Основы токсикологии (Март 2003) ТОМ 4, 119с.
16. Скворцова В.И., Сломинский П.А., Шадрин М.И., Левицкий Г.Н., Левицкая Н.И., Алехин А.В., Жеребцова А.Л., Сердюк А.В., Лимборская С.А.. Полиморфизм генов системы детоксикации и предрасположенность к болезни двигательного нейрона в российской популяции: Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова (2006) №1.- с.4—13

17. Спицин В.А., Макаров С.В., Пай Г.В., Бичковская Л.С. / Полиморфизм в генах человека, ассоциирующихся с биотрансформацией ксенобиотиков // Вестник ВОГиС(2006), Т10, №1.- с. 97-105
18. Alan J. Townsend, Kinsley K. Kinningham, Daret St. Clair, Thomas R. Tephly, Charles S. Morrow, and F. Peter Guengerich. Symposium Overview: Characterization of Xenobiotic Metabolizing Enzyme Function Using Heterologous Expression Systems. // Toxicological sciences (1999) 48, 143–150
19. Ana Rossini, Davy C.M. Rapozo et al. Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population // Genet. Mol. Res. (2002) 1 (3): 233-240
20. Board, P. G. Biochemical genetics of glutathione-S-transferase in man. Am. J. Hum. Genet. (1981) 33: 36-43
21. B Mannervik, Y C Awasthi, P G Board, J D Hayes, C Di Ilio, B Ketterer, I Listowsky, R Morgenstern, M Muramatsu, W R Pearson, et al. Nomenclature for human glutathione transferases. // Biochem J. (1992); 282(Pt 1): 305–306
22. B. Yucesoy, V.J. Johnson, M.L. Kashon, K. Fluharty, V. Vallyathan and M.I. Luster Lack of association between antioxidant gene polymorphisms and progressive massive fibrosis in coal miners // Thorax (2005);60;492-495
23. Chen H, Juchau MR (1998) Inhibition of embryonic retinoic acid synthesis by aldehydes of lipid peroxidation and prevention of inhibition by reduced glutathione and glutathione S-transferases. Free Radic Biol Med 24:408–417
24. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health Perspect 1985;64:111–126.
25. David L. Eaton and Theo K. Bammler. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology // Toxicological sciences (1999) 49, 156–164

26. Derek L. Matthey, Andrew B. Hassell et al. Association of polymorphism in glutathione S-transferase loci with susceptibility and outcome in rheumatoid arthritis: comparison with the shared epitope // *Ann Rheum Dis* (1999); 58: 164-168
27. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations.// *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2001);10:1239–48
28. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease / T. Ishii, T. Matsuse, S. Teramoto [et al.] // *Thorax*. - 1999. – V.54. – P. 693–696
29. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. // *Crit Rev Biochem Mol Biol* (1995);30:445–600
30. He JQ, Ruan J, Connett JE, Anthonisen NR, Pare´ PD, Sandford AJ. Antioxidant gene polymorphisms and susceptibility to a rapid decline in lung function in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 323–328
31. Kenneth D. Tew Glutathione-associated Enzymes in Anticancer Drug Resistance // *Cancer Research* (1994)54, , August 15, 4313-4320
32. Ketterer B. Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage / B. Ketterer // *Free Radic Res* – 1998. – V.28, №6. - P.647-658
33. Lee YL, Lin YC, Lee YC, Wang JY, Hsiue TR, Guo YL. Glutathione S-transferase P1 gene polymorphism and air pollution as interactive risk factors for childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1707–1713.
34. Mapp CE, Fryer AA, De Marzo N, Pozzato V, Padoan M, Boschetto P, Strange RC, Hemmingsen A, Spiteri MA. Glutathione S-transferase GSTP1 is a susceptibility gene for occupational asthma induced by isocyanates. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:867–872.

35. Massaro GD, Massaro D (1997) Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema. *Nature Med* 3:675–677, .
36. M.A. Layton, P.W. Jones et al. The therapeutic response to D-penicillinamine in rheumatoid arthritis: influence of glutathione S-transferase polymorphisms // *Rheumatology* (1999); 38: 43-47
37. M. Stanulla, M. Schrappe, A. Müller Brechlin, M. Zimmermann, and Karl Welte. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study // *Blood*(2000) Vol. 95 No. 4;1222-1228
38. Miller DP, Neuberg D, de Vivo I, et al. Smoking and the risk of lung cancer susceptibility with *GSTP1* polymorphism. *Epidemiology* 2003; 14: 545–551
39. S Baez, J Segura-Aguilar, M Widersten, A S Johansson, and B Mannervik Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes // *Biochem J.* (1997); 324(Pt 1): 25–28.
40. S. C. Cotton, L. Sharp, J. Little, and N. Brockton. Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Colorectal Cancer: A HuGE Review // *American Journal of Epidemiology* (2000)Vol. 151, No. 1, 7-32
41. Sundberg K, Johansson AS, Stenberg G, et al. (1998) Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 19:433–436 .
42. Tamer L, Calikoglu M, Ates NA, et al. Glutathione-S-transferase gene polymorphisms (*GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*) as increased risk factors for asthma. *Respirology* 2004; 9: 493–498.
43. On-line Mendelian inheritance in man - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>