

КОЗОВИЙ Р.В.✉, КОВАЛЬЧУК Л.Є., ЕРСТЕНЮК Г.М.

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»,  
Україна, 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2

✉ ruslan\_kozoviy@ukr.net

## ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ГЛУТАТИОНОВОЇ СИСТЕМИ У ДОВГОЖИТЕЛІВ ПРИКАРПАТТЯ, ХВОРИХ НА КОМОРБІДНУ ПАТОЛОГІЮ: АРТЕРІАЛЬНУ ГІПЕРТЕНЗІЮ ТА ОСТЕОАРТРОЗ

**Мета.** Вивчити особливості функціонування другої фази детоксикації ксенобіотиків на основі поліморфізму генів *GSTM1*, *GSTT1* та активності ферментів, що кодують ці гени у довгожителів, хворих на АГ і ОА. **Методи.** Визначення частоти поліморфних варіантів делецій генів *GSTT1* і *GSTM1* та активність глутатіон-S-трансферази (GST), глутатіонредуктази (GRD), глутатіонпероксидази (GPO) проводилось у довгожителів, які були розділені залежно від наявності артеріальної гіпертензії (АГ) й остеоартрозу (ОА). **Результати.** У групі хворих на АГ і ОА генотип *GSTM1*«+»/*GSTT1*«+» траплявся частіше порівняно із *GSTM1*«+»/*GSTT1*«-» в 3,0 рази, а генотип *GSTM1*«-»/*GSTT1*«+» порівняно із *GSTM1*«-»/*GSTT1*«-» у цій досліджуваній групі – в 3,17 рази. Вивчення показника активності ферментів GPO, GRD, GST виявила тенденцію до залежності його рівня від стану здоров'я довгожителів. **Висновки.** Серед здорових довгожителів та хворих на АГ і ОА зафіксована перевага генотипів із активною формою гена *GSTT1*«+», що може свідчити про краще функціонування системи антиоксидантного захисту. Активність ферментів глутатіонові системи GPO, GRD, GST була вищою у здорових довгожителів порівняно з такою ж у досліджуваних осіб із коморбідною патологією.  
**Ключові слова:** глутатіонова система, довголіття, артеріальна гіпертензія, остеоартроз.

Зі збільшенням віку населення планети закономірно зростає частота вік-залежної патології, зокрема систем кровообігу, дихальної і видільної систем та опорно-рухового апарату. Вивчення первинних механізмів старіння організму й популяції дасть змогу розширити об'єм предиктивних заходів, спрямованих на збереження здоров'я. Останнє можливе за умови прогнозування схильності, ранньої діагностики захворювань серцево-судинної системи, опорно-рухового апарату, які нині посідають одне з

перших місць серед людей похилого віку. Розуміння фундаментальних механізмів виникнення коморбідної патології під час старіння має першочергову значущість для реалізації повного потенціалу здорового старіння [1]. Вивчення біологічних маркерів спадкової схильності до артеріальної гіпертензії (АГ) й остеоартрозу (ОА) в людей із генетичним потенціалом до довголіття дасть змогу забезпечити реалізацію здорового та активного довголіття.

АГ і ОА мають складну мультифакторну природу і розвиваються за взаємодії факторів довкілля та спадкової схильності до цих захворювань. За даними багатьох учених [2], час манифестації, важкість перебігу, толерантність до лікування знаходяться в прямій залежності від величини відсотка генетичної схильності до цих захворювань.

Вивчення спектра, розповсюдження, зв'язку з фенотипом різних алельних варіантів гена у кожній конкретній популяції, етнічній чи територіальній групі вкрай важливі [3]. Дослідження структури генофонду населення, його внутрішньо- і міжпопуляційної різноманітності, генетичних процесів ведуть до змін здоров'я населення. Це дасть змогу зрозуміти механізми розподілу і накопичення генів поєднаної патології, прогнозувати регіони підвищеного ризику та розробити попереджувальні заходи [4, 5].

В умовах сучасного антропогенного навантаження стає актуальним вивчення особливостей функціонування детоксикаційних систем. Процес біотрансформації, який охоплює ферментативне перетворення чужорідних включень або ксенобіотиків, поділяється на три фази [6]. Перша фаза активації ксенобіотиків або метаболічної трансформації полягає в приєднанні до них модифікуючих функціональних груп (-ОН, -SH, -NH<sub>2</sub>). При цьому відбуваються реакції окиснення, відновлення та гідролізу, в результаті яких утворюються проміжні метаболіти. Цей процес каталізується мікросомальною фермен-

© КОЗОВИЙ Р.В., КОВАЛЬЧУК Л.Є., ЕРСТЕНЮК Г.М.

тативною системою цитохрому P<sub>450</sub> (родина ферментів цитохромів) та деякими іншими ферментами класів оксидаз, редуктаз, гідролаз і дегідрогеназ. У процесі другої фази біотрансформації – нейтралізації – проміжні метаболіти з'єднуються з ендogenousними лігандами, які посилюють гідрофільну природу цих сполук, тим самим сприяють їхньому виведенню з організму, тобто друга фаза полягає в кон'югації високомолекулярних гідрофільних речовин із різними субстратами, в результаті чого вони перетворюються в гідрофільні кон'югати, здатні до експресії з жовчю. Третя фаза полягає в евакуації або виведенні водорозчинних нетоксичних речовин з організму. Для цього існують специфічні переносники екзогенних сполук – Р-глікопротеїни, які сприяють екскреції ксенобіотиків у жовч або кров.

**Мета дослідження.** Вивчити особливості функціонування другої фази детоксикації ксенобіотиків на основі поліморфізму генів *GSTM1*, *GSTT1* та активності ферментів, що кодують ці гени у довгожителів, хворих на АГ і ОА.

### Матеріали і методи

Визначення частоти поліморфних варіантів делецій генів II фази біотрансформації ксенобіотиків *GSTT1* і *GSTM1* у довгожителів проводили в молекулярно-генетичній лабораторії кафедри медичної та лабораторної генетики НМАПО ім. П. Л. Шупика за консультаційної допомоги професора, члена-кореспондента АМН України Н.Г. Горюченко. Досліджуваних довгожителів було розділено на чотири групи: першу групу склали 53 довгожителі, хворих на АГ з другою стадією і другим ступенем та на ОА (II стадія); другу – 41 довгожитель, хворих на АГ з другою стадією і другим ступенем без ОА; третю – 34 довгожителі, хворий на ОА (II стадія) і без АГ та четверту – 38 відносно здорових довгожителів (без наявних захворювань). Поліморфізм генів глутатіон-S-трансфераз *GSTT1* та *GSTM1* визначали за допомогою методу мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції з детекцією в 1,5% агарозному гелі. Послідовності праймерів для виявлення делеційних варіантів генів *GSTT1* і *GSTM1* та умови ампліфікації застосовували відповідно до протоколу.

Активність глутатіон-S-трансферази (*GST*) оцінювали за швидкістю утворення глутатіон-S-кон'югатів між відновленим глутатіо-

ном і 1-хлор-2,4-динітробензолом [7]. Активність глутатіонредуктази (*GRD*) визначали за швидкістю зміни оптичної щільності за 340 нм, зумовленого і окисленням НАДФ • Н, глутатіонпероксидази (*GPO*) – з реакції взаємодії відновленого глутатіону з гідроперекисом третибутилу.

Для статистичного аналізу отриманих даних використовували методи програмного забезпечення Microsoft Excel [8].

### Результати та обговорення

Слід зазначити, що в одній особі можуть бути різні варіанти алелів цих генів: *GSTM1/GSTM1*, *GSTM1 GSTT1* або *GSTT1 GSTT1*. Кожен із цих генів може перебувати в активному стані (*GSTM1*«+» або *GSTT1*«+») і неактивному (*GSTM1*«-» або *GSTT1*«-»).

У результаті аналізу отриманих даних встановлено, що частота функціонально неактивних алелів генів *GSTT1* і *GSTM1* у всіх довгожителів Івано-Франківської області склала відповідно 24,70% і 46,99%. Першочергово вивчалися частоти сполучень алельних варіантів *GSTM1*«+» / *GSTT1*«+», *GSTM1*«+» / *GSTT1*«-», *GSTM1*«-» / *GSTT1*«+», *GSTM1*«-» / *GSTT1*«-» у групі довгожителів, хворих на АГ і ОА (перша група), порівняно зі здоровими (четверта група). Значущих відмінностей між цими показниками у досліджуваних групах за відсотковими значеннями розподілу частот генотипів генів *GSTM1*, *GSTT1* не виявлено. Частота неактивного алеля *GSTM1* у першій досліджуваній групі була 47,2%, у групі здорових довгожителів – 47,3%, а частота неактивного алеля *GSTT1* – 24,5 та 23,7% відповідно. Встановлено подібний розподіл носіїв делеційного алеля *GSTT1*«-» у довгожителів, хворих на АГ і ОА, та здорових. Проте простежувалася тенденція до переваги осіб I групи з алелями *GSTT1*«-» порівняно з такими *GSTM1*«-». Водночас найбільший ризик захворіти на АГ і ОА був у носіїв поєднаних двох делеційних алелів *GSTM1*«-» / *GSTT1*«-» (*OR* = 1,09, *p* > 0,05).

Аналізом отриманих результатів щодо частот різних генотипів генів *GSTM1*, *GSTT1* у довгожителів, хворих на АГ, порівняно з показниками в осіб четвертої групи, не встановлено достовірних відмінностей ( $\chi^2$  0,02 - 0,04, *OR* ≈ 1,0). Однак ідентифіковано тенденцію до збільшення ймовірності виникнення АГ у довгожителів із делеційним алелем *GSTT1*«-» та з генотипом *GSTM1*«+»/*GSTT1*«-» відповідно в 1,03 і

1,12 раза (порівняно з такими у здорових людей).

У всіх довгожителів переважали функціонально активні алелі генів *GSTM1*, *GSTT1*. Водночас делеційна форма гена *GSTT1* визначалася рідше (порівняно із такою гена *GSTM1*) в 1,89 раза у хворих довгожителів на АГ та в 1,99 у здорових осіб. Поєднання алельних варіантів *GSTM1*«+»/*GSTT1*«+» найчастіше виявлялось у довгожителів другої (38,2%) та четвертої (39,5%) груп. Схожі результати щодо розподілу алельних варіантів *GSTM1*«+»/*GSTT1*«+» визначені під час порівняння довгожителів третьої (хворих на ОА) та четвертої (здорові) груп. У ході порівняльного аналізу отриманих результатів поліморфізму генів другої фази детоксикації ксенобіотиків *GSTM1* та *GSTT1* у довгожителів другої та третьої груп достовірних відмінностей нами не виявлено. Цікавим є те, що в осіб усіх досліджуваних груп переважали функціонально активні варіанти генів *GSTM1* та *GSTT1*. У першій групі генотип *GSTM1*«+»/*GSTT1*«+» траплявся частіше порівняно із *GSTM1*«+»/*GSTT1*«-» в 3,0 рази, а генотип *GSTM1*«-»/*GSTT1*«+» порівняно із *GSTM1*«-»/*GSTT1*«-» в цій досліджуваній групі – в 3,17 рази. Така тенденція була зафіксована в другій групі довгожителів (відповідно 2,67 та 3,73 рази). Дослідження поєднання генів у третій групі довгожителів виявило подібну різницю генотипів у 2,59 та 2,99 рази, а в четвертій групі вона склала – 2,99 та 3,5 рази відповідно.

Таким чином, достовірних відмінностей між хворими на АГ і ОА та здоровими довгожителюми із генотипами *GSTM1*«+»/*GSTT1*«+», *GSTM1*«+»/*GSTT1*«-», *GSTM1*«-»/*GSTT1*«+», *GSTM1*«-»/*GSTT1*«-» нами не встановлено, однак виявлено перевагу в генотипах осіб усіх досліджуваних груп активної форми гена другої фази детоксикації ксенобіотиків – глутатіон-S-трансферази *GSTT1*«+».

Не менш важливим є також вивчення епігенетичних механізмів детоксикації у цих довгожителів, тобто дослідження безпосередньої функціональної активності ферментів, що кодуєть ці гени [9].

Першочергово нами проведено визначення активності GPO в чотирьох досліджуваних групах довгожителів (рис. 1).

Як видно з даних діаграми, найвищою активністю ферменту, який бере участь в інактивації перекису водню та органічних пероксидів у клітинах людей, була в четвертій групі досліджуваних довгожителів, а найнижчою – в першій. У другій та третій досліджуваних групах цей показник був майже однаковим, однак меншим, ніж у першій, та більшим, ніж в четвертій. GPO-глікопротеїн, що має в активному центрі чотири атоми селену, є гідрофільним з'єднанням, що ускладнює його проникнення в ліпідний шар мембран, основна частина якого локалізована в цитозолі, а інша – в мітохондріях. GPO має селенові ізоферменти: позаклітинний GPO, виявлений у плазмі і молоці; GPO-G1, виділений із цитозолу клітин печінки і кишечника, а також неселеновий ізофермент, ідентичний GST [10].

У реакціях, що каталізуються GPO, утворюється окиснений глутатіон (GSSG), для його відновлення в клітинах існує спеціальний фермент – глутатіонредуктаза (GRD). Закономірним продовженням роботи було вивчення активності ферменту GRD (рис. 2).

Тенденція залежності активності ферменту GRD від стану здоров'я довгожителів Прикарпаття була схожою під час дослідження GPO, однак більш вираженою. Так, цей показник був вищим у довгожителів четвертої досліджуваної групи порівняно із таким у першій в 1,5 рази.

Не менш важливим у системі детоксикації ксенобіотиків і зниження активності прооксидантних чинників є глутатіон-S-трансфераза. Основна функція GST – захист клітин від ксенобіотиків та продуктів перекисного окиснення за допомогою їх відновлення, приєднання до субстрату молекули глутатіону або нуклеофільного заміщення гідрофобних груп [9]. Проте особливих відмінностей активності GST у довгожителів Прикарпаття чотирьох досліджуваних груп не встановлено (рис. 3).

Усі тенденції до змін цього показника між групами знаходилися в межах статистичної похибки.

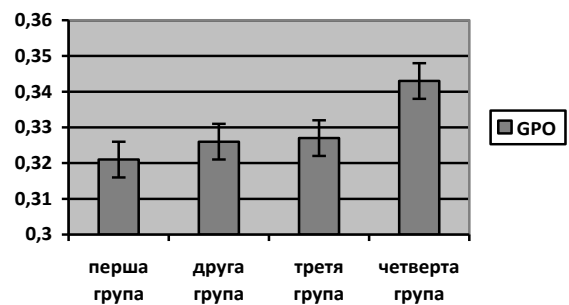


Рис. 1. Показники активності ферменту GPO в досліджуваних групах довгожителів Прикарпаття.

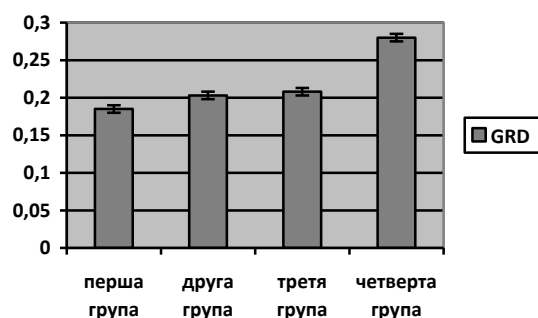


Рис. 2. Показники активності ферменту GRD в досліджуваних групах довгожителів Прикарпаття.

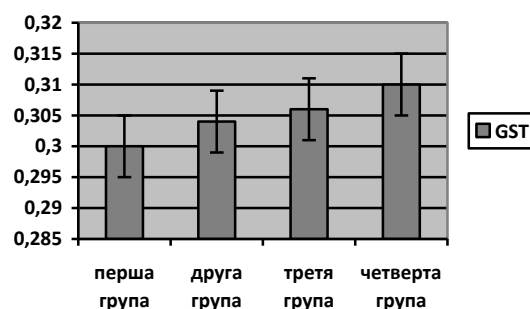


Рис. 3. Показники активності ферменту GST в досліджуваних групах довгожителів Прикарпаття.

### Висновки

Серед здорових довгожителів та хворих на АГ і ОА зафіксована перевага генотипів із активною формою гена другої фази детоксикації ксенобіотиків – глутатіон-S-трансферази *GSTT1*«+», що може свідчити про краще функ-

ціонування системи антиоксидантного захисту.

Активність ферментів глутатіонової системи GPO, GRD, GST була вищою у здорових довгожителів порівняно з такою ж у досліджуваних осіб із коморбідною патологією.

### Література

1. Сидоренко А., Эндрыус Г. ООН возглавляет программу исследований старения в 21-М столетии. *Успехи геронтолог.* 2000. № 4. С. 269–270.
2. Алиджанова Х. Г., Кауров Б. А. Старение, возрастзависимые болезни и некоторые факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний у лиц пожилого и старческого возраста. *Клиническая медицина.* 2011. № 3. С. 21–27.
3. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука, 2003. 468 с.
4. Баранов В.С., Иващенко Т.Э., Баранова Е.В. Тестирование генов системы детоксикации в профилактике некоторых мультифакториальных болезней. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2003. № 2. С. 11–16.
5. Вайсерман А.М. Влияние средовых факторов в раннем онтогенезе на старение и продолжительность жизни. *Онтогенез.* 2004. № 5. С. 325–332.
6. Горovenko Н.Г., Подольська С.В., Чернюк Н.В. Роль поліморфізму генів *GSTT1* і *GSTM1* у прогнозуванні перебігу та формуванні схильності до ХОЗЛ. *Український пульмонологічний журнал.* 2009. № 4. С. 45–49.
7. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. 272 с.
8. Бабич П.Н., Губенко А.В., Лапач С.Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение третье. Отношение шансов: понятие, вычисление, интерпретация. *Укр. мед. часопис.* 2005. № 2. С. 113–119.
9. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione Transferases. *Ann Rev Pharm Toxicol.* 2005. Vol. 45. P. 51–88.
10. Ran Q., Liang H., Ikeno Y. [et al.]. Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis. *A Biol. Sci. Med. Sci.* 2007. Vol. 2, No. 9. P. 932–942.

### References

1. Sydorenko A., Endrius H. ООН возглавляет программу исследований старения в 21-М столетии. *Uspekhy herontolohy.* 2000. № 4. S. 269–270.
2. Alydzhanova Kh.H., Kaurov B.A. Starenie, vozrastzavysymye bolezny u nekotorye faktory ryska serdechno-sosudystykh zabolevaniy u lyts pozhyloho y starcheskoho vozrasta. *Klynycheskaia medytsyna.* 2011. № 3. S. 21–27.
3. Anysymov V.N. Molekulyarnye y fyzyolohycheskye mekhanyzmy starenyya. Sankt Peterburh: Nauka, 2003. 468 s.
4. Baranov V.S., Yvashchenko T.E., Baranova E.V. Testyrovanye henov systemy detoksykatsyy v profylaktyke nekotorykh mul'tyfaktoryal'nykh bolezney. *Zhurnal akusherstva y zhenskykh bolezney.* 2003. № 2. S. 11–16
5. Vaiserman A.M. Vlyaniye sredovykh faktorov v rannem ontogeneze na starenie y prodolzhytelnost zhyzny. *Ontohenez.* 2004. № 5. S. 325–332.
6. Horovenko N.H., Podol'ska S.V., Chernyuk NV. Rol' polimorfizmu heniv *GSTT1* i *GSTM1* u prohnouzuvanni perebihu ta formuvanni skhyl'nosti do KhOZL. *Ukrayins'ky pul'monolohichnyy zhurnal.* 2009. № 4. S. 45–49.
7. Prokhorova M.Y., redaktor. Metody byokhymycheskykh yssledovanyy (lypydnyy y enerhetycheskyy obmen). Lenynhrad: Yzd-vo Lenynhr. un-ta; 1982. 272 s.
8. Babych P.N., Hubenko A.V., Lapach S.N. Prymenenye sovremennykh statystycheskykh metodov v praktyke klynycheskykh yssledovanyy. Soobshchenye vtroe. Prymenenye kryteryya khy-kvadrat. *Ukr. med. chasopys.* 2005. № 2. S. 113–119

9. Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. Glutathione Transferases. *Ann Rev Pharm Toxicol.* 2005. Vol. 45. P. 51–88.
10. Ran Q., Liang H., Ikeno Y. Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2007. Vol. 2, No. 9. P. 932–942.

**KOZOVIY R.V., KOVALCHUK L.Y., ERSTENYUK H.M.**

*SHEE, Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine, 76018, Ivano-Frankivsk, Halytska str., 2, e-mail: ruslan\_kozoviy@ukr.net*

**GENETIC FEATURES OF THE GLUTATHYON SYSTEM OF LONG LIVERS OF CARPATHIAN REGION WITH COMORBID PATHOLOGY: ARTERIAL HYPERTENSION AND OSTEOARTHRITIS**

**Aim.** To study the polymorphism of GSTM1, GSTT1 genes. To study the activity of enzymes encoding these genes in long-livers with arterial hypertension (AG) and osteoarthritis (OA). **Methods.** The determination of the frequency of polymorphous variants of gene deletions GSTT1 and GSTM1 and the activity of glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GRD), glutathione peroxidase (GPO) was performed in long-livers, who were separated depending on the presence AG and OA. **Results.** In the group of patients with hypertension and OA genotype GSTM1«+»/GSTT1«+» met the GSTM1«+»/GSTT1«-» 3.0 times more often. The genotype GSTM1«-»/GSTT1«+» in comparison with GSTM1«-»/GSTT1«-» in this study group was 3.17 times. The study of GPO, GRD, and GST enzymes has shown a tendency to depend on its level from the health of long-livers. **Conclusions.** The advantage of genotypes with the active form of the gene GSTT1«+» was spotted among healthy long livers and patients with hypertension and OA. It indicates a better functioning of the antioxidant defense system. The activity of the enzymes of the glutathione system GPO, GRD, and GST was higher in healthy long-livers than in patients with comorbid pathology.

**Keywords:** glutathione system, longevity, arterial hypertension, osteoarthritis.