

АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ЛОКУСУ *c. 2166 T>C* ГЕНА *Stathmin* У ДІТЕЙ, ЯКИМ ПРОВОДИЛОСЬ СТОМАТОЛОГІЧНЕ ЛІКУВАННЯ ПІД ЗАГАЛЬНИМ ЗНЕБОЛЕННЯМ

ЛНМУ ім. Данила Галицького (м. Львів)

*ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» (м. Львів)

Дане дослідження є фрагментом планової НДР кафедри стоматології дитячого віку ЛНМУ ім. Данила Галицького «Стоматологічна захворюваність дітей з урахуванням еколого-соціальних чинників ризику та обґрунтування диференційованих методів лікування та профілактики», № держ. реєстрації 0110U002147.

Вступ. Відомо, що болісні відчуття у дитини та страх перед ними є Еу стоматолога, а й до самого відвідування стоматологічного кабінету навіть з метою профілактичного огляду. Повне уявлення про розвиток і підтримку страху та пов'язаних із ним станів неможливе без урахування генетичних механізмів, які зумовлюють страх, хоча відомо, що генетичні фактори мають значний вплив на особливості сприйняття і реакції на біль. Маловідомими є молекулярні механізми появи і прояву страху. Для їх з'ясування інформативними можуть стати дослідження, спрямовані на вивчення генів, продукти яких задіяні у біохімічних реакціях, що відбуваються у процесах вищої нервової діяльності. Білок статмін (*Stathmin*) має високий рівень експресії у латеральних ядрах мигдалевидного тіла, а також у таламусі і кіркових структурах, які посилюють сигнали про вроджений та набутий страх [3]. Саме тому ген статміну (*STMN1*) отримав назву «ген страху».

Доведена роль статміну (*STMN1*) в якості кондуктора страху різних видів, що зумовлює й важливість вивчення ролі цього білку в етіопатогенезі психічних розладів, пов'язаних зі страхом, наприклад, посттравматичного стресового розладу (ПТСР) [4]. Для гена *STMN1* характерним є алельний поліморфізм: присутність різних варіантів гена із відмінними функціональними властивостями. Виявлено зв'язок різних алелів гена *STMN1* з поведінковими фенотипами [2].

Отже, припускаємо, що *STMN1* генотип має функціональну значимість для виникнення та ступеню вираження основних типів страху і тривоги у людини, а тому актуальним є генотипування алелів *STMN1* гена. В якості моделі у роботі обрано поліморфізм *rs182455*, для якого опубліковані повідомлення про його асоціацію із емоційно-поведінковими реакціями у людини [4].

В літературі немає даних стосовно ролі поліморфізму гена *STMN1* та формування негативних емоцій щодо стоматологічних втручань.

Мета дослідження – аналіз алельного поліморфізму гена *STMN1* у стоматологічних пацієнтів дитячого віку із страхом перед лікуванням, яким

проводилась санація ротової порожнини під загальним знеболенням.

Об'єкт та методи дослідження. Матеріалом для молекулярно-генетичних досліджень стали зразки ДНК, отримані з ядерних клітин венозної крові 31 соматично здорової дитини віком від 3х до 7 років, серед них 16 хлопців та 14 дівчат, яким було проведено санацію ротової порожнини під загальним знеболенням. Контрольною групою стали 30 дітей цього ж віку, які погоджувались на стоматологічне лікування та не відчували страху перед ним. У дітей контрольної групи ДНК виділяли з клітин букального епітелію. Дослідження проведені у лабораторії генетичних досліджень ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» (директор – професор, д. м. н. Гнатейко О. З.).

Проведено молекулярно-генетичне дослідження поліморфного локусу *c. 2166T>C* гена *STMN1* в положенні 26234983 хромосоми 1 (номер поліморфізму в базі даних NCBI – *rs182455*). Однуклеотидний поліморфізм (SNP) зумовлений заміною тиміну (алель 2166T) на цитозин (алель 2166C).

Ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* проводили, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [7]. В результаті обробки продукту ПЛР реакції ендонуклеазою рестрикції *Psp I24B I* на електрофореграмі візуалізуються фрагменти величиною: 466 п. н. – генотип ТТ, 466 п. н., 344 п. н. та 122 п. н. – генотип ТС, 344 п. н. та 122 п. н. – генотип



Рис. 1. – Електрофореграма рестрикційного аналізу продуктів ПЛР SNP *rs182455* гена *STMN1* (2% агарозний гель): 1- маркери молекулярної ваги; 2 – СС-генотип (72 п. н. та 36 п. н.), 3 – негативний контроль, 4 – ТТ-генотип (466 п. н.); 5 – ТС-генотип (466 п. н., 344 п. н. та 122 п. н.).

СС, відповідно. Електрофореграму молекулярно-генетичного дослідження поліморфізму 2166T>C гена *STMN1* наведено на **рис. 1**.

Отримані результати оброблялися за допомогою методів варіаційної статистики, прийнятими для біологічних досліджень [3] та рекомендованими для обробки результатів молекулярно – генетичних досліджень [5].

Результати досліджень та їх обговорення. У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу ДНК у 31 дитини дослідної групи та 30 дітей контрольної встановлено генотип щодо поліморфного локусу с. 2166T>C гена *STMN1*. Результати молекулярно-генетичного аналізу локусу 2166T>C гена *STMN1* у дослідній групі дітей із страхом перед стоматологічним втручанням, яким проводилось лікування під наркозом, наведено у **таблиці 1**.

В якості контролю сформовано групу 30 дітей, які охоче погоджуються на співпрацю із стоматологом, у яких зразки ДНК виділено із клітин букального епітелію. Встановлений розподіл генотипів за

поліморфним варіантом с. 2166T>C гена *STMN1* в дослідній та контрольній групах вірогідно не відрізняється від теоретично очікуваного щодо рівноваги Харді-Вайнберга (**табл. 1**). Проте, у дослідній групі дітей відмічено значне зростання частки гетерозиготного генотипу *STMN1* 2166TC – 74,2% при очікуваному 50% і ця відмінність досягла значення $p=0,05$.

Як було вказано, у 74,2% дітей з непереборним страхом перед втручанням виявлено гетерозиготний генотип *STMN1* 2166TC, при 40% серед дітей контрольної групи. Вдвічі частіше у дітей дослідної групи виявляли низькофункціональний генотип *STMN1* 2166CC у порівнянні з дітьми контрольної групи: 12,9% та 6,7%, відповідно. Результати розподілу генотипів у дітей із страхом перед втручанням у порівнянні з контролем наведено на **рис 2**.

Як свідчать результати, наведені на **рис. 2**, серед 72% дітей, які бояться стоматологічного втручання, виявлено алель С поліморфного локусу с. 2166T>C гена *STMN1* в гетерозиготному стані і в майже 13% у гомозиготному стані. У результаті проведеного

молекулярно-генетичного аналізу встановлено статистично вірогідні відмінності у співвідношенні генотипів гена *STMN1* між групою дітей, що бояться стоматологічного лікування, у порівнянні із групою дітей, які погоджувалися на співпрацю із стоматологом (контрольна група) ($p < 0,05$). Обчислені показники відношення шансів (OR) виникнення страху перед втручанням залежно від комбінації алелів локусу с. 2166T>C гена «страху» статистично наведено у **таблиці 2**. Як свідчать результати статистичної обробки отриманих даних та визначений показник відношення шансів, який відображає ризик розвитку страху перед стоматологічним втручанням, відмінності у частотах генотипів досліджуваної та контрольної груп є значимі, як і показники OR для генотипу *STMN1* 2166TT та *STMN1* 2166TC.

Встановлено, що наявність генотипу *STMN1* 2166TC зумовлює зростання ризику виникнення страху перед втручанням у 4,31 рази при вірогідному довірчому інтервалі CI 1,45 – 12,7. На противагу, генотип *STMN1* 2166TT виявляє вірогідний протективний ефект: OR=0,13, CI: 0,04 – 0,46. Тобто, при такому генотипі у людини значно знижений ризик розвитку страху перед втручанням – 0,13 у порівнянні з умовною одиницею.

Зважаючи на виявлені відмінності щодо розподілу генотипів поліморфного локусу с. 2166T>C гена *STMN1* у дітей із страхом перед

Таблиця 1

Частота генотипів та алелів локусу с. 2166T>C гена *STMN1* серед обстежених дітей

Генотипи/ алелі гена <i>STMN1</i>	Частота алелів та генотипів, %									
	Дослідна група					Контрольна група				
	N	Фактична частота	Теоретично очікувана частота (HWE)	χ^2	P	N	Фактична частота	Теоретично очікувана частота (HWE)	χ^2	P
2166TT	4	12,9	25,0	3,91	0,05	16	53,3	53,8	0,00	1
2166TC	23	74,2	50,0			12	40,0	39,1		
2166CC	4	12,9	25,0			2	6,7	7,1		
2166T	31	50,0	–			44	70,3	–		
2166C	31	50,0	–			16	26,7	–		

Примітка: N – кількість спостережень, HWE (Hardy-Weinberg equilibrium) – рівновага Харді-Вайнберга.

Таблиця 2

Розподіл генотипів поліморфного локусу с. 2166T>C гена *STMN1* у досліджених групах

<i>STMN1</i> генотип	Дослідна група N=31	Контрольна група N=30	χ^2	P	OR	
					Знач.	95% CI
<i>STMN1</i> 2166TT	12,9%	53,3%	11,31	0,004*	0,13*	0,04 – 0,46
<i>STMN1</i> 2166TC	74,2%	40,0%			4,31*	1,45 – 12,78
<i>STMN1</i> 2166CC	12,9%	6,7%			2,07	0,35 – 12,27

Примітка: n – кількість осіб, P – значимість відмінностей у розподілі генотипів між контрольною і дослідною групами, * – статистично вірогідне значення, OR (odds ratio) – коефіцієнт відношення шансів.

Таблиця 3

Частота алелів поліморфного локусу с. 2166T>C гена *STMN1* у досліджених групах

Алелі гена <i>STMN1</i>	Частота, %		χ^2	P	OR	
	Дослідна група, N=31	Контрольна група, N=30			Знач.	95% CI
	<i>STMN1</i> 2166T	50,0			73,3	7,01
<i>STMN1</i> 2166C	50,0	26,7	2,75*	1,29 – 5,87		

Примітка: n – кількість осіб, P – значимість відмінностей між контрольною і дослідною групами, * – статистично вірогідне значення, OR (odds ratio) – коефіцієнт відношення шансів.

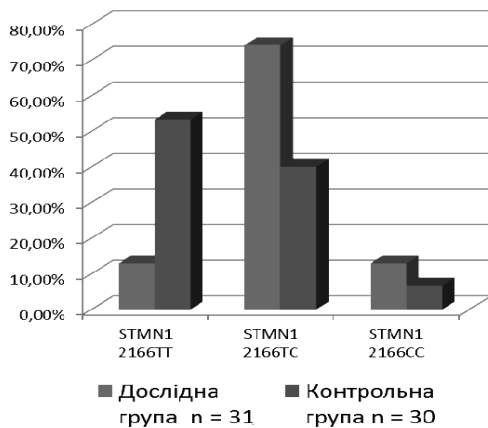


Рис. 2. Розподіл генотипів поліморфного локусу с. 2166Т>С гена *STMN1* у дітей із страхом перед втручанням у порівнянні з контролем ($\chi^2=11,31$, $p=0,004$); n – кількість осіб.

стоматологічним лікуванням у порівнянні з контрольною групою, вважали доцільним провести дослідження щодо частоти алелів в аналізованих вибірках. Показники частоти алелів локусу с. 2166Т > С гена *STMN1* у досліджуваних групах стоматологічних пацієнтів дитячого віку наведені у **таблиці 3**.

Як свідчать результати, наведені у **таблиці 3**, встановлено статистично вірогідні відмінності у частоті нормального Т та низько функціонального С алелів локусу с. 2166Т>С гена *STMN1* у досліджуваних групах пацієнтів ($\chi^2=7,01$, $p<0,05$). Обчислення показника відношення шансів виявило вірогідний протективний ефект щодо алеля Т: OR=0,36, CI:

0,17 – 0,78 та асоціацію алеля С із вірогідним зростанням розвитку страху перед втручанням у 2,75 рази при довірчому інтервалі 1,29 – 5,87. Для з'ясування типу прояву даного алеля проведено обчислення показників ризику розвитку карієсу за домінантною та рецесивною моделями успадкування.

При гіпотезі рецесивного типу успадкування алелів локусу с. 2166Т>С гена *STMN1* відмінності між групами не досягнули вірогідних значень ($p=0,41$). Високий ступінь (99%) вірогідності відмінностей розподілу генотипів був отриманий при допущенні домінантного типу успадкування алелю 2166С гена *STMN1* ($p=0,0008$), тобто наявність алеля 2166С як гомо- так і в гетерозиготному стані зумовлює зростання ризику виникнення непереборного страху перед втручанням.

В результаті аналізу частоти генотипів локусу 2166С гена *STMN1* у дітей різної статі з та без непереборного страху перед втручанням виявлено певні гендерні закономірності. Так, у хлопців ген «страху» переважно проявляється при наявності *STMN1* 2166 С варіанту в обох алелях гена. Щодо дівчат – то достатньо однієї копії гена *STMN1*, яка несе алель С одонуклеотидного поліморфізму rs182455 для збільшення ризику виникнення непереборного страху перед втручанням.

Висновки. В результаті проведеного молекулярно-генетичного дослідження алельного поліморфізму локусу с. 2166Т>С гена *STMN1* у дітей із непереборним страхом перед втручанням у порівнянні із групою дітей, які погоджувалися на співпрацю, встановлено відмінності у розподілі генотипів та алелів гена «страху» статіну. Показано, що наявність генотипів 2166 ТС чи 2166 СС гена *STMN1* є генетичним чинником, який збільшує ризик виникнення страху перед стоматологічним лікуванням у 7,7 разів.

Перспективи подальших досліджень. Генетичне тестування локусу с. 2166Т > С гена *STMN1* може використовуватись для прогнозування поведінки дитини у стоматолога під час лікування та визначення тактики щодо її корекції.

Література

1. Гублер Е. В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е. В. Гублер, А. А. Генкин. – Л.: Медицина, 1973. – С. 44-56.
2. Brdner David. Analysis of Stathmin gene variation in patients with panic disorder and agoraphobia / David Brdner, Heike Gurgens, Franziska Einsle // Psychiatric Genetics. – 2013. – Vol. 23, Issue 1. – P. 43–44.
3. Brocke B. Stathmin, a gene regulating neural plasticity, affects fear and anxiety processing in humans / B. Brocke, K. P. Lesch, D. Armbruster [et al.] // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr Genet. – 2010. Vol. 5, № 153B (1). – P. 243-251.
4. Cao C. Stathmin genotype is associated with reexperiencing symptoms of posttraumatic stress disorder in Chinese earthquake survivors / C. Cao, L. Wang, R. Wang [et al.] // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. – 2013 Vol. 44. – P. 296-300. Код доступа doi: 10. 1016/j. pnpbp. 2013. 04. 004. Epub 2013 Apr 10.
5. Clerget-Darpoux F. Introduction to the genetic epidemiology of multifactorial diseases / F. Clerget-Darpoux, S. Lyonnet, P. Broet // ESHG COURSE November 2-6, 2009, CHU du Kremlin Bicetre, Faculte de Medecine Paris-Sud, France. – Код доступа <https://www.eshg.org/paris2010.0.html>.
6. Ehli A. C. Influence of a genetic variant of the neuronal growth associated protein Stathmin 1 on cognitive and affective control processes: an event-related potential study / A. C. Ehli, K. Bauernschmitt, T. Dresler, T. Hahn [et al.] // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. – 2011. – Vol. 156B. – P. 291–302.
7. Mc Pherson M. J. PCR: a Practical Approach / M. J. Mc Pherson, P. Quirke, G. R. Taylor. – New York : Oxford University press, 1993. – 253 p.

УДК 616. 314-002-053. 2-089. -5-031. 81-079. 43

АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ЛОКУСУ с. 2166 Т>С ГЕНА *Stathmin* У ДІТЕЙ, ЯКИМ ПРОВОДИЛОСЬ СТОМАТОЛОГІЧНЕ ЛІКУВАННЯ ПІД ЗАГАЛЬНИМ ЗНЕБОЛЕННЯМ

Солонько Г. М., Смоляр Н. І., Тиркус М. Я., Макух Г. В.

Резюме. Вивчення ролі поліморфізму гена *STMN1* на формування негативних емоцій щодо стоматологічних втручань дозволить пояснити виникнення страху у дітей. Мета-аналіз алельного поліморфізму гена *STMN1* у стоматологічних пацієнтів дитячого віку із страхом перед лікуванням, яким проводилась санація ротової порожнини під загальним знеболенням. У результаті дослідження встановлено відмінності у розподілі генотипів та алелів гена «страху» статіну серед дітей, що бояться стоматолога та дітей, що погоджуються на співпрацю.

Показано, що наявність генотипів 2166 TC чи 2166 CC гена STMN1 є генетичним чинником, який збільшує ризик виникнення страху перед стоматологічним лікуванням у 7,7 разів.

Ключові слова: діти, стоматологічне лікування, страх, загальне знеболення, молекулярно-генетичний аналіз, ген страху *Stathmin*, алельний поліморфізм.

УДК 616.314-002-053.2-089.-5-031.81-079.43

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСА с. 2166 T>C ГЕНА *Stathmin* У ДЕТЕЙ, КОТОРЫМ ПРОВОДИЛОСЬ СТОМАТОЛОГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПОД ОБЩИМ ОБЕЗБОЛИВАНИЕМ

Солонько Г. М., Смоляр Н. И., Тиркус М. Я., Макух Г. В.

Резюме. Изучение роли полиморфизма гена *STMN1* на формирование отрицательных эмоций по поводу стоматологических вмешательств позволит объяснить возникновение страха у детей. Цель – анализ аллельного полиморфизма гена *STMN1* у стоматологических пациентов детского возраста, имеющих страх перед лечением, которым проводилась санация ротовой полости под наркозом. В результате исследования обнаружены отличия в распределении генотипов и аллелей гена «страха» статина среди детей, которые боются стоматолога и детей, соглашающихся на сотрудничество. Показано, что наличие генотипов 2166 TC или 2166 CC гена *STMN1* является генетическим фактором, увеличивающим риск возникновения страха перед стоматологическим лечением в 7,7 раза.

Ключевые слова: дети, стоматологическое лечение, страх, наркоз, молекулярно-генетический анализ, ген страха *Stathmin*, аллельный полиморфизм.

UDC 616.314-002-053.2-089.-5-031.81-079.43

Allelic Polymorphism of Locus с. 2166 T>C of *Stathmin* Gene in Children who Conducted Treatment under General Anaesthesia

Solonko H. M., Smoljar N. I., Tircus M. J., Makukh G. V.

Abstract Pain and fear of being hurt are the main factors of negative attitude prior to treatment in dental clinic. Full understanding of the development and maintenance of fear is impossible without taking into account the genetic mechanisms that cause fear. *Stathmin* gene called “fear gene” because of protein’s role in brain structure associated with emotions. There is no data in the literature regarding gene’s *STMN1* polymorphism role and development of negative emotions towards dental procedures.

Aim of the study. To analyze allelic polymorphism of gene *STMN1* in dental pediatric patients with fear prior to treatment who conducted treatment under general anaesthesia.

Objects and methods. Materials for this study were DNA samples obtained from nuclear cells of venous blood of 31 somatically healthy children aged 3 to 7 years who conducted treatment under general anaesthesia. The control group consisted of 30 children of the same age who did not feel the fear of dental treatment and DNA samples obtained from buccal epithelium cells.

A molecular genetic study of polymorphic locus с. 2166T >C of gene *STMN* in position 26234983 of chromosome 1 was performed. Single-nucleotide polymorphism (SNP) due to the replacement of thymine (allele 2166T) to cytosine (allele 2166C). Amplification of DNA sequences *in vitro* was performed using the method of polymerase chain reaction (PCR).

Results and discussion. As result of molecular genetic study of 31 children of experimental group and 30 children of control group genotype regarding polymorphic locus с. 2166T > C of gene *STMN1* is determined. However, children in experimental group registered significant increase in the proportion of heterozygous genotypes *STMN1* 2166TC – 74.2% compared to expected 50% and this difference have reached value $p=0.05$. In children of experimental group low functional genotype *STMN1* 2166CC was determined twice as often compared to control group: 12.9% and 6,7, respectively.

According to the results, 72% of children who are frightened of dental procedures were determined with allele C of polymorphic locus с. 2166T > C of gene *STMN1* in heterozygous state and nearly 13% in homozygous state. Statistically significant differences in a proportion of gene’s *STMN1* genotypes between experimental and control group were found ($p < 0.05$). It was determined that presence of *STMN1* 2166TC genotype causes increase of risk of fear development before dental procedure by 4.31 at credible confidence interval CI 1.45-12.7.

An analysis of frequencies of genotypes of locus 2166C of gene *STMN1* in children of different gender with or without irresistible fear before dental procedure determined some gender consistencies. The boys “fear gene” mainly manifests in the presence of *STMN1* 2166C variation in both alleles of the gene. As for the girls, one copy of the gene *STMN1*, which is carrying allele C of single nucleotide polymorphism rs182455 is enough to increase a risk of development of irresistible fear before dental treatment.

Conclusion. As result of performed molecular genetic studies of allelic polymorphism of locus с. 2166T > C of gene *STMN1* in children with irresistible fear before dental treatment comparing with cooperative children, differences in genotype allocations and allocation of alleles of “fear gene” *Stathmin* were determined. It’s shown that presence of genotypes 2166TC or 2166CC of gene *STMN1* is considered as genetic factor which increase a risk of fear development before dental treatment by 7.7 times.

Keywords: children, dental treatment, fear, general anaesthesia, molecular genetic analysis, “fear gene” *Stathmin*, genotypes, alleles.

Рецензент – проф. Каськова Л. Ф.

Стаття надійшла 10. 09. 2014 р.