



УДК 616.441+616.61/.63-053.2-08]:577.21

КЕЧ Н.Р.

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України», м. Львів

ВИЗНАЧЕННЯ БІОХІМІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТУ N-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗИ, ПРОДУКЦІЇ ГЕНА NAT2 У ДІТЕЙ З ЕКОПАТОЛОГІЄЮ ПІСЛЯ ПРОВЕДЕНОЇ ТЕРАПІЇ

Резюме. Вивчення біохімічної активності ферменту N-ацетилтрансферази, продукції гена NAT2 у дітей з екологічно несприятливих регіонів (ЕНР) є надзвичайно важливим для виявлення схильності до екопатології, зокрема до захворювань щитоподібної залози, нирок та органів сечовивідної системи в умовах забрудненого довкілля. Прикладом такого регіону є хімічно забруднені Галицький, Долинський і Калуський райони та радіологічно забруднений Снятинський район Івано-Франківської області. Було обстежено 239 дітей з ЕНР та 70 дітей із групи контролю. Вік дітей — від 3 до 18 років, стать: хлопці — 48 %, дівчата — 52 %. Всі діти оглянуті клінічно, їм проведена інструментальна (УЗД, ультразвукова денситометрія) та лабораторна діагностика до й після терапії. Біохімічним методом визначена активність ферменту N-ацетилтрансферази. Низька активність ферменту, що кодується геном NAT2, у дітей з екопатологією обумовлює їх низьку здатність до ацетилювання, що є підґрунтям для формування екозалежних захворювань щитоподібної залози, кісток і нирок у цих дітей. Мембранопротекторна, антиоксидантна, сорбційна терапія та застосування препаратів кальцію мають виражений позитивний ефект щодо активності ферменту N-ацетилтрансферази у крові обстежених дітей.

Ключові слова: активність ферменту N-ацетилтрансферази, екопатологія, терапія, діти.

Вступ

Процеси ацетилювання відіграють важливу роль в обміні речовин, а їх прояви розглядаються в наш час як генетично детермінована здатність організму метаболізувати сполуки, що містять аміногрупи, тобто здатність до детоксикації цих сполук у фазі 2 біотрансформації ксенобіотиків в організмі [1, 2].

Останніми роками особливу увагу дослідники приділяють з'ясуванню можливості використання показника здатності до ацетилювання для виявлення схильності до екопатології, зокрема до захворювань щитоподібної залози, нирок та органів сечовивідної системи в умовах забрудненого довкілля [3].

Прикладом такого регіону з поширеною серед дітей екопатологією, спричиненою антропогенним забрудненням довкілля, є Івано-Франківська область, що як одна з десяти (після Донецької, Луганської, Запорізької, Харківської та ін.) формує екологічну обстановку в цілому по Україні. Екологічна ситуація в області є наслідком багаторічного накопичення забруднюючих речовин, особливо небезпечних твердих відходів промисловості. До території з найбільш складною екологічною ситуацією в області належить Галицький район, де функціонує

Бурштинська ТЕС (екологічно несприятливий регіон — ЕНР6), Калуський район з потужним хімічним і гірничовидобувним виробництвом (ЕНРк) та Долинський район із нафтопромислами та нафтопереробним заводом (ЕНРд). Окрім Галицького, Калуського та Долинського районів, екологічно несприятливим вважається Снятинський район (ЕНРс), який належить до зони посиленого радіаційного контролю [4]. Групою контролю були діти з екологічно чистого регіону (ЕЧР) — м. Городенка Івано-Франківської області.

Аналіз результатів клінічного, ультразвукового огляду та частоти захворюваності обстежених дітей вказує, що екопатологія у дітей із регіонів, різних за характером забруднення, відзначається клінічним поліморфізмом. У дітей із радіаційним навантажен-

Адреса для листування з автором:

Кеч Наталія Романівна

E-mail: NataliaKech@ukr.net

© Кеч Н.Р., 2016

© «Здоров'я дитини», 2016

© Заславський О.Ю., 2016

ням екопатологія має неспецифічний полісистемний характер і більш тяжку форму перебігу, проявляючись синдромами екологічної дезадаптації та ксеногенної інтоксикації, провідними з яких є патологія нирок, кісток, шлунково-кишкового тракту та щитоподібної залози. У дітей із регіонів, забруднених хімічними ксенобіотиками, екопатологія має більш м'який характер і проявляється симптомами, характерними для синдрому екологічної дезадаптації та вторинної імунної недостатності, маркерами якої є патологія верхніх дихальних шляхів — хронічний тонзиліт, часті застудні захворювання та карієс зубів [5].

Молекулярна основа «швидких» та «повільних» ацетиляторів була розшифрована порівняно недавно. Як і передбачалось, її причиною є поліморфізм, зумовлений мутаціями гена — тригера NAT2. Роботи світових учених [2, 5–7] показують, що близько 50 % представників європеїдної раси належать до представників «повільного» ацетилювання (NAT2*5 та NAT2*6). Активність ферментів ацетилювання в усіх «повільних» ацетиляторів знижена порівняно з нормою («швидкими» ацетиляторами) в середньому на 20 %, що призводить до зниження здатності їх організму до детоксикації сполук з аміногрупами. Згідно з думкою спеціалістів, «повільне» ацетилювання містить у собі більше прихованої небезпеки для організму [8, 9].

Мета роботи: вивчити рівень біохімічної активності ферменту N-ацетилтрансферази, продукції гена NAT2 у дітей з екопатологією в динаміці лікування.

Матеріали та методи

Проводили аналіз біохімічної активності N-ацетилтрансферази, що кодується геном NAT2 та бере участь у фазі 2 біотрансформації ксенобіотиків, за методом Пребстінга — Гаврилова в модифікації М.М. Анілової і Н.Ф. Толкачевської [10]. Принцип методу полягає в реакції ацетилювання субстрату (сульфадимезину) поліморфною N-ацетилтрансферазою (NAT) у цитозолі гепатоцитів та адипоцитів, що мають дві молекулярні форми — «повільну» та «швидку».

Визначення у крові та сечі виконується аналогічно. Вільний сульфадимезин: 2,5 мл фільтрату + 0,1 мл 0,5% NaNO₂ перемішують, через 10 хвилин додають 1,5 мл насиченого розчину CH₃COONa, перемішують і додають 0,25 мл 0,5% резорцину. Пробу поміщають у темне приміщення. Через 15 хвилин на спектрофотометрі вимірюють інтенсивність забарвлення при 360 нм.

Загальний сульфадимезин: 2,5 мл фільтрату + 0,25 мл 7–10% HCl інкубують при t = 100 °C 30 хвилин. Після охолодження об'єм розчину доводять H₂O до 2,5 мл. Потім проводиться аналіз, аналогічно як і для визначення вільного сульфадимезину.

Розрахунок проводять, беручи до уваги значення екстинкцій вимірювань загального і вільного сульфадимезинів.

Всього було обстежено 239 дітей з ЕНР та 70 дітей із ЕЧР. Вік дітей — від 3 до 18 років, стать: хлопці — 48 %, дівчата — 52 %. Всі діти оглянуті клінічно, їм проведена інструментальна (УЗД, ультразвукова денситометрія) та лабораторна діагностика. Згідно з вимогами комітету з біоетики «Про проведення лабораторних досліджень біологічного матеріалу», від батьків кожної дитини отримана письмова згода на обстеження їх дітей.

Статистичну обробку клінічних і лабораторних даних здійснювали за загальноприйнятою методикою із застосуванням персонального комп'ютера в пакеті програм Statistica 7 та Microsoft Excel (2007).

Результати дослідження

Протягом трьох років (2008–2010) ми обстежували 239 дітей, які з народження проживали в екологічно несприятливих регіонах Івано-Франківської області (міста Бурштин, Долина, Калуш, Снятин). У цих дітей після клінічного огляду спеціалістами вузького профілю, інструментальних досліджень — проведення ультразвукового огляду стану внутрішніх органів і щитоподібної залози, ультразвукової денситометрії та лабораторних досліджень — були діагностовані ті чи інші захворювання. Всім дітям було запропоновано проведення розробленого нами [11] комплексу стандартної корекції діагностованих екодетермінованих станів.

З огляду на літературні дані та встановлену попередніми дослідженнями провідну роль мембранодеструкції й зниження антиоксидантної активності крові в патогенезі екопатології дітям, крім індивідуальних рекомендацій, було запропоновано пройти 2 рази на рік упродовж трьох років стандартний комплекс терапії (мембранопротектори, ентеросорбенти, препарати кальцію у вікових дозах) із метою виведення токсичних факторів, запобігання прогресуванню виявленої патології та корекції порушень кальцієвого обміну.

До стандартного медикаментозного комплексу увійшли:

1. Аевіт — 1,5 мг/кг на добу протягом одного місяця.
2. Вітамін В₆ — від 40 до 60 мг на добу протягом одного місяця.
3. Ентеросорбенти (ентеросгель, атоксил, силекс) — по 1 чайній ложці 3 рази на добу протягом місяця.
4. Препарати кальцію (CaD₃ Нікомед, кальцеїн, вітрум кальціум) по 1 табл. на добу протягом одного місяця при остеопенії та протягом трьох місяців при остеопорозі.

Аналіз показників «повільного» та «швидкого» ацетилювання у дітей з районів із різним характером забруднення (хімічним — ЕНРБ, ЕНРД, ЕНРК і радіаційним — ЕНРС) у динаміці трирічного спостереження до та після лікування медикаментозним комплексом (сорбентами, антиоксидантами, мембранопротекторами та препаратами кальцію) наведено в табл. 1.

У крові дітей з хімічно забруднених регіонів (ЕНРб, ЕНРд, ЕНРк) ознака «повільного» ацетилювання становила 44 %, «помірно повільного» — 34 %, а ознака «швидкого» ацетилювання зустрічалась з частотою 22 %, що може свідчити про різко знижену біохімічну активність N-ацетилтрансферази у крові обстежених дітей та їх генетичну схильність до виникнення екопатології при дії токсичних або антропогенних негативних факторів оточуючого середовища. У крові дітей з радіологічно забрудненого регіону (ЕНРс) частота ознаки «повільного» ацетилювання становила 76 %, а ознака «швидкого» ацетилювання зустрічалась тільки у 24 % обстежених дітей, що не дуже відрізняється від високої частоти дітей з «повільним» типом ацетилювання з хімічно забруднених регіонів.

Така низька біохімічна активність ферменту, що кодується геном NAT2 та відповідає за активність процесів детоксикації у фазі 2 біотрансформації ксенобіотиків, у обстежених дітей робить їх беззахисними перед шкідливими факторами довкілля.

Після лікування у крові дітей з ЕНРб, ЕНРд та ЕНРк Івано-Франківської області ознака «повільного» ацетилювання становила 50 %, частота ознаки «швидкого» ацетилювання зросла з 22 до 50 %. У той час як уперше виявлені діти з такою ж патологією мали тільки 35 % ознаки «швидкого» ацетилювання. У крові дітей із ЕНРс Івано-Франківської області ознака «повільного» ацетилювання до лікування становила 76 % у 2008 р., частота ознаки «швидкого» ацетилювання — всього 24 %. Після трирічного лікування у крові дітей з ЕНРс ознака «повільного» ацетилювання становила всього 14 %, а частота ознаки «швидкого» ацетилювання зросла з 24 до 86 %, у той час як уперше виявлені діти з екопатологією з ЕНРс

мали 100 % ознаки «повільного» та «помірно повільного» ацетилювання.

Вищенаведені дані свідчать про позитивний ефект від проведеної терапії у дітей як із хімічно, так і з радіологічно забруднених регіонів, і вказують на негативні наслідки постійного надходження ксенобіотиків в організм дітей з екологічно несприятливих регіонів, які не піддаються корекції екологічних впливів.

Отже, можна стверджувати, що низька активність ферменту, що кодується геном NAT2, у дітей з екологічно забруднених регіонів Івано-Франківської області обумовлює їх низьку здатність до ацетилювання, що є підґрунтям для формування екопатології, і в першу чергу — захворювань щитоподібної залози, кісток і нирок. Високий відсоток «повільних» ацетиляторів серед дітей, які проживають на хімічно та радіаційно забрудненій території, вказує на можливість використання показника типу ацетилювання як маркера поліморфізму екопатології, що виникає у дітей при різних за характером забрудненнях довкілля.

Мембранопротекторна, антиоксидантна, сорбційна терапія та застосування препаратів кальцію мають виражений позитивний ефект щодо активності N-ацетилтрансферази у крові обстежених дітей, що дозволяє стверджувати про необхідність застосування такого медикаментозного комплексу для корекції екопатології у дітей, які проживають на хімічно та радіаційно забруднених територіях.

Висновки

1. Низька активність ферменту, що кодується геном NAT2, у дітей з екопатологією, обумовлює їх низьку здатність до ацетилювання, що є підґрунтям

Таблиця 1. Аналіз показників «повільного» та «швидкого» ацетилювання у дітей з екопатологією після проведеної терапії

Групи дітей	Діапазон показників відсотка ацетилювання					
	«Повільний», < 30 %		«Помірно повільний», 30–50 %		«Швидкий», > 50 %	
	п	%	п	%	п	%
ЕНРб, ЕНРд, ЕНРк (n = 136), до лікування	60	44*. **	46	34*. **	30	22
ЕНРб, ЕНРд, ЕНРк (n = 50), після лікування	0	0	25	50	25	50**
ЕНРб, ЕНРд, ЕНРк (n = 34), без лікування	8	24***	14	41	12	35**
ЕНРс (n = 29), до лікування	9	31*	13	45*. **	7	24
ЕНРс (n = 29), після лікування	0	0	4	14	25	86**
ЕНРс (n = 9), без лікування	4	44	5	66***	0	0
ЕЧР (n = 72)	19	31	19	31	23	38

Примітки: * — вірогідна різниця показника між двома групами дітей з ЕНР із різним характером забруднення; $p < 0,001$; ** — вірогідна різниця показника між даними дітей із забрудненого району та контрольної групи з ЕЧР, $p_1 < 0,001$; *** — вірогідна різниця показника між даними дітей до лікування та в катанезі, $p_1 < 0,001$.

для формування екозалежних захворювань щитоподібної залози, кісток і нирок у цих дітей.

2. Мембранопротекторна, антиоксидантна, сорбційна терапія та застосування препаратів кальцію мають виражений позитивний ефект щодо активності ферменту N-ацетилтрансферази у крові обстежених дітей.

3. Високий відсоток «повільних» ацетиляторів серед дітей, що проживають на хімічно та радіаційно забрудненій території, вказує на можливість використання показника типу ацетилювання як маркера поліморфізму екопатології.

Список літератури

1. Поліморфізм генів біотрансформації ксенобіотиків у жінчин, родивших дітей з вродженими пороками розвитку / [А.В. Шабалдин, О.А. Глушкова, О.С. Макаренко и др.] // Педіатрія. — 2007. — Т. 86, № 1. — С. 15-19.
2. Поліморфізм в генах человека, асоціюються з біотрансформацією ксенобіотиків / [В.А. Спицин, С.В. Макаров, Г.В. Пай, Л.С. Бычковская] // Вестник ВОГиС. — 2006. — Т. 10, № 1. — С. 97-105.
3. Антупкін Ю.Г. Стан здоров'я дітей в умовах дії різних екологічних факторів / Ю.Г. Антупкін // Мистецтво лікування. — 2005. — № 2. — С. 16-23.

4. Довкілля Івано-Франківщини: стат. зб. / за ред. Л.О. Зброй. — Івано-Франківськ, 2004. — 133 с.

5. Гнатейко О.З., Кеч Н.Р., Лук'яненко Н.С. Вплив антропогенно забрудненого довкілля на стан здоров'я дітей // Актуальні питання педіатрії, акушерства та гінекології. — 2013. — № 1. — С. 58-61.

6. Borlak J. N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms in colon and lung cancer patients / J. Borlak, S. Reamon-Buetner // BMC Medical Genetics. — 2006. — Vol. 14. — P. 126-129.

7. Sim E. Arylamine N-acetyltransferases / E. Sim, I. Westwood, E. Fullam // Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol. — 2007. — № 3. — P. 169-184.

8. The role of NAT2 gene polymorphism in aetiology of the most frequent neurodegenerative diseases with dementia / Monika Gołab-Janowska, Krystyna Honczarenko, Barbara Gawrońska Szklarz, Andrzej Potemkowski // Neurologia i Neurochirurgia Polska. — 2007. — Т. 41, № 5. — P. 388-394.

9. Deciphering the ancient and complex evolutionary history of human arylamine N-acetyltransferase genes / [E. Patin, L.B. Barreiro, P.C. Sabeti et al.] // Am. J. Hum. Genet. — 2006. — Vol. 78. — P. 423-436.

10. Анилова М.М., Толкачевская Н.Ф. // Лаборат. дело. — 1969. — № 3. — С. 45-48.

11. Схеми комплексного лікування дітей з екопатологією та спосіб контролю за його ефективністю: інформаційний лист № 273, 2003. — К.: Укрмедпатентінформ МОЗ України, 2003. — 4 с.

Отримано 03.02.16 ■

Кеч Н.Р.

ГУ «Институт наследственной патологии НАМН Украины», г. Львов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА N-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ, ПРОДУКЦИИ ГЕНА NAT2 У ДЕТЕЙ С ЭКОПАТОЛОГИЕЙ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕННОЙ ТЕРАПИИ

Резюме. Изучение биохимической активности фермента N-ацетилтрансферазы, продукции гена NAT2 у детей из экологически неблагоприятных регионов (ЭНР) является важным для выявления склонности к экопатологии, особенно к заболеваниям щитовидной железы, почек и органов мочевыводящей системы в условиях загрязненной окружающей среды. Примером такого региона являются химически загрязненные Галицкий, Долинский и Калушский районы и радиологически загрязненный Снятинский район Ивано-Франковской области. Обследованы 239 детей с ЭНР и 70 детей из группы контроля. Возраст детей — от 3 до 18 лет, пол: мальчики — 48 %, девочки — 52 %. Все дети осмотрены клинически, им проведена инструментальная (УЗД, ультразвуковая денситометрия) и лабораторная диагностика до и после терапии. Биохимическим методом определена активность фермента N-ацетилтрансферазы. Низкая активность фермента, кодируемого геном NAT2, у детей с экопатологией, обуславливает их низкую способность к ацетилированию, что является основой для формирования экозависимых заболеваний щитовидной железы, костей и почек у этих детей. Мембранопротекторная, антиоксидантная, сорбционная терапия и применение препаратов кальция имеют выраженный позитивный эффект в отношении активности фермента N-ацетилтрансферазы в крови обследованных детей.

Ключевые слова: активность фермента N-ацетилтрансферазы, экопатология, терапия, дети.

Kech N.R.

State Institution «Institute of Hereditary Diseases of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Lviv, Ukraine

DETERMINATION OF THE BIOCHEMICAL ACTIVITY OF N-ACETYLTRANSFERASE ENZYME, NAT2 GENE PRODUCTION IN CHILDREN WITH ENVIRONMENTAL PATHOLOGY FOLLOWING RECEIVED TREATMENT

Summary. The study of the biochemical activity of the enzyme N-acetyltransferase, NAT2 gene production in children from ecologically unfavorable regions (EUR) is extremely important to identify predisposition to environmental pathology, including thyroid, renal and urinary diseases, in a contaminated environment. An example of this region is chemically contaminated Halytskyi, Dolynskiy and Kaluskiy districts and radiologically contaminated Sniatyn district of the Ivano-Frankivsk region. We have examined 239 children from EUR and 70 children from the control group. Age of children — 3 to 18 years, sex: boys — 48 %, girls — 52 %. All children were examined clinically, they underwent instrumental (ultrasound investigation, ultrasound densitometry) and laboratory diagnosis before and after therapy. Using biochemical method, we have determined the activity of N-acetyltransferase enzyme. Low activity of the enzyme encoded by the gene NAT2, in children with environmental pathology causes their low capacity for acetylation, which is the basis for the formation of environment-related diseases of the thyroid gland, bones and kidneys in these children. Membrane-protective, antioxidant, sorption therapy and the use of calcium supplements have a pronounced positive effect on the activity of the enzyme N-acetyltransferase in the blood of the children.

Key words: N-acetyltransferase enzyme activity, environmental pathology, treatment, children.