

8. Mathew, S. J., Ho, S. (2006). Etiology and neurobiology of social anxiety disorder. *J Clin Psychiatry*. 67 (12), 9–13.
9. Clark, D. M., Ehlers, A., Hackmann, A., McManus, F., Fennell, M., Grey, N. et. al. (2006). Cognitive therapy versus exposure and applied relaxation in social phobia: A randomized controlled trial. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 74 (3), 568–578. doi: 10.1037/0022-006x.74.3.568
10. Mörtberg, E., Clark, D. M., Sundin, Ö., Åberg Wistedt, A. (2007). Intensive group cognitive treatment and individ-

ual cognitive therapy vs. treatment as usual in social phobia: a randomized controlled trial. *Acta Psychiatr Scand*, 115 (2), 142–154. doi: 10.1111/j.1600-0447.2006.00839.x

11. Raigorodskii, D. Ya. (2008) Practical psychodiagnostics. Methods and tests. Samara: Publishing Home “Bahr M”, 672.

12. Kornatsky, V. M., Markova, M. V., Stepanova, N. M., Babych, V. V. (2007). Evaluation of psychosocial risk factors for cardiovascular diseases in patients of primary health care (guidance). Kyiv, 14.

Дата надходження рукопису 12.06.2015

**Пшук Наталія Григорівна**, доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри, кафедра медичної психології та психіатрії з курсом післядипломної освіти, Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018  
E-mail: pshuk\_ng@mail.ru

**Слободянюк Дмитро Павлович**, аспірант кафедри, кафедра медичної психології та психіатрії з курсом післядипломної освіти, Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018  
E-mail: pshuk\_ng@mail.ru

**Довгань Олександр Вікторович**, кандидат медичних наук, доцент, кафедра нормальної фізіології, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018  
E-mail: alexandr.d1980@gmail.com

**Слободянюк Павло Михайлович**, кандидат медичних наук, асистент, кафедра медичної психології та психіатрії з курсом післядипломної освіти, Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018  
E-mail: pshuk\_ng@mail.ru

УДК: 577.21-047.44-053.2/.5:<616.314-08:615.212>

DOI: 10.15587/2313-8416.2015.47684

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ VAL158MET ГЕНА COMT У ДІТЕЙ, ЯКІ ПОТРЕБУЮТЬ СТОМАТОЛОГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ ПІД ЗАГАЛЬНИМ ЗНЕБОЛЕННЯМ

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

*В результаті дослідження поліморфного локусу 472 G>A (Val158Met) гена COMT у дітей із страхом перед стоматологічним лікуванням виявлено відмінності у розподілі генотипів та алелів. Встановлено: генотип Met/Met цього локусу є чинником, який збільшує ризик розвитку страху. Тестування даного локусу гена COMT можна рекомендувати для визначення показів до проведення стоматологічних втручань під наркозом*

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

*The study of an influence of polymorphism of the COMT 2 gene on forming the negative emotions caused by the dental intervention allows to explain an appearance of a fear in children.*

**Aim.** An analysis of polymorphous variants Val158Met of the COMT gene in children who underwent the dental treatment under the general anesthesia.

**Materials and methods.** There were studied the patterns of DNA taken from 31 children who underwent the dental treatment under anesthesia and from 30 children who had not fear of dentist and were treated in usual conditions.

**Results.** As the result of the molecular and genetic research of polymorphous locus 472 G>A (Val158Met) of the COMT gene in the group of children with an unconquerable fear of dental treatment comparing with the control one of children who agreed to cooperation were detected the probabilistic differences in distribution of genotypes and alleles ( $p=0,02$ ). There was established that the presence of Met/Met genotype of the locus 472 G>A (Val-

*158Met) of the COMT gene is a genetic factor that increase the risk of the development of the fear of treatment that can be explained by the higher pain sensitivity in children with such genotype. So the genetic test of the 472 G>A (Val158Met) locus of the COMT gene can be recommended to detect the groups of children that dental treatment under the general anesthesia can be recommended for*

**Keywords:** children, dental treatment, fear, general anesthesia, molecular and genetic analysis, COMT gene, allelic polymorphism

### 1. Вступ

Відомо, що у багатьох випадках стоматологічне лікування дитини неможливо здійснити через страх перед больовими відчуттями та відсутність кооперації з лікарем [1–3]. Тому налагодження співпраці із пацієнтами та анестезіологічне забезпечення стоматологічних втручань є актуальними питаннями дитячої стоматології. Недавні дослідження показали, що генетичні фактори мають значний вплив на особливості сприйняття і реакції на біль [4], в тому числі і на можливість співпраці з лікарем під час стоматологічного лікування або відмову від неї через непереборний страх. У останньому випадку санацію ротової порожнини доводиться робити під загальним знеболюванням. Визначено гени – кандидати, продукти яких задіяні у сприйнятті болю, серед яких високий пріоритет має ген катехол-О-метилтрансферази (COMT). Генетичний поліморфізм на рівні ДНК впливає на активність ферменту COMT [5]. COMT є ферментом з широким спектром біологічних функцій. Однією з його функцій є метаболізм катехоламінів, що можуть мати прямий та побічний вплив на модуляцію болю, через дію ендогенних  $\mu$ -опіоїдних сполук. Для визначення ролі цього гена необхідно провести молекулярно-генетичне дослідження.

### 2. Обґрунтування дослідження

У літературі немає даних щодо ролі поліморфізму гена *COMT* та підвищеної больової чутливості, яка зумовлює поведінкові реакції при лікуванні зубів. Такі дослідження є актуальні з точки зору визначення контингенту пацієнтів для забезпечення анестезіологічного захисту стоматологічних втручань у вигляді загального знеболювання. Тому вважаємо актуальним проведення генетичного тестування серед стоматологічних пацієнтів із множинним карієсом, яким необхідно провести загальне знеболювання для його лікування, для визначення алелів гена *COMT*, які зумовлюють різну активність фермента катехол-О-метилтрансферази, а відповідно і різний больовий поріг.

### 3. Мета дослідження

Аналіз поліморфних варіантів Val158Met гена *COMT* 2 у дітей, яким проводилось лікування зубів в умовах загального знеболювання.

### 4. Матеріали і методи досліджень

Матеріалом для молекулярно – генетичних досліджень стали зразки ДНК, отримані з ядерних клітин венозної крові 31 соматично здорової дитини віком від 3-х до 7-ми років, серед них 16 хлопців та 14 дівчат, яким було проведено санацію ротової порожнини під загальним знеболюванням. Контрольною групою стали 30 дітей цього ж віку, які погоджувались на стоматологічне лікування та не відчували страху перед ним, ДНК у них 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 поліморфних варіантів Val158Met гена *COMT* (номер поліморфізму в базі даних NCBI – rs4860). Досліджувані варіанти гена: Val158Met (заміна амінокислоти валіна в позиції 158 на метіонін), на рівні ДНК 472G>A позначаються латинськими буквами G та A (по назвах нуклеотидів гуаніну та аденіну).

Ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* проводили, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [6]. В результаті обробки продукту ПЛР ендонуклеазою рестрикції *NlaIII* на електрофореграмі візуалізуються фрагменти величиною: 108 п. н. – 472GG генотип, 108 п. н., 72 п. н. та 36 п. н. – 472GA-генотип, 72 п. н. та 36 п. н. – 472AA-генотип, відповідно. Електрофореграму молекулярно-генетичного дослідження поліморфізму 472G>A наведено на рис. 1.

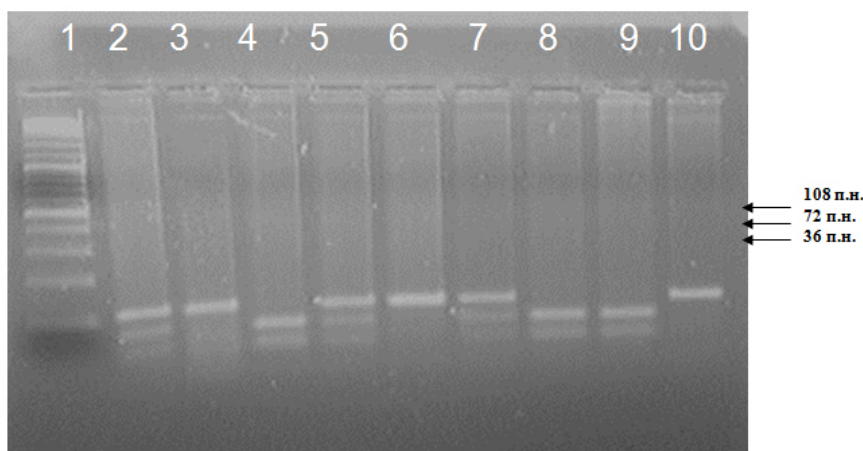


Рис. 1. Електрофореграма рестрикційного аналізу продуктів ПЛР поліморфних варіантів Val158Met (2 % агарозний гель): 1 – маркери молекулярної ваги; 3, 6, 10 – GG-генотип (108 п.н.); 2, 5, 7 – GA-генотип (108 п.н., 72 п.н. та 36 п.н.); 4, 8, 9 – AA-генотип (72 п.н. та 36 п.н.)

Отримані результати обробляли за допомогою методів варіаційної статистики, прийнятих для біологічних досліджень [7] та рекомендованих для обробки результатів молекулярно - генетичних досліджень [8]. Перевірку статистичних гіпотез проводили на рівні значущості  $p \leq 0,05$ . Частоти мутацій генів та теоретично очікуваний розподіл генотипів розраховували з використанням контингентних таблиць 2x2 обчисленням критерію Пірсона  $\chi^2$ .

**5. Результати дослідження**

У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу у 31 особи дослідної групи (з непереборним страхом перед стоматологічним втручаннями) та 30 осіб контрольної встановлено генотип щодо поліморфного локусу Val158Met гена *COMT*. Наявність гуаніну в положенні 472 (алель 472G) відповідає Val у положенні 158 катехол-О-метилтрансферази. При мутації виникає заміна гуаніну на аденін – алель 472A, який відповідає Met у білку. Результати молекулярно-генетичного аналізу локусу 472G>A гена *COMT* у дітей з непереборним страхом перед стоматологічним втручаннями наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Частоти генотипів та алелів локусу с.472G>A (р. Val158Met) гена *COMT* у дослідній групі дітей з непереборним страхом перед стоматологічним втручаннями

Генотипи/ алелі	Частоти алелів та генотипів, %				
	N	Фактична частота	Теоретично очікувана частота (HWE)	$\chi^2$	P
<i>COMT</i> 472 GG	7	22,6	26,6	0,40	0,53
<i>COMT</i> 472 GA	18	58,1	49,9		
<i>COMT</i> 472 AA	6	19,4	23,4		
<i>COMT</i> 472G	32	51,6	–		
<i>COMT</i> 472 A	30	48,4	–		

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

Результати молекулярно-генетичного аналізу локусу с.472G>A (р.Val158Met) гена *COMT* у дітей контрольної групи наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Частоти генотипів та алелів локусу с.472G>A (р.Val158Met) гена *COMT* у дітей контрольної групи

Генотипи/ алелі	Частоти алелів та генотипів, %				
	N	Фактична частота	Теоретично очікувана частота (HWE)	X2	P
472 GG	5	16,7	34,0	9,17	0,002*
472 GA	25	83,3	48,6		
472 AA	0	00,0	17,4		
472 G	35	58,3	–		
472 A	25	41,7	–		

Примітка: n – кількість спостережень, HWE (Hardy-Weinberg equilibrium) – рівновага Харді-Вайнберга, \* – статистично вірогідне значення

Результати розподілу генотипів у дітей з непереборним страхом перед стоматологічним втручаннями у порівнянні з контролем наведено на рис. 2.

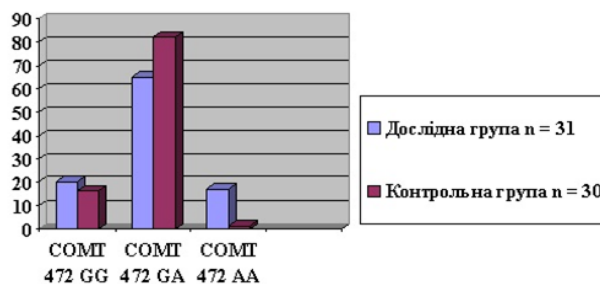


Рис. 2. Розподіл генотипів поліморфного локусу Val158Met гена катехол-О-метилтрансферази (*COMT*) у дітей з непереборним страхом перед стоматологічним втручаннями у порівнянні з контролем ( $\chi^2=7,46$ ,  $p=0,02$ ); n – кількість осіб

Зважаючи на виявлені відмінності щодо розподілу генотипів поліморфного локусу Val158Met гена катехол-О-метилтрансферази у дітей із непереборним страхом перед втручаннями у порівнянні з контрольною групою, вважали доцільним провести дослідження щодо частот алелів в аналізованих вибірках. Показники частот алелів локусу Val158Met гена *COMT* наведені у табл. 3.

Таблиця 3

Частота алелів поліморфного локусу Val158Met гена катехол-О-метилтрансферази (*COMT*) у досліджених групах

Алелі гена <i>COMT</i>	Частота, %		$\chi^2$	P	OR	
	Дослідна група, n=31	Контрольна група, N=30			Знач.	95% CI
472 G	51,6	58,3	0,56	0,46	0,76	0,37–1,56
472 A	48,4	41,7			1,31	0,64–2,68

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

Також ми проаналізували частоти генотипів локусу 472 G>A (Val158Met) гена *COMT* у дітей із непереборним страхом перед втручаннями залежно від статі (табл. 4).

Таблиця 4

Розподіл генотипів локусу 472 G>A (Val158Met) гена *COMT* залежно від статі

Генотип <i>COMT</i>	Дівчата		Хлопці	
	Контрольна група, % (n)	Дослідна група, % (n)	Контрольна група, % (n)	Дослідна група, % (n)
472 GG	11,1 (2)	17,6 (3)	25,0 (3)	28,6(4)
472 GA	88,9 (16)	58,8 (10)	75,0 (9)	57,1(8)
472 AA	0	23,5 (4)	0	14,3(2)
	$X^2=5,56$ , $P=0,06$		$\chi^2=2,06$ , $P=0,36$	

Примітка: n – кількість осіб, P– значимість відмінностей у розподілі генотипів між контрольною і дослідною групами

## 6. Обговорення результатів

У обговоренні результатів дослідження слід зазначити, що встановлений розподіл генотипів за поліморфним варіантом с.472G>A (р.Val158Met) гена *COMT* в дослідній групі відповідає теоретично очікуваному при рівновазі Харді-Вайнберга (табл. 1). Проте, у контрольній групі встановлено вірогідне відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга в сторону браку гомозиготного генотипу 472AA при надлишку генотипу 472GA.

У 83 % дітей контрольної групи виявлено гетерозиготний генотип 472GA. Серед дітей з непереборним страхом перед стоматологічним втручаннями розподіл за генотипами вірогідно відрізнявся: у 58 % осіб дослідної групи встановлено гетерозиготний генотип GA поліморфного локусу Val158Met гена *COMT*, у 22 % нормальний генотип GG та у 19 % генотип 472AA, при якому значно знижена активність катехол-О-метилтрансферази.

Крім того, результати, наведені на рис. 2, свідчать що розподіл генотипів поліморфного локусу Val158Met гена (*COMT*) вірогідно відрізнявся у дітей дослідної групи із непереборним страхом перед втручанням у порівнянні з контролем ( $p < 0,05$ ). У кожної п'ятої дитини, що боялась стоматологічного втручання, виявлено генотип *COMT* 472AA, тобто наявність низько функціонального алелю гена в гомозиготному стані. При цьому даний генотип не виявлено у жодної особи контрольної групи. Ці дані вказують на значне розповсюдження генотипу *COMT* Met/Met, який асоціюється із виникненням панічних розладів [9]. Обрахунок відношення шансів показав зростання ризику розвитку страху перед втручанням при генотипі *COMT* 472 AA у понад п'ятнадцять разів, при невірогідному довірчому інтервалі CI: 0,84 – 289,5.

Як свідчать результати, наведені у табл. 3, частоти алелів локусу Val158Met гена *COMT* нормально G та низько функціонального A практично співпали в обидвох досліджуваних групах. Такі результати, незважаючи на виявлені у роботі відмінності у розподілі генотипів, пояснюються високою частою гетерозиготного носійства алелю A серед осіб контрольної групи. У 83 % осіб контрольної групи встановлено генотип *COMT* 472 GA, який за нашими даними, має протективний ефект щодо розвитку страху перед втручанням ( $OR = 0,28$ , 95 % CI: 0,08–0,92).

Отримані дані також вказують, що генетичним чинником, який збільшує ризик розвитку страху перед втручанням та панічних розладів, є генотип 472 AA гена *COMT*. Як свідчать дані, наведені у табл. 4, виявлені відмінності у розподілі генотипів локусу 472 G>A (Val158Met) гена *COMT* повторюються і в осіб різної статі. Так, найчастішим і серед хлопців, і серед дівчат контрольної групи є гетерозиготний генотип 472 GA. Такий генотип виявлено у 57 % хлопців та 59 % дівчат дослідної групи. У 23,5 % дівчат та у 14,3 % хлопців групи із непереборним страхом перед втручанням встановлено генотип p.158Met/Met (472AA) гена *COMT*, при якому значно знижена активність катехол-О-метилтрансферази і відповідно швид-

кість метаболізму допаміну. Слід вказати, що у жодної із осіб групи контролю цей генотип не виявлено.

У результаті проведених статистичних обчислень отриманих показників, не виявлено вірогідних відмінностей у розподілі генотипів поліморфного локусу 472 G>A гена *COMT* між дівчатами і хлопцями контрольної ( $p = 0,61$ ) і дослідної груп ( $p = 0,43$ ). Варто зазначити, що частоти генотипу 472AA гена *COMT* були значно вищі як у дівчат, так і в хлопців дослідної групи у порівнянні з контролем відповідної статі (табл. 4). Таким чином, отримані показники збільшеного ризику розвитку стресової реакції під час стоматологічного лікування при наявності генотипу 472AA гена *COMT* не залежать від статі і однаково виявляються як у хлопців, так і у дівчат.

## 7. Висновки

А. В результаті проведеного молекулярно-генетичного дослідження поліморфного локусу 472 G>A (Val158Met) гена *COMT* у групі дітей із непереборним страхом перед стоматологічним лікуванням у порівнянні із контрольною групою дітей виявлено вірогідні відмінності у розподілі генотипів та алелів ( $p = 0,02$ ).

Б. Встановлено, що наявність генотипу Met/Met локусу 472 G>A (Val158Met) гена *COMT* є генетичним чинником, який збільшує ризик розвитку страху перед лікуванням, що можна пояснити підвищеною больовою чутливістю дітей із таким генотипом, причому наявність даних чинників не залежить від статі.

Отже, генетичне тестування локусу 472 G>A (Val158Met) гена *COMT* може бути рекомендованим для визначення групи дітей, яким слід проводити стоматологічні втручання під загальним знеболюванням.

## Література

1. Sheller, B. Reasons for repeat dental treatment under general anesthesia for the healthy child [Text] / B. Sheller, B. J. Williams, K. Hays, L. Mancl // *Pediatr Dent.* – 2003. – Vol. 25, Issue 6. – P. 546–552
2. Стош, В. И. Общее обезболивание и седация в детской стоматологии [Текст] / В. И. Стош, С. А. Рабинович. – Москва, «ГЭОТАР – Медиа», 2007. – 176 с.
3. Солонько, Г. М. Особенности проведения общего обезболивания для стоматологической санации детей в амбулаторных условиях [Текст] / Г. М. Солонько, В. А. Пайкуш, Я. В. Заблоцкий, М. М. Угрин // *Клиническая стоматология.* – 2010. – № 3. – С. 52–54.
4. Belfer, I. Candidate gene studies of human pain mechanisms [Text] / I. Belfer, T. Wu, A. Kingman, R. K. Krishnaraju, D. Goldman, M. B. Max // *Anesthesiology.* – 2004. – Vol. 100, Issue 6. – P. 1562–1572. doi: 10.1097/00000542-200406000-00032
5. Zubieta, J. K. COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor [Text] / J. K. Zubieta, M. M. Heitzeg, Y. R. Smith // *Science.* – 2003. – Vol. 299, Issue 5610. – P. 1240–1243. doi: 10.1126/science.1078546
6. Mc Pherson, M. J. PCR: a Practical Approach [Text] / M. J. Mc Pherson, P. Quirke, G. R. Taylor. – New York : Oxford University press, 1993. – 253 p.

7. Гублер, Е. В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях [Текст] / Е. В. Гублер, А. А. Генкин. – Л.: Медицина, 1973. – С. 44–56.

8. Clerget-Darpoux, F. Introduction to the genetic epidemiology of multifactorial diseases [Text] / F. Clerget-Darpoux, S. Lyonnet, P. Broet // ESHG COURSE. – CHU du Kremlin Bicetre, Faculte de Medecine Paris–Sud, France, 2009.

9. Woo, J.-M. Catechol O-methyltransferase genetic polymorphism in panic disorder [Text] / J.-M. Woo, K.-S. Yoon, B.-H. Yu // American Journal of Psychiatry. – 2002. – Vol. 159, Issue 10. – P. 1785–1787. doi: 10.1176/appi.ajp.159.10.1785

#### References

1. Sheller B., Williams, B. J., Hays, K., Mancl, L. (2003). Reasons for repeat dental treatment under general anesthesia for the healthy child. *Pediatr Dent*, 25 (6), 546–552.

2. Stosh, V. I., Rabinovich, C. A. (2007). General anesthesia and sedation in paediatric dentistry. Moscow: «GEO-TAR-Media», 176.

3. Solonko, G. M., Paykush, V. A., Zablotsky, Y. V., Uhryn, M. M. (2010). Specifics of dental treatment un-

der general anesthesia in outpatient care. *Clinical dentistry*, 3, 52–54.

4. Belfer, I., Wu, T., Kingman, A., Krishnaraju, R. K., Goldman, D., Max, M. B. (2004). Candidate Gene Studies of Human Pain Mechanisms. *Anesthesiology*, 100 (6), 1562–1572. doi: 10.1097/0000542-200406000-00032

5. Zubieta, J.-K., Heitzeg, M. M., Smith, Y. R. (2003). COMT val158met Genotype Affects micro-Opioid Neurotransmitter Responses to a Pain Stressor. *Science*, 299 (5610), 1240–1243. doi: 10.1126/science.1078546

6. Mc Pherson, M. J., Quirke, P., Taylor, G. R. (1993). PCR: a Practical Approach. M. J. Mc Pherson. New York : Oxford University press, 253.

7. Gubler, E. V., Genkin, E. V. (1973). Use of non-parametric statistic criteria in biomedical research. *Medicine*, 44–56.

8. Clerget-Darpoux, F., Lyonnet, S., Broet, P. (2009). Introduction to the genetic epidemiology of multifactorial diseases. ESHG COURSE. CHU du Kremlin Bicetre, Faculte de Medecine Paris-Sud, France.

9. Woo, J.-M., Yoon, K.-S., Yu, B.-H. (2002). Catechol O-methyltransferase genetic polymorphism in panic disorder. *American Journal of Psychiatry*, 159 (10), 1785–1787. doi: 10.1176/appi.ajp.159.10.1785

*Дата надходження рукопису 10.06.2015*

**Солонько Галина Миронівна**, кандидат медичних наук, доцент, кафедра стоматології дитячого віку, Львівський Національний Медичний Університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, м. Львів, Україна, 79010  
E-mail: gsolonko@gmail.com

**Смоляр Ніна Іванівна**, доктор медичних наук, професор, кафедра терапевтичної стоматології ФПДО, Львівський Національний Медичний Університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, м. Львів, Україна, 79010  
E-mail: smoljar@ukr.net

**Тиркус Марта Ярославівна**, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, відділення діагностики спадкової патології, ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України», вул. Лисенка, 32, м. Львів, Україна, 79010  
E-mail: makukh\_halyna@ukr.net

**Макух Галина Василівна**, доктор біологічних наук, провідний науковий співробітник, відділення діагностики спадкової патології, ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України», вул. Лисенка, 32, м. Львів, Україна, 79010  
E-mail: makukh\_halyna@ukr.net