

Хасанов А. Г., Суфияров И. Ф., Бадретдинова Ф. Ф., Шайбаков Д.Г., Бадретдинов А. Ф.

Молекулярно-генетические аспекты исследования полиморфизма генов цитокиновой сети у больных спаечной болезнью брюшины

ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа

Khasanov A.G., Sufijarov I.F., Badretdinova F. F., Shaybakov D.G., Badretdinov A.F.

Molecular-genetic aspects of study genes polymorphism of cytokine network in patients with adhesive disease of peritoneum

Резюме

С целью изучения генетических аспектов патогенеза спаечной болезни определен полиморфизм генов цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6 методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК и дана оценка клинико-генетическим ассоциациям в прогнозировании риска заболевания. Генетическими маркерами предрасположенности к развитию спаечной болезни брюшины являются генотип GG полиморфного локуса -308G>A гена TNF- α (OR= 1,914), аллель T полиморфного локуса -511C>T гена IL-1 β (OR=1,700) и генотип CC полиморфного локуса -174G>C гена IL-6 (OR=2,554). Маркерами устойчивости к развитию спаечной болезни брюшины являются генотип GA полиморфного локуса -308G>A гена TNF- α (OR=0,462), генотип CC и аллель C полиморфного локуса -511C>T (соответственно OR=0,510 и OR=0,589).

Ключевые слова: спаечная болезнь брюшины, цитокины, прогнозирование

Summary

With the aim of studying the genetic aspects of the pathogenesis of adhesive disease polymorphism of genes of cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 polymerase chain reaction DNA synthesis is determined and estimation of clinical-genetic associations in predicting risk of disease is made. Genetic markers of susceptibility to the development of adhesive disease peritoneum are genotype of GG polymorphic locus-308G > A TNF- α gene (OR = 1.914) allele (T) polymorphic locus-511C > T gene IL-1 β (OR = 1.700) and genotype of CC polymorphic locus-174 g > C gene IL-6 (OR = 2.554). Markers of resistance to adhesive disease development of the peritoneum are genotype of GA polymorphic locus-308G > A TNF- α gene (OR = 0.462), genotype and allele with polymorphic locus-511C > T (OR = 0.510 and OR = 0.589).

Key words: peritoneal commissures of peritoneum, cytokines, forecasting

Введение

Несмотря на более чем вековую историю активного изучения спаечная болезнь брюшины продолжает оставаться сложной и до конца не решенной медицинской проблемой [1,2,3,4]. Значимость ее также растет в связи с увеличением числа и объема операций на органах брюшной полости [5,6]. К большому сожалению на сегодняшний день нет полного представления об этиологии и патогенезе патологического спайкообразования. Поскольку спайки являются выраженным развитием соединительной ткани в зоне хирургического вмешательства, изучение генотипических особенностей хирургического больного представляет большой интерес. Генетическими маркерами развития спаечной болезни брюшины являются

ся полиморфные варианты генов цитокинов фактора некроза опухоли- α , интерлейкина-1 β , интерлейкина-6. При изучении генома человека проводится детектирование полиморфных геномных систем («молчащих» генов или «генов предрасположенности») и возможных факторов, провоцирующих их патологическое проявление [7]. Проведение таких исследований открывает возможность выявления людей, предрасположенных к спаечной болезни и выбора методов патогенетической профилактики внутрибрюшинных сращений.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 300 пациентов, находившихся на стационарном лечении в ГКБ №8 г. Уфы

Таблица 1. Распределение больных по степени распространенности спаечного процесса в брюшной полости

Группы	Степень выраженности спаечного процесса			
	1+	2+	3+	4+
I	34	10	7	2
II	36	15	7	4
Всего	70	25	14	6

Таблица 2. Характеристика изученных локусов и условий их анализа

Локус гена	Последовательность олигонуклеотидных праймеров	Метод анализа и температура отжига, °C		Номенклатура аллелей (размер фрагментов, п.н.)
		ПЦР	Температура отжига, °C	
-308G>A <i>TNF-α</i>	5'-AATAGGTTTGGAGGCCATG-3' 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'	ПЦР <i>Вир19I</i>	53	GG-87 GA-107+87+20 AA-107
-511C>T <i>IL-1β</i>	5'-TGGCATTGATCTGGTTCATC-3' 5'-GTT-TAG-GAA-TCT-TCC-CAC-TT-3'	ПЦР <i>Ама87I</i>	55	CC-190+114 CT-304+190+14 TT-304
-174G>C <i>IL-6</i>	5'-TGACTTCAGCTTACTCTTTGT-3' 5'-CTGATTGGAAACCTTATTAAG-3'	ПЦР <i>Нар92II</i>	60	GG-122+45+31 GC-167+15+31 CC-167+31

в период с 2005 по 2008 гг. Из них 104 пациента с клиническими проявлениями спаечной болезни составили основную группу, и 196 пациентов контрольную группу без признаков спаечного процесса в брюшной полости. Все больные спаечной болезнью брюшины нуждались в плановой или экстренной хирургической помощи.

Диагноз спаечная болезнь брюшины ставился на основании учета анамнеза, клиничко-лабораторных и инструментальных (рентгенография, абдоминальная сонография) методов обследования, а также интраоперационно при повторных оперативных вмешательствах.

На каждого больного была заполнена специально разработанная нами анкета. В нее вошли данные опроса, амбулаторной карты и истории болезни. Включены сведения о факторах риска пациента, сопутствующих заболеваниях, результаты клинического наблюдения, лабораторных и специальных исследований (данные ультразвукового исследования и диагностической лапароскопии). Оценка выраженности спаечного процесса в брюшной полости осуществляли на основании данных пневмоперитонеограмм с двойным контрастированием по 4-х балльной шкале, предложенной В.В. Плечевым и соавт.[4]. Частоты генотипов и аллелей, а также стандартную ошибку и доверительный интервал выражали в процентах (%). Разницу в распределении частот аллелей и генотипов между группами рассчитывали с использованием критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность (при числе наблюдений менее 10). Ассоциацию аллелей генотипов и гаплотипов с развитием заболевания выявляли, сравнивая выборки больных и здоровых индивидов по частоте одного признака с использованием критерия χ^2 . Парное сравнение частот проводили с использованием точного двустороннего теста Фишера в случае, когда N_i было меньше, или равно 5, или суммарное количество индивидов в обеих группах было менее 100. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Распределение больных по полу и по степени рас-

пространенности спаечного процесса в основной группе было следующим: 39 мужчин (37,5%) и 65 женщин (62,5%)[табл.1]. В контрольную группу было отобрано случайным образом 196 пациентов, проходивших лечение в ГКБ № 8 г. Уфы в 2005-2008 гг., у которых не наблюдалось проявлений спаечной болезни брюшины, мужчин в этой группе - 74 (37,8%), женщин - 122 (62,2%).

С целью изучения генетических аспектов патогенеза спаечной болезни нами изучен полиморфизм генов цитокинов (интерлейкина-1 β , интерлейкина-6, фактора некроза опухоли у больных спаечной болезнью брюшины и дана оценка клиничко-генетическим ассоциациям в прогнозировании риска заболевания.

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили образцы ДНК, выделенные из лимфоцитов периферической венозной крови. Для выделения ДНК использовался стандартный метод фенольно-хлороформной экстракции с небольшими модификациями (микрометод) (Mathew C., 1984). Анализ полиморфных локусов генов *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6* проводили методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК (ПЦР) на термоциклере «Терцик» фирмы «ДНК-Технология» в автоматическом режиме.

В табл. 2 приведены конкретные показатели этого параметра для каждого из исследованных локусов, последовательность локуспецифических олигонуклеотидных праймеров, способы детекции мутаций и полиморфизмов, а также номенклатура аллелей рассчитанные по формуле:

Тотжиг, °C = [(A+T) x 2°C] + [(G+C) x 4°C], где

A, C, G, T- нуклеотиды, входящие в состав олигопрайма. В некоторых случаях для оптимизации ПЦР температуру отжига праймеров уточняли эмпирически [таб.2]

После амплификации ПЦР-продукты всех локусов подвергались гидролизу соответствующими эндонуклеазами рестрикции. Амплифицированные фрагменты ДНК

Таблица 3. Частота генотипов и аллелей полиморфного локуса -308G>A гена TNF- α в группах больных спаечной болезнью брюшины и здоровых индивидов

Генотипы и аллели	Больные	Здоровые	χ^2	p	OR (95%CI)
	N _i ; p _i	N _i ; p _i			
GG	81 ; 77,9	127 ; 64,8	4,876	0,028	1,914 (1,106-3,311)
GA	19 ; 18,3	64 ; 32,7	6,324	0,013	0,462 (0,258-0,824)
AA	4 ; 3,8	5 ; 2,6	0,073	0,787	1,529 (0,401-5,819)
N	104	196	-	-	-
G	181 ; 87	318 ; 81,1	2,967	0,085	1,56 (0,969-2,514)
A	27 ; 13	74 ; 18,9	2,967	0,085	0,642 (0,398-1,034)

Примечание: N_i – число i-х генотипов (аллелей); p_i - частота i-х генотипов (аллелей)

Таблица 4. Частоты генотипов и аллелей полиморфного локуса -511C>T гена IL-1 β у больных спаечной болезнью брюшины и здоровых индивидов

Генотипы и аллели	Больные	Здоровые	χ^2	p	OR (95%CI)
	N _i ; p _i	N _i ; p _i			
CC	30 ; 29,1	46 ; 44,7	4,691	0,031	0,51 (0,287-0,907)
CT	51 ; 49,5	45 ; 43,7	0,488	0,485	1,265 (0,731-2,188)
TT	22 ; 21,4	12 ; 11,7	2,853	0,091	2,06 (0,959-4,425)
N	103	103	-	-	-
C	111 ; 53,9	137 ; 66,5	6,331	0,013	0,589 (0,395-0,877)
T	95 ; 46,1	69 ; 33,5	6,331	0,013	1,7 (1,141-2,532)

Примечание: N_i – число i-х генотипов (аллелей); p_i - частота i-х генотипов (аллелей)

разделяли электрофоретически в 7% полиакриламидном неденатурированном геле (ПААГ). Размеры аллелей определяли путем одновременного электрофореза с маркером (ДНК фага ϕ , гидролизированный рестриктазой PstI).

Результаты и обсуждение

При сравнении общей выборки больных спаечной болезнью брюшины и группы контроля выявлены достоверные различия по частотам генотипов полиморфного локуса -308G>A гена TNF- α [табл. 3].

В группе больных спаечной болезнью брюшины достоверно чаще встречался генотип GG по сравнению с группой контроля (77,9% и 64,8% соответственно, $\chi^2=4,876$; p=0,028). Напротив, генотип GA достоверно чаще встречался в группе здоровых индивидов - 32,7%, тогда как его частота в группе больных спаечной болезнью брюшины составила 18,3% ($\chi^2=6,324$; p=0,013). Частота аллеля G полиморфного локуса -308G>A гена TNF- α в группе больных спаечной болезнью брюшины не имела достоверных отличий от группы контроля (87,0% и 81,1% соответственно, $\chi^2=2,967$; p=0,085). Различия также не наблюдались по частотам аллеля A, в контрольной группе 18,9% и 13,0% в группе больных спаечной болезнью брюшины ($\chi^2=2,367$; p=0,045). По частотам генотипа AA достоверных различий также не обнаружено ($\chi^2=0,073$; p=0,787).

Таким образом, в результате исследования было показано, что маркерами риска развития спаечной болезни брюшины являются генотип GG (OR=1,914; 95% CI 1,106-3,311), напротив, маркером устойчивости является генотип GA (OR=0,462; 95% CI 0,258-0,824).

Анализ распределения частот полиморфного локуса -511C>T гена IL-1 β в группе больных спаечной болезнью брюшины и группе здоровых индивидов [табл. 4] показал статистически достоверные различия, по генотипу CC (29,1% и 44,7% соответственно, $\chi^2=4,691$; p=0,031; OR=0,51; 95% CI 0,287-0,907).

Частота аллеля T в группе больных спаечной болезнью брюшины составила 46,1%, в группе здоровых индивидов - 33,5% ($\chi^2=6,331$; p=0,013; OR=1,700; 95% CI 1,141-2,532). И по аллелю C 53,9% в группе больных СББ против контрольной группы 66,5% ($\chi^2=6,331$; p=0,013; OR=0,589; 95% CI 0,395-0,877).

Сравнительный анализ общей выборки больных спаечной болезнью брюшины и группы контроля [табл. 5] показал статистически достоверные различия по генотипу CC полиморфного локуса -174G>C гена IL-6 (21,4% и 9,6% соответственно, $\chi^2=4,599$; p=0,032). По другим аллелям и генотипам достоверных различий не обнаружено. Таким образом, маркером повышенной устойчивости к развитию спаечной болезнью брюшины являются генотип CC полиморфного локуса -174G>C гена IL-6 (OR=2,554; 95% CI 1,142-5,708)[таб.5]

Проведенные нами исследования указывают на связь между полиморфизмом генов фактора некроза опухоли- α , интерлейкина-1 β , интерлейкина-6 и предрасположенностью к патологическому спаечному процессу. В результате молекулярно-генетического исследования полиморфизма ДНК-локусов генов TNF- α , IL-1 β и IL-6 у пациентов в предоперационном периоде, можно прогнозировать риск развития спаечной болезни брюшины и проводить превентивную противовоспалительную терапию.

Таблица 5. Частота генотипов и аллелей полиморфного локуса -174G>C гена IL-6 у больных спаечной болезнью брюшины и здоровых индивидов

Генотипы и аллели	Больные	Здоровые	χ^2	p	OR (95%CI)
	N _i ; p _i	N _i ; p _i			
GG	39 ; 37,9	44 ; 42,3	0,261	0,610	0,831 (0,477-1,451)
GC	42 ; 40,8	50 ; 48,1	0,841	0,360	0,744 (0,429-1,29)
CC	22 ; 21,4	10 ; 9,6	4,599	0,032	2,554 (1,142-5,708)
N	103	104	-	-	-
G	120 ; 58,3	138 ; 66,3	2,553	0,110	0,708 (0,475-1,056)
C	86 ; 41,7	70 ; 33,7	2,553	0,110	1,413 (0,948-2,107)

Примечание: N_i – число i-х генотипов (аллелей); p_i – частота i-х генотипов (аллелей)

Выводы

1. При изучении полиморфных аллелей гена NAT2 выявлена предрасположенность больных к развитию СББ по генотипу NAT2*4/*5, что позволило рассматривать его в качестве гена-маркера для прогнозирования послеоперационного течения заболевания.

2. Генетическими маркерами предрасположенности к развитию спаечной болезни брюшины являются генотип GG полиморфного локуса -308G>A гена TNF- α (OR= 1,914), аллель T полиморфного локуса -511C>T гена IL-1 β (OR=1,700) и генотип CC полиморфного локуса -174G>C гена IL-6 (OR=2,554).

3. Маркерами устойчивости к развитию спаечной болезни брюшины являются генотип GA полиморфного

локуса -308G>A гена TNF- α (OR=0,462), генотип CC и аллель C полиморфного локуса -511C>T (соответственно OR=0,510 и OR=0,589). ■

Хасанов А. Г. - доктор медицинских наук, профессор, *Суфияров И. Ф.* - доктор медицинских наук, профессор, *Бадретдинова Ф. Ф.* - канд. мед. наук, доцент, *Шайбаков Д. Г.* - канд. мед. наук, доцент, *Бадретдинов А. Ф.* - канд. мед. наук, доцент, Кафедра хирургических болезней ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа. Автор, ответственный за переписку - *Хасанов А. Г.*, 450078 г. Уфа, ул. Чернышевского 160А, E-mail-hasanovag@mail.ru тел. 8-927-310-01-06

Литература:

1. Гатауллин, Н.Г. Послеоперационная спаечная болезнь брюшины. Уфа: Башк. книжн. изд-во; 1978.
2. Женчевский, Р.А. Спаечная болезнь М.: Медицина, 1989.
3. Федоров, В. Д., Кубышкин В. А., И. А. Козлов Хирургическая «эпидемиология» образования спаек в брюшной полости. Хирургия. 2004; 6; 50-3.
4. Плечев В.В., Латыпов Р.З., Тимербулатов В.М. Хирургия спаечной болезни брюшины (руководство). Уфа: Башкортостан; 2015.
5. Бурлев, В.А., Дубинская Е.Д., Гаспаров А.С. Перитонеальные спайки: от патогенеза до профилактики .Проблемы репродукции. 2009; 3; 36-4.
6. Матвеев Н.Л., Арутюнян Д.Ю. Внутривнутрибрюшные спайки – недооцениваемая проблема (обзор литературы) Эндоскопическая хирургия. 2007;5; 60-9.
7. Шевченко, В.А., Топорнина Н.А., Стволинская Н.С. Генетика человека. М.: Гуманит. Изд. Центр ВЛАДОС; 2004.