

ГОРМОНАЛЬНО—ГЕНЕТИЧНИЙ СКРИНІНГ У ХВОРИХ ЗА ВИРАЗКОВОЇ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЇ КРОВОТЕЧІ

І. Д. Дужий, А. М. Романюк, М. С. Линдін, В. В. Братушка, В. Ю. Дубницький, Ю. Ю. Шевченко, С. В. Харченко

Медичний інститут Сумського державного університету

HORMONAL—GENETIC SCREENING IN PATIENTS, SUFFERING GASTRODUODENAL ULCER HEMORRHAGE

I. D. Duzhiy, A. M. Romanyuk, M. S. Lyndin, V. V. Bratushka, V. Yu. Dubnytskyi, Yu. Yu. Shevchenko, S. V. Kharchenko

Виразкова хвороба (ВХ) шлунка і ДПК є мультифакторним захворюванням, проте, роль окремих чинників остаточно не вивчена. Це, зокрема, популяційний генофонд, індивідуальна схильність до виразкоутворення, спричинена генетичною конституцією і впливом навколишнього середовища, чутливість до етіологічних "виразкових" причин інфекції, гастротоксичних лікарських засобів тощо. Ці чинники визначають клінічний перебіг більшості неускладнених форм ВХ.

Клінічний перебіг ВХ шлунка і ДПК все частіше стає атиповим, особливо при виникненні ускладнень, найбільш тяжким з яких є гастродуоденальна кровотеча, що пов'язане з трьома актуальними напрямками санації хворих: персоналіфікацією діагностики, консервативним лікуванням та хірургічним гемостазом.

У теперішній час персоналіфікація діагностики основана на результатах генетичних досліджень, в яких певного значення надають визначенню зв'язку між поліморфізмом генів хворого і перебігом виразкової кровотечі. Наприклад, встановлений зв'язок частоти рецидивної виразкової кровотечі з носійством поліморфного гена інгібітору активатора плазміногену I типу; виразки шлунка — й носійством алеля С гена GSR, алеля А гена GPX3 та алеля 640G гена CYBA тощо [1, 2]. Виявлення ризикового ("патологічного") варіанту поліморфізму генів обґрунтовує прогнозування доброякісного перебігу ВХ, схильності до виник-

Реферат

Генетично—гормональна регуляція відіграє ключову патофізіологічну роль при кровотраті на тлі ускладненої виразкової хвороби (ВХ) шлунка і дванадцятипалої кишки (ДПК), проте, клінічна важливість деяких генів і компенсаторного стероїдогенезу не з'ясована. На базі Сумської обласної клінічної лікарні проведено обстеження 63 хворих з застосуванням ланцюгової реакції з полімеразою (CRP), аналізом довжини рестрикційних фрагментів (CRP—RFLP) та імуногістохімічного дослідження слизової оболонки шлунка та ДПК. Достовірна різниця розподілу поліморфних генів ESR1 та VKORC1 у хворих жіночої та чоловічої статі за наявності виразкової кровотечі не виявлена, за винятком генотипу А/А VKORC1, що достовірно частіше виявляли у жінок ($p < 0,05$). Встановлено, що інтактна зона дна шлунка має імунореактивність щодо альфа—рецепторів естрогену в ядрах епітеліоцитів і стромоцитів. Діагностика поліморфного гену VKORC1 та експресії рецепторів естрогену може бути експериментальною основою для патогенетичної терапії хворих при виникненні кровотечі.

Ключові слова: виразкова хвороба; кровотеча; естроген; поліморфізм генів.

Abstract

Genetic—hormonal regulation plays a key pathophysiologic role in a blood loss on background of complicated gastroduodenal ulcer disease, but a clinical significance of some genes of compensatory steroidogenesis remains unrevealed. Examination of 63 patients, using a chain reaction with polymerase (CRP), analysis of length of restriction fragments (CRP—RFLP) and immunohistochemical investigation of gastroduodenal mucosa were performed on the base of a Sumsky Rural Clinical Hospital. Trustworthy difference of distribution of polymorphic genes ESR1 and VKORC1 in patients of both gender in presence of the ulcer hemorrhage was not revealed, excluding genotype A/A VKORC1, what trustworthy more frequently was revealed in women ($p < 0,05$). There was established, that intact zone of gastric fundus owes immunoreactivity towards alpha—receptors of estrogen in nuclei of epitheliocytes and stromocytes. Diagnosis of polymorphic gene VKORC1 and expression of the estrogen receptors may serve the base for pathogenetic therapy in patients with hemorrhage occurrence.

Key words: the ulcer disease; hemorrhage; estrogen; polymorphism of genes.

нення кровотечі чи малігнізації виразки [3].

Індивідуальний підхід до консервативного лікування хворих з приводу гастродуоденальної кровотечі має бути узгоджений з особливостями метаболізму фармакологічних засобів з огляду на генетичну конституцію пацієнта. Маючи відомості про носійство окремих генів у хворих при виникненні виразкової кровотечі, практикуючий лікар може визначити оптимальні дози про-

тиввиразкових, антисекреторних та інших препаратів, що дозволить суттєво економити витрати у порівнянні з такими за протокольного підходу до лікування [4].

На підставі аналізу результатів хірургічного гемостазу та поліморфізму генів запатентовані методи оперативного лікування ускладненої ВХ ДПК, за яких обсяг оперативного втручання частково визначають за генетичним ризиком та прогнозом для хворого [5]. У 2013 р. в

Таблиця 1. Протокольне визначення поліморфізму генів у хворих за наявності виразкової гастродуоденальної кровотечі		
Параметри	Ген ESR1 (rs2234693)	Ген VKORC1 (rs9923231)
Джерело ДНК	Ядерна ДНК лейкоцитів крові хворого	
Хромосомна позиція поліморфізму генів	6q25.1	16p11.2
Рестриктаза («Thermo Scientific», США)	PvuII	MspI (HpaII)
Сайт рестрикції	5'...CAG ↓ CT G...3'	5'...C ↓ C G°G...3'
	3'...GTC ↑ GAC...5'	3'...G°G C ↑ C...5'
Праймери	Fwd 5' CACACATCACCATTCTCAGC 3'	Fwd 5'AGTTTGGACTACAGGTGCCT
	Rev 5'	3'
	TCTAGACCACACTCAGGGTCTC 3'	Rev 5' GCCAGCAGGAGAGGGAAATA 3'
CRP	В термоциклері GeneAmp CRP System 2700, «Applied Biosystems», США	
Генні алелі	Основний алель Т	Основний алель G
	Міnorний алель С	Міnorний алель А
Можливі варіанти поліморфізму	Гомозигота СС	Гомозигота GG
	Гетерозигота СТ	Гетерозигота GA
	Гомозигота (умовно–патологічна) ТТ	Гомозигота (умовно–патологічна) АА

Японії проведено дослідження, в якому встановлений зворотний зв'язок між поліморфізмом генів ADH1B1/1 і даними гастректомії [6]. У носіїв деяких генів відзначений менш агресивний перебіг ВХ, що, безумовно, впливає на вибір обсягу хірургічного втручання з метою гемостазу та лікування.

Крім генетичних чинників, роль гормонів, особливо стероїдних, недостатньо вивчена, хоча доведена їх участь в адаптації до крововтрати [7]. Розглядаючи виразкову кровотечу як процес, що супроводжується порушеннями іннервації, не виключено, що при цьому вступає в силу патофізіологічний закон денервації Кеннона—Розенблюта, за яким відзначене підвищення чутливості до гормонального контролю ураженої ділянки чи всього органа. Чутливість до гормонів, зокрема, естрогену, реалізується через чутливість рецепторів клітин—мішеней, тому пошук гормонального впливу слід розпочинати з дослідження специфічних рецепторів слизової оболонки шлунка і ДПК як ключового ланцюга для гормонального контролю. Перші кроки зроблені, проте, вони стосуються лише неускладненого перебігу ВХ [8].

З розвитком інноваційних технологій і широким впровадженням ендоскопічного та імуноморфологічного моніторингу дослідження генетично—гормональної регуляції

кровотечі при ВХ стає перспективним для практики. Проте, з можливих факторів ризику виникнення кровотечі у пацієнтів при ВХ не вивчений вплив генів ESR1 та VKORC1, відповідальних за чутливість організму до естрогену та вітаміну К. Не уточнений вплив експресії альфа—рецепторів естрогену клітинними структурами слизової оболонки шлунка і ДПК на тлі виникнення кровотечі. Це обґрунтовує актуальність проблеми.

Мета роботи: вивчити розподіл генів ESR1 (rs2234693) та VKORC1 (rs9923231) у пацієнтів при ВХ шлунка і ДПК, ускладненій гастродуоденальною кровотечею; провести імуногістохімічне дослідження експресії альфа—рецепторів естрогену ядрами клітин слизової оболонки шлунка і ДПК у хворих при виникненні виразкової гастродуоденальної кровотечі, що дасть можливість розширити уявлення про патогенез ВХ та її ускладнень за типом кровотечі.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У 2014 р. обстежені 63 хворих з приводу виразкової гастродуоденальної кровотечі на базі хірургічного відділення Обласного центру шлунково—кишкових кровотеч Сумської обласної лікарні та Медичного інституту Сумського державного університету. У дослідження

включені хворі віком старше 18 років, госпіталізовані до спеціалізованого хірургічного відділення, за відсутності попередньої гормонотерапії, за згоди пацієнта на участь у дослідженні.

Для протокольних досліджень з метою визначення поліморфізму генів ESR1 (rs2234693) та VKORC1 (rs9923231) забирали 0,1 мл венозної крові хворих, проводили CRP з аналізом довжини рестрикційних фрагментів (CRP—RFLP) (табл. 1).

Після рестрикції отримані ампліфікати для обох генів розділяли у 2,5% агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл етидію броміду. Горизонтальний електрофорез (0,13А, 200V) проводили протягом 30 хв. ДНК після електрофорезу візуалізували за допомогою транслюмінатора ("Бюком").

Імунореактивність альфа—рецептору естрогену (67 кДа) визначали за протоколом виробника антитіл Thermo Fisher Scientific (США). Статистичні дані попарно обробляли з використанням t—тесту для визначення достовірності з порогом $p < 0,05$ [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Чоловіків було 41, жінок — 22. У чоловіків при виразковій кровотечі частота варіантів Т/Т, Т/С та С/С на ESR1 становила відповідно 34, 44 та 22%; у жінок — 41, 41 та 18%. Час-

Таблиця 2 Розподіл генів у хворих за наявності виразкової кровотечі

Генотипи	Чоловіки (n=41)		Жінки (n=22)		p (за Z-значенням)
	абс.	%	абс.	%	
ESR1					
T/T	14	34	9	41	>0,05 (Z=0,276)
T/C	18	44	9	41	>0,05 (Z=0,037)
C/C	9	22	4	18	>0,05 (Z=-0,047)
VKORC1					
G/G	19	46	7	32	>0,05 (Z=0,797)
G/A	15	37	4	18	>0,05 (Z=1,197)
A/A	7	17	11	50	<0,05 (Z=2,486)
Пари генотипів					
T/T; G/G	5	12	4	18	>0,05 (Z=0,27)
T/T; G/A	5	12	1	4,5	>0,05 (Z=0,44)
T/T; A/A	4	10	4	18	>0,05 (Z=0,507)
T/C; A/A	2	5	6	27	>0,05 (Z=1,63)
T/C; G/G	11	27	2	9	>0,05 (Z=1,35)
T/C; G/A	5	12	1	4,5	>0,05 (Z=0,442)
C/C; G/G	3	7	1	4,5	>0,05 (Z=-0,23)
C/C; G/A	5	12	2	9	>0,05 (Z=-0,059)

тота варіантів G/G, G/A та A/A гена VKORC1 у чоловіків становила відповідно 46, 37 та 17%; у жінок — 32, 18 та 50%. Достовірна різниця розподілу поліморфних генів ESR1 та VKORC1 у жінок і чоловіків при виразковій кровотечі не виявлена, за винятком генотипу A/A VKORC1, що достовірно частіше виявляли у жінок ($p < 0,05$) (табл. 2).

Отримані дані свідчать про відсутність статевого диморфізму до рецепторів естрогенів за геном ESR1. При генотипуванні VKORC1 встановлена достовірна різниця щодо носійства умовно патологічного варіанта A/A: такий варіант встановлений у 50% у жінок і 17% чоловіків.

Виявлена достовірна різниця щодо носійства умовно патологічного генотипу A/A у жінок свідчить про особливість метаболізму вітаміну K та підвищений ризик виникнення серцево-судинних захворювань, що необхідно мати на увазі під час корекції крововтрати і гемостазу.

При дослідженні слизової оболонки шлунка і ДПК у хворих при виразковій кровотечі виявлена позитивна реакція ядер мукоцитів і стромальних клітин у дні шлунка до

альфа—рецептору естрогену у жінок і чоловіків, що свідчить про можливу відсутність статевого диморфізму на рівні альфа—рецепторів і естрогеночутливості слизової оболонки.

Отримані результати і дані літератури дають підстави сформулювати таку гіпотезу: виразкова кровотеча — це локальний естроген—дефіцитний стан, у тому числі пов'язаний з ятрогенним фармакогенним впливом (антисекреторна терапія, тощо) [8]. З огляду на появу експресії альфа—рецепторів естрогену ядрами клітин епітелію інтактної слизової оболонки шлунка, слід вважати, що вона є компенсаторним захисним механізмом від виразкоутворення, що реалізується шляхом зв'язування циркулюючого естрогену крові або його власної продукції з специфічними рецепторами ядер клітин—мішеней, що "змушує" клітини дна шлунка виробляти захисні компоненти.

Оскільки у дослідженні не виявлена достовірна різниця щодо розподілу варіантів гена ESR1, це свідчить, що естрогенопротекція не пов'язана з статтю пацієнта при ВХ, ускладненій кровотечею. При вив-

ченні пар генів у нашому дослідженні достовірна різниця розподілу по парах у пацієнтів обох статей не виявлена. Проте, інші комбінації гена ESR1 з іншими генами можуть впливати на метаболізм естрогену, що необхідно мати на увазі під час клінічних досліджень [10].

Одержані результати свідчать про перспективи застосування естрогену та індивідуалізацію доз вітаміну K у пацієнтів при ВХ, ускладненій кровотечею, за відповідних клінічних умов.

ВИСНОВКИ

1. Достовірна різниця щодо розподілу поліморфних генів ESR1 і VKORC1 у пацієнтів жіночої та чоловічої статі при виразковій кровотечі не виявлена.

2. Винятком є генотип A/A VKORC1, що достовірно частіше діагностували у жінок ($p < 0,05$), що є підґрунтям для пошуку індивідуальних доз вітаміну K та прогнозування ризику виникнення кровотечі.

3. Імунореактивність щодо альфа—рецепторів естрогену в ядрах мукозоцитів і стромоцитів інтактної зони у дні шлунка може свідчити про "місцеву" естрогеноспецифічність.

4. Визначення експресії рецепторів естрогену може бути експериментальною основою для комплексного таргетного лікування, у тому числі профілактичної "прицільної" хірургічної санації рефрактерних виразкових зон з огляду на захисні властивості естрогену.

5. З огляду на отримані результати, слід обговорити доцільність розробки Національної наукової програми з профілактики ускладнень ВХ, орієнтуючись на генетичні дані хворих при гастродуоденальній кровотечі.

Перспективи подальших досліджень: розробити дизайн клінічного випробування експериментального дозування вітаміну K та естрогенотерапії згідно носійства поліморфних варіантів VKORC1 і ESR1 у хворих при виразковій кровотечі в умовах регіонального спеціалізованого центру.

ЛІТЕРАТУРА

1. Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 gene polymorphism in patients with gastric ulcer complicated with bleeding / H. S. Kim, K. Y. Hwang, I. K. Chung [et al.] // *J. Korean Med. Sci.* — 2003. — Vol. 18, N 1. — P. 58 — 64.
2. Солодилова М. А. Вовлеченность полиморфизма генов ферментов антиоксидантной системы в формирование предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям человека: автореф. дис. ... д—ра биол. наук : спец. 03.00.15 / М. А. Солодилова; Рос. ун—т дружбы народов. — М., 2009. — 35 с.
3. Association of *Helicobacter pylori* cagA gene with gastric cancer and peptic ulcer in Saudi patients / T. Saber, M. M. Ghonaim, A. R. Yousef [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* — 2015. — Vol. 25, N 7. — P. 1146 — 1153.
4. Agundez J. A. Genetically based impairment in CYP2C8— and CYP2C9—dependent NSAID metabolism as a risk factor for gastrointestinal bleeding: is a combination of pharmacogenomics and metabolomics required to improve personalized medicine? / J. A. Agundez, E. Garcia—Martin, C. Martinez // *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* — 2009. — Vol. 5, N 6. — 607 — 620.
5. Пат. 2252709, РФ, МПК А61В10/00, С12Q1/25 С1. Способ выбора лечения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки / С. А. Вавринчук, Е. Л. Никонов, В. И. Федченко, С. О. Гурьев; патентообладатель Дальневост. гос. мед. ун—т. — № 2003135608/14; заявл.05.12.03; опубли. 27.05.05.
6. Trends in gastrectomy and ADH1B and ALDH2 genotypes in Japanese alcoholic men and their gene—gastrectomy, gene—gene and gene—age interactions for risk of alcoholism / A. Yokoyama, T. Yokoyama, T. Matsui [et al.] // *Alcohol.* — 2013. — Vol. 48, N 2. — P. 146 — 152.
7. Raju R. Estrogen: a novel therapeutic adjunct for the treatment of trauma—hemorrhage—induced immunological alterations / R. Raju, K. I. Bland, I. H. Chaudry // *Mol. Med.* — 2008. — Vol. 14, N 3—4. — P. 213 — 221.
8. Исламова Е. А. Особенности клиники, диагностики, лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у пациентов различного возраста: автореф. дис. ... д—ра мед. наук : спец. 14.01.04 / Е. А. Исламова; Волгоград. гос. мед. ун—т.— Волгоград, 2010. — 28 с.
9. Флетчер Р. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины / Р. Флетчер, С. Флетчер, Э. Вагнер: пер. с англ. — М.: Медиа Сфера, 1998. — 352 с.
10. ESR1, ESR2 and FSH receptor gene polymorphisms in combination: a useful genetic tool for the prediction of poor responders / E. Anagnostou, D. Mavrogianni, Ch. Theofanakis [et al.] // *Curr. Pharm. Biotechnol.* — 2012. — Vol. 13, N 3. — P. 426 — 434.

