

дерматології, венерології, косметології. – 2013. – № 3 (50). – С. 29–37.

5. Сорокина Е. В. Клинико-иммунологические особенности эритем, иммунологические маркеры как основа для оптимизации диагностики и терапии : дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.10 / Е. В. Сорокина. – М., 2014. – 310 с.

6. Erythema Multiforme: A Review of Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, and Treatment / F. Samim, A. Auluck, C. Zed, P. M. Williams // Dental Clinics of North America. – 2013. – Vol. 57 (4). – P. 583–596.

REFERENCES

1. Zapolskiy M.E. Herpesvirusnye zabolevaniya (alfa-, beta-, gamma - podgruppy) [Herpesvirus diseases (alpha, beta, gamma, subgroups), scien-

tific edition]. Odessa, Fotosyntetika, 2010. 285 p.

2. Zapolskiy M.E. Herpes virus associated erythema multiforme. Epidemiology and pathogenetically grounded therapy. *Klinicheskaya immunologiya, allergologiya i infektologiya* 2012; 8 (57): 52-56.

3. Zapolskiy M.E. The peculiarities of therapy of herpes associated erythema multiforme. *Dermatologiya i venerologiya* 2012; 4 (58): 70-75.

4. Mavrov G.I., Zapolskiy M.E. Complex method of treatment of patients with exudative erythema multiforme associated with herpesvirus infection, taking into account the clinical and laboratory criteria. *Ukrainskiy zhurnal dermatologii, venerologii, kosmetologii* 2013; 3 (50): 29-37.

5. Sorokina E.V. *Kliniko-immunologicheskie osobennosti eritem, immunologicheskie marker kak osnova dlya optimizatsii diagnostiki i terapii: dissertatsiya ... doctora med. nauk: 14.01.10.* [Clinical and immunological features of erythemas, immunological markers as a basis for optimization of diagnostics and therapy: PhD thesis: 14.01.10]. Moscow, 2014. 310 p.

6. Samim F., Auluck A., Zed C., Williams P.M. Erythema Multiforme: A Review of Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, and Treatment. *Dental Clinics of North America* 2013; 57 (4): 583-596.

Поступила 6.04.2015

Рецензент д-р мед. наук,
проф. Т. В. Чабан

УДК 618.13-007.274-089-072.1:615.84:575.174-015.3

В. М. Запорожан, А. Г. Волянська, І. З. Гладчук,
В. Г. Марічереда, Ю. Ю. Петровський

ВПЛИВ НОСІЙСТВА ПОЛІМОРФНИХ АЛЕЛІВ ГЕНІВ MMP1-1607insG, VEGFA/C634G І COL2A1/6846C>A НА СПАЙКОУТВОРЕННЯ ПІСЛЯ ХІРУРГІЧНОГО ЛІКУВАННЯ У БЕЗПЛІДНИХ ЖІНОК

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 618.13-007.274-089-072.1:615.84:575.174-015.3

В. Н. Запорожан, А. Г. Волянская, И. З. Гладчук, В. Г. Маричереда, Ю. Ю. Петровский
ВЛИЯНИЕ НОСИТЕЛЬСТВА ПОЛИМОРФНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ MMP1-1607insG, VEGFA/
C634G И COL2A1/6846C>A НА СПАЙКООБРАЗОВАНИЕ ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ
Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

Данные проведенного исследования подтверждают наличие существенной связи полиморфизма генов MMP1-1607insG, VEGFA/C634G и COL2A1/6846C>A с риском развития спаечного процесса. Расчетные значения коэффициентов корреляции Спирмена MMP1 (0,6), COL2A1 (0,4) и VEGF (-0,36) могут свидетельствовать о том, что указанные гены входят в генную сетку, которая участвует в спайкообразовании, в роли вспомогательных генов, так называемых генов-модификаторов, что подтверждается результатами анализа межгенного взаимодействия по программе GeneMANIA.

Между VEGF и спаечным процессом есть обратная связь, что свидетельствует о том, что мутантный аллель G-634 VEGF играет протекторную роль и, возможно, препятствует спайкообразованию.

Ключевые слова: спаечный процесс, бесплодие, хирургическое лечение, гены MMP1, VEGFA, COL2A1.

UDC 618.13-007.274-089-072.1:615.84:575.174-015.3

V. M. Zaporozhan, A. G. Volyanska, I. Z. Gladchuk, V. G. Marichereda, Yu. Yu. Petrovskyy
EFFECT OF MMP1-1607insG, VEGFA/C634G AND COL2A1/6846C>A GENE POLYMORPHISMS
ON ADHESION FORMATION AFTER SURGERY

The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

Aim of this study was to investigate effect of MMP1-1607insG, VEGFA/C634G and COL2A1/6846C>A gene polymorphisms on adhesion formation after surgery.

132 patients with advanced pelvic adhesions after operations on abdominal or pelvic organs were selected for study.

Pelvic adhesion of stage I was found in 29 (21,9%), II — 40 (30,3%), III — in 34 (25,8%), IV — in 29 (21,9%) cases. Adhesions severity was not dependant on the type of surgical access (laparoscopy



or laparotomy). In patients with stage III–IV adhesions 19 (30.2%) patients had a history of endoscopic surgery. Among patients with stage I–II 16 (23.2%) patients underwent laparotomy. Presence of 2G allele in the heterozygous form *MMP1-1607insG* was found in 126 (95.4%) patients with pelvic adhesions. 54 (40.9%) patients were found to be carriers of mutant alleles of the gene *COL2A1/6846C>A*. Combination of polymorphic genes *MMP1-1607insG* and *COL2A1/6846C>A* occurred in 41 (31.1%) cases. The combination of *MMP1-1607insG*, *COL2A1/6846C>A* and *VEGFA/C634G* polymorphisms was found in 14 (10.6%) patients with stage I adhesions.

Detection of heterozygous polymorphism — 1607insG of gene *MMP1* in infertile patients indicates a high probability of adhesion formation, the relative risk of the presence of adhesions.

Presence of G-634 *VEGF* gene polymorphism was found in 48 (36.4%) patients with pelvic adhesive process.

Negative correlation found between the presence of *VEGF* gene polymorphism and adhesive process. This may indicate that presence of mutant allele G-634 of *VEGF* is responsible for prevention of adhesion formation.

Key words: adhesions, infertility, surgery, *MMP1*, *VEGFA*, *COL2A1*.

Запальна реакція очеревини на ушкодження під час оперативних втручань є основною причиною спайкоутворення та пов'язаних із ним ускладнень (безплідність, позаматкова вагітність, кишкова непрохідність) [1]. При використанні сучасної електрохірургічної техніки виникають додаткові фактори утворення спайок, такі як продукти деструкції тканин у результаті термічного ушкодження та сухий газ, що утворюється при дисекції [2].

Викликана хірургічним втручанням ішемія тканин посилює локальну продукцію факторів, що сприяють спайкоутворенню, а саме ендотеліального фактора росту судин, сигнального білка, що виробляється клітинами для стимулювання васкулогенезу [3], колагену II типу, одного з основних компонентів міжклітинної речовини сполучної тканини [4], і ферменту металопротеїнази матриксу, активність якого впливає на деградацію й експансію екстрацелюлярного матриксу та формування спайок [5]. Наявність поліморфізмів генів *VEGF*, *COL2A1*, *MMP1*, що кодують вищезазначені білки, може бути додатковим і суттєвим фактором ризику, а також маркером прогнозу розвитку спайкоутворення.

Метою дослідження є вивчення асоціації носійства поліморфних алелів генів *MMP1-1607insG*, *VEGFA/C634G* та *COL2A1/6846C>A* на спайкоутворення після хірургічного лікування.

Матеріали та методи дослідження

До проспективного когортного дослідження увійшли 156 жінок. Основну групу утворили 132 пацієнтки з безплідністю та спайковим процесом органів малого таза, що мали в анамнезі операції на органах черевної порожнини і малого таза. До контрольної групи увійшли 24 здорові жінки без спайкового процесу, яким уперше виконували ургентні операції (апоплексія яєчника). Усі пацієнтки були обстежені відповідно до вимог чинних клінічних протоколів, регламентованих наказами МОЗ України [6]. Пацієнткам була виконана оперативна лапароскопія за загальноприйнятою методикою згідно з принципами реконструктивної мікрохірургії в оптимальному обсязі [7]. Ступінь тяжкості спайкового процесу оцінювали інтраопераційно відповідно до класифікації J. Hulka (1991) [7].

Носійство поліморфних алелів *MMP1-1607insG*, *VEGFA/C634G* і *COL2A1/6846C>A* визначали у жінок основної та контрольної груп. Матеріалом для аналізу була ДНК, виділена з букальних клітин методом Деллапорта [8]. Генотипування поліморфізмів *MMP1-1607insG*, *VEGFA/C634G* та *COL2A1/6846C>A* проводили методом алельспецифічної полімеразної ланцюгової реакції. Ампліфікацію досліджуваних ділянок генів проводили паралельно в двох пробірках «Еппендорф»

для нормального і мутантного варіантів гена в 20 мкл буферного розчину, 100 нм кожного олігонуклеотидного праймера (реагенти фірми НПО «Литех», Російська Федерація) та 100–150 нг ДНК.

Здійснювали полімеразну ланцюгову реакцію на ампліфікаторі BIO-RAD (США). Розділення продуктів ампліфікації проводили в горизонтальному 2 % агарозному гелі, приготовленому на одноразовому трисборатному буфері (1xTBE). Маркер молекулярної ваги ДНК pUC19 : Msp1. Агарозний гель забарвлювали бромистим етидієм і візуалізували в прохідному ультрафіолетовому світлі.

Статистичну обробку виконували з використанням методів дисперсійного та кореляційного аналізу за допомогою програмного забезпечення R 3.11 (мови й оточення для статистичних обчислень і графіки) [9–11].

Результати дослідження та їх обговорення

Основна та контрольна групи були порівнюваними за віком — (33,2±2,1) і (30,7±2,5) року відповідно. Наявність постійного або періодичного болю в животі відмічали 61 (46,2 %) обстежених хворих, періодичне здуття живота — 36 (27,3 %), альгоменорею — 33 (25,0 %), диспареунію — 18 (13,6 %).

Оперативні втручання в анамнезі були в усіх обстежених пацієнток основної групи: трубна вагітність — у 52 (39,4 %), апоплексія яєчника — у 29 (21,9 %), міома матки — у 23



(17,42 %), доброякісні новоутворення яєчника — у 29 (21,97 %), гострий апендицит — у 26 (19,7 %). Операції виконувалися лапаротомним доступом у 40 (30,3 %), лапароскопічним — у 68 (51,5 %) пацієнток.

Під час лапароскопії було встановлено спайковий процес органів малого таза I стадії у 29 (21,9 %) пацієнток, II — у 40 (30,3 %), III — у 34 (25,8 %), IV — у 29 (21,9 %). Переважне розташування спайкового процесу між матковою трубою та яєчником відмічалось у 124 (93,4 %) хворих, у більшості випадків з лівого боку — у 94 (71,2 %). При дослідженні особливостей і характеру спайкового процесу встановлено, що спайки мали виражену васкуляризацію, нечітку межу між нормальними та патологічними тканинами у 32 (24,2 %) хворих. Спайки в ділянці сигмоподібного відділу кишечника, між сальником і передньою черевною стінкою, які не порушували нормальної анатомії тазових органів, мали 36 (27,3 %) хворих.

Серед хворих з III–IV стадіями (n=63) спайкового процесу 19 (30,2 %) пацієнток мали в анамнезі ендокхірургічні операції, 16 (23,2 %) пацієнток із I–II стадіями (n=69) перенесли лапаротомію.

При аналізі наявності поліморфних алелів у 6 (25 %) практично здорових жінок контрольної групи виявили носійство гомозиготного генотипу *MMP1* (1G/1G-1607). У пацієнток зі спайковим процесом органів малого таза визначено носійство алеля 2G у гетерозиготній формі (1G/2G-1607) у 126 (95,4 %) випадках або у гомозиготній формі (2G/2G-1607) — у 6 (4,5 %). У 14 (10,6 %) пацієнток, у яких була комбінація поліморфізму генів *MMP1-1607insG*, *COL2A1/6846C>A*, *VEGFA/C634G*, в анамнезі відмічено ендокхірургічні операції, ці жінки мали поодинокі безсудинні спайки.

При аналізі поліморфізму гена *MMP1-1607insG* у зв'яз-

ку зі спайкоутворенням між досліджуваними ознаками встановлено прямий кореляційний зв'язок (коефіцієнт кореляції Спірмена $\rho=0,6$), що за шкалою Чеддока відповідає зв'язку помітної сили [9; 10]. Отже, можна зробити припущення, що наявність мутації *MMP1-1607insG* у гетерозиготному стані пов'язана з підвищенням ризику спайкоутворення з високою чутливістю (0,96), відношення шансів (ВШ) = 2,63 (95 % ДІ 0,15–47,19), що свідчить про високу ймовірність спайкового процесу за умов носійства даного поліморфізму [9; 10].

При вивченні частоти зустрічальності поліморфізму гена колагену другого типу альфа-1 (*COL2A1/6846C>A*) виявлено, що носіями мутантного алеля були 54 (40,9 %) пацієнток в основній групі та 6 (25 %) — у контрольній групі; ВШ = 2,1 (95 % ДІ 0,44–9,87). Відносний ризик наявності спайкоутворення також високий — 1,45. Коефіцієнт кореляції Спірмена (ρ) дорівнює 0,4. Зв'язок між досліджуваними ознаками — прямий, тіснота (сила) зв'язку за шкалою Чеддока — помітна. Статистично значущих відмінностей між частотою зустрічальності алелів і генотипів поліморфного локусу *6846C/A* гена *COL2A1* у досліджуваних групах не виявлено. Одержані дані підтверджують наявність істотного зв'язку поліморфізму гена *COL2A1/6846C>A* за *A/A* і *C/A* генотипами з ризиком розвитку спайкового процесу як результат можливого порушення процесів колагенування [1].

У пацієнток зі спайковим процесом органів малого таза виявлено носійство мутантного алеля *G-634* гена *VEGF* у 48 (36,4 %) випадках. При дослідженні впливу поліморфізму *G-634* гена *VEGF* на ризик розвитку спайкової хвороби коефіцієнт кореляції Спірмена (ρ) становив -0,36. Зв'язок між досліджуваними ознаками був зворотним, тіснота (сила) зв'язку за шкалою Чед-

дока — помітною. Статистично значущих відмінностей із групою здорових осіб не виявлено, ВШ=0,75 (95 % ДІ 0,16–3,56). Одержані результати свідчать про можливу протективну роль мутантного алеля *G-634* у розвитку спайкової хвороби у групі обстежених хворих.

Таким чином, у пацієнток зі спайковим процесом органів малого таза виявлено носійство алеля 2G у гетерозиготній формі гена *MMP1* (1G/2G-1607) у 63 (95,4 %) випадках. Також виявлено, що носіями мутантного алеля гена *COL2A1/6846C>A* були 27 (39,1 %) пацієнток. Комбінація поліморфних варіантів генів *MMP1-1607insG* та *COL2A1/6846C>A* спостерігалася в 41 (31,1 %) випадку.

Отже, одержані дані підтверджують наявність суттєвого зв'язку поліморфізму генів *MMP1-1607insG*, *COL2A1/6846C>A*, *VEGFA/C634G* з ризиком розвитку спайкового процесу. Розрахункові значення коефіцієнтів кореляції Спірмена *MMP1* (0,6), *COL2A1* (0,4) і *VEGF* (-0,36) можуть свідчити про те, що зазначені гени входять до генної мережі, яка бере участь у спайкоутворенні в ролі допоміжних генів, так званих генів-модифікаторів, що підтверджується результатами аналізу міжгенної взаємодії за програмою GENE-MANIA. Згідно зі статистичною обробкою програми, найбільш значущими процесами, які виникають у результаті взаємодії зазначених генів, є «організація екстрацелюлярної структури» (14/291), «організація екстрацелюлярного матриксу» (14/290), «катаболітичні процеси колагену» (10/65), «васкулярний ендотеліальний ріст» (8/37) [12].

До вказаної групи належать гени, що не мають власного прояву у фенотипі, але надають послаблювального або підсилювального впливу на експресію інших генів, таким чином прискорюючи і посилюючи патологічний процес, але не ві-



діграють провідної ролі в його розвитку [3–5]. Одержані результати щодо наявності зворотного зв'язку між геном *VEGFA* та спайковим процесом дають змогу зробити припущення, що мутантний алель *G-634* цього гена може мати протективні властивості стосовно спайкоутворення.

Висновки

1. Спайковий процес органів малого таза I стадії виявлено у 29 (21,9 %), II — у 40 (30,3 %), III — у 34 (25,8 %), IV — у 29 (21,9 %) випадках. Стадія спайкового процесу не залежить від типу оперативного доступу (лапароскопія або лапаротомія).

2. У 126 (95,4 %) пацієнок зі спайковим процесом органів малого таза виявлено носійство алеля *2G* в гетерозиготній формі *MMP1-1607insG*. Також виявлено, що носіями мутантного алеля гена *COL2A1/6846C>A* були 54 (40,9 %) пацієнок. Комбінація поліморфних генів *MMP1-1607insG* та *COL2A1/6846C>A* визначена в 41 (31,1 %) випадку.

3. Комбінація поліморфізмів *MMP1-1607insG*, *COL2A1/6846C>A*, *VEGFA/C634G* установлена у 14 (10,6 %) пацієнок, у яких спайковий процес відповідав I стадії.

4. Виявлення мутації *MMP1-1607insG* в гетерозиготному стані у безплідних хворих зі спайковим процесом свідчить про високу ймовірність спайкового процесу, відносний ризик наявності спайкоутворення — 1,45, чутливість — 0,96.

5. Серед пацієнок зі спайковим процесом органів малого таза виявлено носійство мутантного алеля *G-634* гена *VEGFA* у 48 (36,4 %) випадках. Між наявністю поліморфізму гена *VEGFA* та спайковим процесом є зворотний зв'язок, який свідчить про те, що мутантний алель *G-634 VEGFA* може відігравати протективну роль і запобігати спайкоутворенню.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Retrospective analysis, current state and challenges of endoscopic and miniinvasive surgery in the Odessa national medical university* // V. M. Zaporozhan, I. Z. Gladchuk, N. M. Rozhkovska [et al.] // *Одеський медичний журнал*. — 2012. — № 5. — С. 8–12.

2. *Чекмазов И. А. Спаечная болезнь брюшины* / И. А. Чекмазов. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 160 с.

3. *Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions* / M. W. Laschke, A. Elitzsch, B. Vollmar [et al.] // *Human Reproduction*. — 2006. — Vol. 21, N 1. — P. 262–268.

4. *Кадурина Т. И. Наследственные коллагенопатии (клиника, диагностика, лечение и диспансеризация)* / Т. И. Кадурина. — СПб. : Невский диалект, 2000. — 321 с.

5. *Saed G. M. Molecular characterization of postoperative adhesions: the adhesion pheno-type* / G. M. Saed, M. P. Diamond // *J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc.* — 2004. — Vol. 11, N 3. — P. 307–314.

6. *Про організацію амбулаторної акушерсько-гінекологічної допомоги в Україні* : Наказ МОЗ України № 417 від 15.07.2011 р. — К., 2011.

7. *Запорожан В. М. Оперативна гінекологія* / В. М. Запорожан. — Одеса : ОДМУ, 2006. — С. 120–134.

8. *Dellaporta S. L. A Plant DNA Mini Preparation: Version II* / S. L. Dellaporta, J. Wood, J. B. Hicks // *Plant. Mol. Biol. Rep.* — 1983. — Vol. 1. — P. 19–21.

9. *Статистические методы анализа в клинической практике. Часть I. Одномерный статистический анализ* / П. О. Румянцев, В. А. Саенко, У. В. Румянцев, С. Ю. Чекин // *Проблемы эндокринологии*. — 2009. — Т. 55, № 5. — С. 48–55.

10. *Статистические методы анализа в клинической практике. Часть II. Анализ выживаемости и многомерная статистика* / П. О. Румянцев, В. А. Саенко, У. В. Румянцев, С. Ю. Чекин // *Проблемы эндокринологии*. — 2009. — Т. 55, № 6. — С. 48–56.

11. *R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing* [Electronic resource]. — Vienna, Austria, 2014. — Access mode : <http://www.r-project.org>.

12. *GeneMANIA prediction server 2013 update* [Electronic resource] / K. Zuberi, M. Franz, H. Rodriguez [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 2013. — Vol. 41. — Access mode : <http://www.genemania.org>.

REFERENCES

1. Zaporozhan V.M., Gladchuk I.Z., Rozhkovska N.M., Marichereda V.G., Volyanska A.G. *Retrospective analysis, current state and challenges of endoscopic and miniinvasive surgery in the Odessa national medical university. Odeskii medychnyy zhurnal* 2012; 5: 8-12.

2. Chekmazov I.A. *Spaechnaya bolezni briushini* [Adhesive disease of the peritoneum]. Moscow, GEOTAR-Media; 2008. 160 p.

3. Laschke M.W., Elitzsch A., Vollmar B., Vajkoczy P. *Menger Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. Human Reproduction* 2006; 21 (1): 262-268.

4. Kadurina T.I. *Nasledstvenniye kollagenopatii* (klinika, diagnostika, lechenie i dispanserizatsiya) [Hereditary collagenopathy (clinic, diagnostics, treatment and health survey)]. SPb, Nevskiy dialect; 2000. 321 p.

5. Saed G.M., Diamond M.P. *Molecular characterization of postoperative adhesions: the adhesion pheno-type. J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2004; 11 (3): 307-314.

6. *Pro organizatsiyu ambulatornoi akushersko-ginekologichnoi dopomogy v Ukraini. Nakaz MOZ Ukraine* N417, 15.07.2011.

7. Zaporozhan V.M. *Operativna gynecologiya* [Operative gynecology]. Odessa, the Odessa State Medical University, 2006: 120-134.

8. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. *A Plant DNA Mini Preparation: Version II. Plant Mol. Biol. Rep.* 1983; 1: 19-21.

9. Rumyantsev P.O., Saenko V.A., Rumyantsev Yu.V., Chekin S.Yu. *Statistical methods of analysis in clinical practice. Part of I. Unidimensional statistical analysis. Problemy endocrinologii* 2009; 55 (5): 48-55.

10. Rumyantsev P.O., Saenko V.A., Rumyantsev Yu.V., Chekin S.Yu. *Statistical methods of analysis are in clinical practice. Part of II. Analysis of survivability and multidimensional statistics. Problemy endocrinologii* 2009; 55 (6): 48-56.

11. R Development Core Team. *R: a language and environment for statistical computing* [Online]. Vienna, Austria, 2014. URL: <http://www.r-project.org>.

12. Zuberi K., Franz M., Rodriguez H. et al. *GeneMANIA prediction server 2013 update* [Electronic resource] *Nucleic Acids Res* 2013; 41. Access mode : <http://www.genemania.org>.

Надійшла 12.05.2015
Рецензент д-р мед. наук,
проф. Ю. І. Бажора

