

УДК 616.36-004:616.12]:616.15+575

© Присяжнюк В.П., Волошин О.І., Сидорчук Л.П., 2011

ОСОБЛИВОСТІ ОКРЕМИХ КЛІНІЧНО-ЛАБОРАТОРНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ ТА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПАРАМЕТРІВ СЕРЦЯ У ХВОРИХ НА ЦИРОЗ ПЕЧІНКИ НЕВІРУСНОГО ПОХОДЖЕННЯ ЗАЛЕЖНО ВІД Т894G ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ СИНТАЗИ ОКСИДА АЗОТУ Присяжнюк В.П., Волошин О.І., Сидорчук Л.П.

Буковинський державний медичний університет

Вступ. Порушення функціонування ендотелію судин відіграє важливу роль у розвитку серцево-судинних захворювань [6, 9], виникненні цирозу печінки (ЦП) та прогресуванні його ускладнень, зокрема, портальної гіпертензії [10]. Ендотеліальна синтаза оксиду азоту (eNOS) продукує оксид азоту (NO) відіграє ключову роль у регуляції судинного тонуусу, знешкоджує супероксид аніон-радикали, пригнічує агрегацію тромбоцитів, адгезію лейкоцитів та проліферацію клітин гладких м'язових волокон [8]. Незважаючи на дослідження впливу eNOS на розвиток різноманітних серцево-судинних захворювань, зв'язок поліморфізму гена та патології печінки вивчений недостатньо. Встановлено, що у хворих на ЦП, який ускладнений портальною гіпертензією спостерігається зниження активності eNOS, внаслідок чого виникає зниження кровотоку у внутрішньопечінкових судинах [4, 5]. Актуальним і маловивченим є вплив генних мутацій, зокрема, мутації гену eNOS на розвиток серцево-судинних захворювань у хворих на ЦП. Детальне та поглиблене вивчення окреслених питань створить передумови для оптимізації терапевтичних схем лікування зазначеного контингенту хворих.

Таблиця 1. Послідовність олігонуклеотидів у праймерах, які були використані для полімеразної ланцюгової реакції при ідентифікації поліморфізму Т894G гена eNOS

| Назва гена | Локалізація гена на хромосомі | Праймер | Послідовність олігонуклеотидів у праймерах | Розмір продукту ампліфікації пар нуклеотидів |
|------------|-------------------------------|-----------|--|--|
| eNOS | 7 q 36.1 | Прямий | 5'-ATGAAGGCAGGAGACAGT GGATGG -3' | 250 |
| | | Зворотний | 5'-CCAGTCAATCCCTTTGGT GCTCA -3' | |

З метою дискримінації алелей гена eNOS використали ендонуклеазу рестрикції *Ban* II (*Eco*241) "Fermentas®" (США). Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 3% агарозному гелі в присутності трис-боратного буфера (ТББ) концентрованого з бромідом етидію. Фрагменти візуалізували за допомогою УФ-випромінювача в присутності маркера молекулярних мас 100-1000 bp ("СибЭнзим", Росія). Електрофореграму продуктів ампліфікації наведено на рисунку 1. За геном eNOS при наявності в положенні 894 7-го екзону гуанідину, ампліфікат, який містив 250 пар нуклеотидів, розщеплювався рестриктазою *Ban* II (*Eco* 241) на два фрагменти 90 і 160 пн. У випадку заміни G894→T сайт рестрикції для *Ban* II втрачався.

Підбір секвенсів праймерів та ПЛР-аналіз проводили за загальноприйнятими у світовій практиці методиками [3, 7] та у відповідності до вітчизняних вимог: Наказу МОЗ України та АМН України від 31.12.2003 №641/84 "Про удосконалення медико-генетичної допомоги в Україні" [2] та постанови Головного державного санітарного лікаря України від 9.07.2003 №24 [1].

Мета роботи. Дослідити можливий зв'язок поліморфізму гену ендотеліальної синтази оксиду азоту (NO) із біохімічними, цитокиновими показниками крові та структурно-функціональними параметрами серця у хворих на ЦП невірусного походження.

Матеріал і методи. Проведено дослідження поліморфізму гена eNOS (Т894G) у хворих на ЦП невірусного походження та практично здорових волонтерів. Кров брали вранці, натще із літкової вени у 1-ий – 2-ий день перебування в стаціонарі до призначення лікування. В якості антикоагулянту використовували 5% розчин етилендіамінтетраацетату натрієвої солі.

Для вивчення алелей поліморфних ділянок Т894G у гені eNOS виділяли геномну ДНК з лейкоцитів периферійної крові із подальшою ампліфікацією поліморфної ділянки за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) на програмованому ампліфікаторі "Amplify-4L" ("Biokom", Росія), із індивідуальною температурною програмою для праймерів досліджуваного гена. Розраховані позиції праймерів на хромосомі та послідовність олігонуклеотидів у них наведені в таблиці 1.

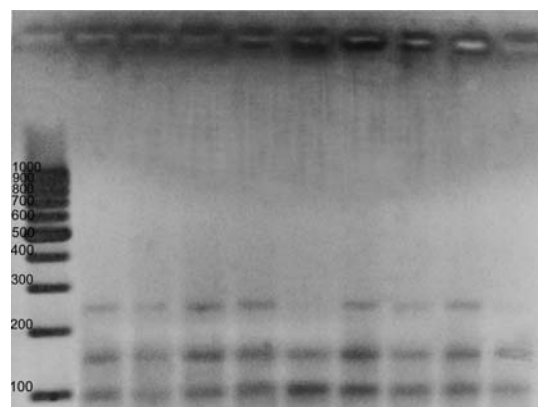


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації.

Результати та їх обговорення. Досліджено поліморфізм гена ендотеліальної синтази оксиду азоту (NO) у 50 хворих на цироз печінки невірусного походження та 10 практично здорових осіб (контрольна група). Розподіл генотипів поліморфізму гена наведений у таблиці 2.

Таблиця 2. Розподіл T894G поліморфізму гена eNOS у хворих на цироз печінки невірусного походження та практично здорових осіб

| Генотипи гена eNOS, n (%) | Хворі на цироз печінки (n = 50) | | Практично здорові особи (n = 10) | |
|---------------------------|---------------------------------|------|----------------------------------|-------|
| | Абсолютна кількість, n | % | Абсолютна кількість, n | % |
| TT | 2 | 4,0 | 0 | 0,0% |
| TG | 32 | 64,0 | 7 | 70,0% |
| GG | 16 | 32,0 | 3 | 30,0% |

Серед хворих на цироз печінки носіїв TT генотипу було 2 (4,0%), TG – 32 (64,0%), GG – 16 (32,0%); носіїв T-алеля – 18 осіб (36,0%), G-алеля – 32 особи (64,0%). У групі практично здорових гомозиготних носіїв T-алеля не виявили, 70,0% обстежених осіб цієї групи були гетерозиготами, 30% – гомозиготними носіями G-алеля, що вірогідно не відрізнялось від розподілу генотипів серед хворих на ЦП.

Показники біохімічного аналізу крові хворих на ЦП залежно від T894G поліморфізму гена eNOS

наведено у таблиці 3. У зв'язку з тим, що кількість носіїв несприятливого TT-генотипу була обмежена (n=2), вважали за необхідне аналізувати показники за наявності патологічного T-алеля. У пацієнтів із T-алелем активність АсАТ була достовірно вища на 27,4% (p<0,05), ніж у хворих із GG-генотипом. Також у пацієнтів із T-алелем виявлено достовірно більший вміст сечовини на 33,3% (p<0,05) та креатиніну на 22,2% (p<0,05), ніж у хворих із GG-генотипом. За рештою біохімічних показників крові відмінності між генотипами не спостерігали.

Таблиця 3. Біохімічні показники крові у пацієнтів із цирозом печінки залежно від T894G поліморфізму гена eNOS

| Показник | Контрольна група, n = 10 | Хворі на ЦП, n = 50 | |
|----------------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|
| | | Носії T-алеля, n = 34 | Носії GG-генотипу, n = 16 |
| Глюкоза, ммоль/л | 5,00±0,22 | 5,25±0,22 | 5,44±0,38 |
| Білірубін загальний, мкмоль/л | 12,38±2,89 | 50,80±9,58** | 54,62±8,51** |
| Білірубін прямий, мкмоль/л | 4,90±0,54 | 14,30±2,90*** | 15,56±2,43*** |
| Холестерин, ммоль/л | 4,51±0,24 | 4,13±0,39 | 3,75±0,23*** |
| Тригліцериди, ммоль/л | 1,44±0,18 | 1,29±0,18 | 1,11±0,10*** |
| Альбумін, г/л | 43,43±1,36 | 32,26±1,45** | 34,56±1,81** |
| Загальний білок, г/л | 68,67±1,02 | 69,39±1,35 | 69,40±1,32 |
| Сечовина, ммоль/л | 5,13±0,43 | 6,65±0,64**** | 4,99±0,37 |
| Креатинін, мкмоль/л | 89,20±2,96 | 99,74±9,48**** | 81,63±6,57 |
| Аспаратамінотрансфераза, ОД/л | 18,00±0,90 | 74,48±8,96**** | 58,44±4,68* |
| Аланінамінотрансфераза, ОД/л | 21,17±2,57 | 43,16±5,00** | 38,31±5,46*** |
| Лактатдегідрогеназа (заг.), ОД/л | 273,33±25,05 | 430,78±27,28*** | 401,88±32,11*** |
| Лужна фосфатаза, ОД/л | 62,29±5,75 | 129,88±8,71** | 108,69±7,30*** |
| Гамаглутамілтрансептидаза, ОД/л | 29,57±6,13 | 126,00±27,61** | 110,94±25,45** |

Примітка: * - достовірність відмінностей (p<0,001) порівняно із показниками у групі практично здорових людей; ** - достовірність відмінностей (p<0,01) порівняно із показниками у групі практично здорових людей; *** - достовірність відмінностей (p<0,05) порівняно із показниками у групі практично здорових людей; **** - достовірність відмінностей (p<0,05) порівняно із показниками у групі хворих із GG-генотипом.

У пацієнтів із T-алелем достовірно вищою була концентрація pгоANP у плазмі крові на 89,2% (p<0,05) порівняно із вмістом цитокіну у хворих на ЦП носіїв GG-генотипу, що асоціювалось із тяжчим перебігом серцево-судинної па-

тології, скаргами на загродинний біль, неприємні відчуття у ділянці серця та задишку, у окремих пацієнтів розвитком серцевої недостатності 2А-2В стадії та набрякового синдрому (таблиця 4).

Таблиця 4. Показники цитокінового профілю у пацієнтів із цирозом печінки залежно від T894G поліморфізму гена eNOS

| Показник | Контрольна група, n = 10 | Хворі на ЦП, n = 50 | |
|--|--------------------------|-----------------------|---------------------------|
| | | Носії T-алеля, n = 34 | Носії GG-генотипу, n = 16 |
| Інтерлейкін 4, пг/мл | 1,85±0,17 | 0,84±0,14 | 0,76±0,14 |
| Фактор некрозу пухлин-α, пг/мл | 32,82±2,40 | 62,41±7,00** | 70,49±10,08*** |
| Трансформуючий фактор росту-β ₁ , пг/мл | 323,18±83,94 | 406,29±47,73 | 477,85±82,10 |
| Передсердний натрійуретичний пропептид, нмоль/л | 0,32±0,04 | 2,27±0,34**** | 1,20±0,15* |

Примітка: * - достовірність відмінностей (p<0,001) порівняно із показниками у групі практично здорових людей; ** - достовірність відмінностей (p<0,01) порівняно із показниками у групі практично здорових людей; *** - достовірність відмінностей (p<0,05) порівняно із показниками у групі практично здорових людей; **** - достовірність відмінностей (p<0,05) порівняно із показниками у групі хворих із GG-генотипом.

Частота серцевих скорочень, систолічний та діастолічний артеріальний тиск між носіями генотипів гена eNOS достовірно не відрізнялись (таблиця 5). Відзначимо лише схильність до тахікардії у хворих на ЦП порівняно із практично здоровими особами.

Структурно-функціональні показники серця у пацієнтів із ЦП залежно від T894G поліморфізму гена eNOS наведено у таблиці 6.

У пацієнтів із ЦП носіїв T-алеля встановили достовірне збільшення лівого передсердя на 13,6% (p<0,01) порівняно із хворими на ЦП із GG-

генотипом. Також у носіїв Т-алеля була більшою ММЛШ на 19,5% ($p < 0,01$) та ІММЛШ у чоловіків на 12,2% ($p < 0,05$), ніж у хворих на ЦП із GG-генотипом. У хворих на ЦП із Т-алелем частіше зустрічали деформацію стулок аортального клапа-

ну порівняно із пацієнтами із GG-генотипом (57,0% проти 33,0% відповідно). Також, у пацієнтів із Т-алелем у 64,0% випадків виявили ушкодження стулок мітрального клапану, проти, 33,0% – у носіїв GG-генотипу гена eNOS.

Таблиця 5. Показники частоти серцевих скорочень, систолічного та діастолічного артеріального тиску залежно від T894G поліморфізму гена eNOS

| Показник | Контрольна група, n = 10 | Хворі на ЦП, n = 50 | |
|--------------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|
| | | Носії Т-алеля, n = 34 | Носії GG-генотипу, n = 16 |
| Частота серцевих скорочень | 72,29±0,52 | 84,50±1,64* | 84,00±3,41** |
| Систолічний артеріальний тиск | 123,57±1,80 | 123,38±2,45 | 122,19±3,56 |
| Діастолічний артеріальний тиск | 77,14±1,84 | 77,94±1,25 | 73,75±1,80 |

Примітка: * - достовірність відмінностей ($p < 0,001$) порівняно із показниками у групі практично здорових людей; ** - достовірність відмінностей ($p < 0,01$) порівняно із показниками у групі практично здорових людей

Таблиця 6. Структурно-функціональні показники серцево-судинної системи у пацієнтів із цирозом печінки залежно від T894G поліморфізму гена eNOS

| Показник | Контрольна група, n = 10 | Хворі на ЦП, n = 50 | |
|---|--------------------------|-----------------------|---------------------------|
| | | Носії Т-алеля, n = 34 | Носії GG-генотипу, n = 16 |
| Аорта (см) | 3,39±0,12 | 3,44±0,10 | 3,57±0,17 |
| Ліве передсердя (діаметр) (см) | 3,92±0,14 | 4,52±0,09 */*** | 3,98±0,08 |
| Кінцевий діастолічний розмір (см) | 5,26±0,12 | 5,48±0,15 | 5,12±0,21 |
| Кінцевий систолічний розмір (см) | 3,41±0,09 | 3,63±0,11** | 3,50±0,19 |
| Кінцевий діастолічний об'єм (мл) | 133,14±7,03 | 147,60±8,90 | 125,83±11,04 |
| Кінцевий систолічний об'єм (мл) | 51,71±3,34 | 56,27±4,04 | 51,67±6,52 |
| Товщина задньої стінки лівого шлуночка в діастолу (см) | 1,07±0,06 | 1,24±0,02** | 1,21±0,04** |
| Товщина задньої стінки лівого шлуночка в систолу (см) | 1,54±0,08 | 1,64±0,04 | 1,72±0,05 |
| Товщина міжшлуночкової перетинки в діастолу (см) | 1,11±0,06 | 1,26±0,04** | 1,22±0,04** |
| Товщина міжшлуночкової перетинки в систолу (см) | 1,25±0,04 | 1,39±0,04** | 1,33±0,06** |
| Правий шлуночок (см) | 2,11±0,04 | 2,35±0,07** | 2,31±0,14** |
| Фракція викиду (%) | 63,33±0,40 | 60,21±1,06** | 60,60±1,17** |
| Маса міокарда лівого шлуночка (мг) | 213,94±20,94 | 302,86±20,57 */*** | 253,40±21,58 ** |
| Індекс маси міокарда лівого шлуночка (мг/м ²) | (чол.) | 123,81±12,00 | 155,33±11,41 **/** |
| | (жін.) | 103,97±10,08 | 135,79±8,79 ** |
| Відносна товщина стінок лівого шлуночка | 0,42±0,02 | 0,45±0,01 | 0,47±0,02 |

Примітка: * - достовірність відмінностей ($p < 0,01$) порівняно із показниками у групі практично здорових людей; ** - достовірність відмінностей ($p < 0,05$) порівняно із показниками у групі практично здорових людей; *** - достовірність відмінностей ($p < 0,05$) порівняно із показниками у групі хворих із GG-генотипом.

Висновки. 1. Наявність Т-алеля гена eNOS у хворих на цироз печінки асоціюється зі зростанням активності аспаратамінотрансферази, вищим вмістом передсердного натрійуретичного прогормону, більшим розміром лівого передсердя, збільшенням маси міокарда лівого шлуночка. У пацієнтів із цирозом печінки чоловічої статі носійство Т-алеля також поєднувалось із зростанням індексу маси міокарда лівого шлуночка порівняно із хворими із GG-генотипом.

2. У обстежених хворих із Т-алелем частіше зустрічалася деформація стулок аортального та мітрального клапанів ніж у носіїв GG-генотипу.

Перспективу подальших досліджень вбачаємо у поглибленні досліджень зв'язку гену eNOS із активністю фіброзуючих, холестеричних та цитолітичних процесів у печінці хворих на ЦП та застосуванні результатів таких досліджень для оптимізації терапевтичних схем лікування зазначеного контингенту хворих.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Застосування полімеразної ланцюгової реакції для виявлення збудників захворювань людини: Ме-

тодичні вказівки. Видання офіційне / МОЗ України, Головне санепідуправління. – К.: МОЗ, 2003. – 33 с.

2. Наказ МОЗ України та АМН України №641/84 від 31.12.2003 "Про удосконалення медико-генетичної допомоги в Україні" / МОЗ. – К. : МОЗ, 2004. – 2 с. – (Нормативний документ МОЗ України)
3. Cardiac gene expression: methods and protocols / [ed. by Jun Zhang and Gregg Rokosh]. – New Jersey: Humana Press Inc. & Totowa. – 2007. – 365 p.
4. Deleterious effects of silymarin on the expression of genes controlling eNOS activity in carbon tetrachloride-treated rat livers / Y.K. Cho, J.W. Yun, J.H. Park [et al.] // Life Science. – 2009. – № 7-8. – P. 281–290.
5. Increased gene and protein expression of the novel eNOS regulatory protein NOSTRIN and a variant in alcoholic hepatitis / R.P. Mookerjee, A. Wiesenthal, A. Icking [et al.] // Gastroenterology. – 2007. – № 7. – P. 2533–2541.
6. Iwakiri Y. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule / Y. Iwakiri, R.J. Groszmann // Hepatology. – 2006. – Vol. 43. – P. 121–131.
7. NCI-NHGRI Working Group on Replication in Association Studies. Replicating genotype-phenotype associations: what constitutes replication of a genotype-phenotype association, and how best can it be achieved? / NCI-NHGRI Working Group // Nature (Lond). – 2007. – Vol. 447. – P. 655–660.
8. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury / L. Phillips, A.H. Toledo, F. Lopez-Neblina [et. al] // J Invest Surg. – 2009. – Vol. 22. – P. 46–55.
9. Polymorphisms in the paraoxonase and eNOS genes and the risk of early-onset myocardial infarction / B. Morray, I. Goldenberg, A.J. Moss [et. al] // American Journal of Cardiology. – 2007. – Vol. 99. – P. 1100–1105.
10. Yuan G.-J. Expression and activity of inducible nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase correlate with ethanol-induced liver injury / G.-J. Yuan, X.-R. Zhou, Z.-J. Gong // World Journal of Gastroenterology. – 2006. – Vol. 12. – P. 2375–2381.

Присяжнюк В.П., Волошин О.І., Сидорчук Л.П. Особливості окремих клінічно-лабораторних показників крові та структурно-функціональних параметрів серця у хворих на цироз печінки невірусного походження залежно від t894g поліморфізму гена ендотеліальної синтази оксиду азоту // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 2. – С. 151-154.

Вивчено зв'язок поліморфізму гена ендотеліальної синтази оксиду азоту із окремими біохімічними та цитокіновими показниками крові, а також структурно-функціональними параметрами серцево-судинної системи у хворих на цироз печінки невірусного походження. Встановлено, що наявність T-алеля гена eNOS у пацієнтів із цирозом печінки асоціюється із зростанням активності аспаратамінотрансферази, збільшенням вмісту передсердного натрійуретичного пропептиду, більшим розміром лівого передсердя, збільшенням маси міокарда лівого шлуночка. У пацієнтів із цирозом печінки чоловічої статі носійство T-алеля також поєднувалось із зростанням індексу маси міокарда лівого шлуночка порівняно із хворими із GG-генотипом.

Ключові слова: цироз печінки, ген ендотеліальної синтази оксиду азоту

Присяжнюк В.П., Волошин О.І., Сидорчук Л.П. Особенности отдельных клинико-лабораторных показателей крови и структурно-функциональных параметров сердца у больных циррозом печени невирусного происхождения в зависимости от t894g полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксид азота // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 2. – С. 151-154.

Изучена связь полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксид азота с отдельными биохимическими и цитокиновыми показателями крови, а также структурно-функциональными параметрами сердечно-сосудистой системы у больных циррозом печени невирусного происхождения. Установлено, что наличие T-аллеля гена eNOS у пациентов с циррозом печени ассоциируется с ростом активности аспаратаминотрансферазы, увеличением содержания предсердного натрийуретического прогормона и большим размером левого предсердия, увеличением массы миокарда левого желудочка. У пациентов с циррозом печени мужского пола носительство T-аллеля также сочеталось с ростом индекса массы миокарда левого желудочка по сравнению с больными с GG-генотипом.

Ключевые слова: цирроз печени, ген эндотелиальной синтазы оксид азота

Prysyazhnyuk V.P., Voloshyn O.I., Sydorчук L.P. Association of some laboratory blood parameters, structural and functional parameters of heart in patients with nonviral liver cirrhosis with t894g polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 2. – С. 151-154.

The association of gene polymorphism of endothelial nitric oxide synthase with biochemical blood parameters, cytokines, as well as structural and functional parameters of cardiovascular system in patients with nonviral liver cirrhosis was observed. Established that the presence of T-allele gene of eNOS in patients with liver cirrhosis was associated with increased activity of aspartataminotransferase, increased content of proANP and larger diameter of left atrium, increased left ventricular mass. In males with liver cirrhosis T-allele also combined with the increased left ventricular mass index compared with the patients with GG-genotype.

Key words: liver cirrhosis, endothelial nitric oxide synthase gene

Надійшла 14.01.2011 р.

Рецензент: проф. В.В.Флегонова