



# АНАЛІЗ А1267G ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА HSP70-2 В СТРУКТУРІ ХВОРИХ НА ВУЛЬОВОАГІНІТИ ДІВЧАТ-ПІДЛІТКІВ

О.І. Боднарюк, О.А. Андрієць, О.В. Бочкарьова  
ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці

## Резюме

Стаття присвячена проблемі підвищення ефективності діагностики вульвовагінітів у дівчат. Висвітлено результати комплексного дослідження розвитку вульвовагініту, що включало дані стану системного та локального імунітету, цитокінового профілю. Проведено аналіз А1267G поліморфізму гена HSP70-2 у структурі хворих на вульвовагініти дівчат і встановлено його вплив на продукцію про- і протизапальних цитокінів.

## Ключові слова

Вульвовагініт, дівчата-підлітки, поліморфізму гена HSP70-2.

З огляду на те, що в Україні понад 3 млн жінок віком 20-27 років і лише близько 2,5 млн дівчат віком 10-17 років, стає зрозумілим, що охорона репродуктивного здоров'я кожної дівчинки як майбутньої матері є одним із пріоритетних завдань сучасної вітчизняної гінекології [20, 61]. У США запальні захворювання органів малого таза (ЗЗОМТ) є причиною 2,5 млн візитів до лікаря, 200 тис. госпіталізацій та 100 тис. хірургічних втручань [1-3]. За даними МОЗ України, запальні захворювання жіночої статеві системи становлять 60-65% від усіх гінекологічних захворювань. Виникаючи переважно в молодому віці, вульвовагініти часто перебігають у стертих, атипичній формі, унаслідок чого розвивається хронічний запальний процес [1, 3].

Серйозною проблемою в дівчат-підлітків залишаються запальні процеси статевих органів,

широке поширення яких у світі вивело їх у ранг актуальних проблем акушерства і гінекології, що призводять до порушення функцій багатьох органів і систем жіночого організму [3-5]. Лібералізація статевих відносин серед молоді при недостатньому рівні статевої культури — одна з причин поширення трансмісивних інфекцій, які зумовлюють різні порушення репродуктивного здоров'я [3, 5].

Вивченню імунологічного статусу у хворих на вульвовагініт присвячено багато праць, однак дотепер немає єдиної думки про характер патологічних змін. Останніми роками доведено участь медіаторів запалення в розвитку вульвовагініту. При хронічному вульвовагініті встановлено підвищення концентрації sIgA, що опосередковано вказує на формування гуморальних механізмів імунної відповіді. Слід враховувати, що формування гуморальної імунної відповіді продукує

резистентність із протизапальними властивостями, зокрема IL-10, який впливає на фактори транскрипції, призводить до лімітування генів, відповідальних не тільки за синтез IL-1 $\beta$ , але й IL-6, -8, які є предикторами тяжкості захворювання. Особлива роль у формуванні імунної відповіді на бактеріальні і вірусні збудники належить фактору некрозу пухлин альфа (ФНП- $\alpha$ ), який стимулює фагоцитарну і цитотоксичну активність нейтрофілів і моноцитів/макрофагів, регулює механізми імунного запалення та сприяє утилізації деструктивного матеріалу в організмі. Підвищена продукція ФНП- $\alpha$  є ознакою посилення активації запального інфекційного процесу при його трансформації з латентного стану у фазу клінічної маніфестації, що є свідченням прогресування захворювання.

При дії на клітину пошкоджуючих чинників (зміна температури, гіпоксія, хімічні чинники, інфікування вірусом тощо) відбувається інтенсифікація синтезу білків теплового шоку (HSP, від Heat Shock Proteins; по-іншому, білки стресу). Це може захистити клітину від пошкоджень і запобігти їй загибелі. Найбільш поширені HSP із Mw 70 000 (HSP70) та 90 000 (HSP90) [4-6].

Механізм дії цих білків різноманітний і полягає в регуляції складання, згортання і розгортання інших білків. Таким чином, білки стресу запобігають накопиченню в клітині білкових агрегатів. Прикладом підвищеної резистентності, зумовленої білками теплового шоку, можуть служити пухлинні клітини, які експресують підвищений рівень HSP70, що захищає їх від пошкодження і загибелі [1, 4, 6].

Оскільки поліморфізми генів HSP70 відіграють важливу роль у роботі імунної системи і можуть бути однією з важливих причин генетично зумовленої дисрегуляції запальної відповіді, вважали за необхідне провести аналіз A1267G поліморфізму гена HSP70-2 (id.: rs1061581) се-

ред хворих на вульвовагініти дівчат-підлітків та встановити ймовірність його впливу на продукцію про- і протизапальних цитокінів. Незважаючи на велику кількість досліджень, на сьогодні відсутні відомості участі генів HSP70 у патогенезі запальних захворювань органів малого таза в дівчат-підлітків.

**Мета роботи** — провести аналіз A1267G поліморфізму гена HSP70-2 (id.: rs1061581) у структурі хворих на вульвовагініти дівчат-підлітків та встановити ймовірність його впливу на продукцію про- і протизапальних цитокінів.

## Матеріали та методи

За згодою батьків нами обстежено 194 дівчинки, яких відповідно до програми дослідження було розподілено на групи: до I (основної) увійшло 162 дівчинки, які хворіють на вульвовагініт (базову терапію отримало 59 осіб; розроблений нами комплекс лікувальних заходів — 79 осіб); до II (контрольної) — 32 практично здорових дівчинки.

Для попередньої верифікації діагнозу було проведено клінічні, лабораторні, інструментальні (ультразвукова оцінка органів малого таза) методи дослідження та швидкі тести рН-метрії піхвового вмісту.

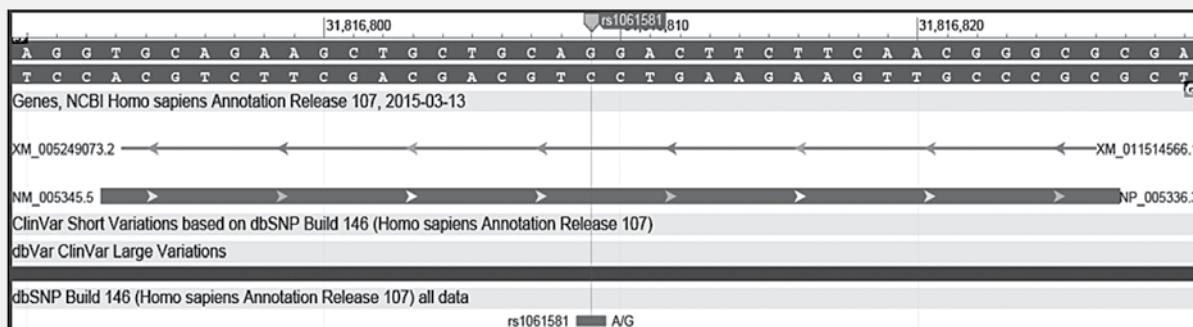
Для вивчення A $\rightarrow$ G поліморфізму в положенні 1267 на короткому плечі 6-ї хромосоми гена HSP70-2 (rs1061581) — див. рис. 1, застосували молекулярно-генетичні методи: виділення ДНК із лейкоцитів периферійної крові, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) із наступним аналізом довжин рестрикційних фрагментів, горизонтальний електрофорез.

Електрофореграму продуктів ампліфікації аналізованого гена наведено на рис. 2, 3.

Вміст IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 визначали за допомогою імуноферментного аналізу в плазмі

### Рисунок 1

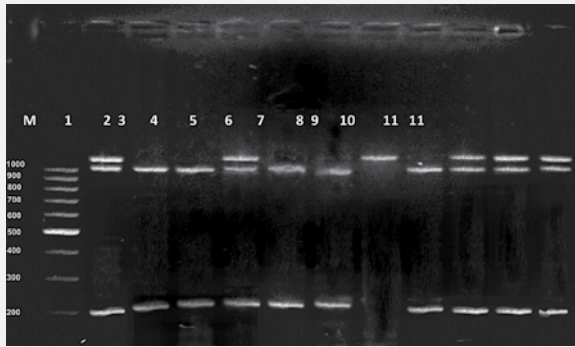
Локалізація гена HSP70-2 в 6-й хромосомі





### Рисунок 2

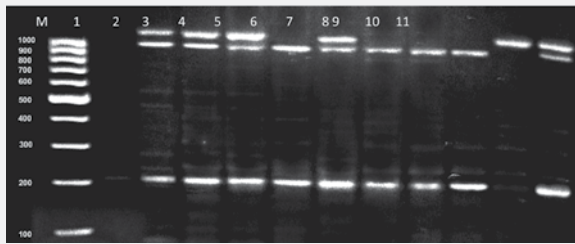
Електрофореграма продуктів електрофоретичного розподілу ампліфікованих фрагментів гена HSP70-2



Примітки: М — маркер молекулярних мас (1000-100 пн); 1, 4, 9-11-а доріжки — АG-генотип; 7-а доріжка — АА-генотип; 2, 3, 5, 6, 8-а доріжки — GG-генотип.

### Рисунок 3

Електрофореграма продуктів електрофоретичного розподілу ампліфікованих фрагментів гена HSP70-2



Примітки: М — маркер молекулярних мас (1000-100 пн); 1-й зразок — негативний контроль; 2-4, 6, 11-а доріжки — АG-генотип; 5, 7-9-а доріжки — GG-генотип; 10-а доріжка — АА-генотип.

крові та sIgA в піховому вмісті хворих і практично здорових пацієнтів.

Для опрацювання отриманих результатів дослідження використовувались математично-статистичні методи та стандартні методи варіаційної статистики. Відповідність розподілу генотипів 1267 А→G поліморфізму гена HSP70-2 до закону Харді — Вайнберга в групах дослідження перевіряли за допомогою тесту хі-квадрат із 1-м ступенем свободи, без використання корекції Йетса.

Дослідження проводили на базі центральної науково-дослідної лабораторії (підрозділ молекулярно-генетичних досліджень) Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет».

### Результати та їх обговорення

За результатами проведеного дослідження було встановлено, що частота дикого G-алеля в дівчат-підлітків дослідної та контрольної груп

є на 44,28 і 50,0% більшою, ніж «мінорного» А-алеля гена HSP70-2 ( $p < 0,001$ ). Відносна частота G- та А-алелей у практично здорових дівчат та хворих на вульвовагініти статистично значуще не відрізнялась.

Розподіл генотипів поліморфізму аналізованого гена загалом відповідає очікуваному за рівновагою Харді — Вайнберга, що супроводжується надлишком гетерозиготності з негативним коефіцієнтом інбридингу на тлі відсутньої статистично значущої різниці між показниками очікуваної та фактичної гетерозиготності ( $p > 0,05$ ).

Аналіз ко-домінантної моделі успадкування засвідчив вірогідну перевагу частоти АG- та GG-генотипів гена HSP70-2 в осіб дослідної групи над АА-генотипом у 17,5 і 16,5 рази ( $\chi^2 = 40,01$  і  $\chi^2 = 36,61$ ,  $p < 0,001$ ), без суттєвих відмінностей у частоті зустрічання проміжного генотипу і диких гомозигот як серед хворих, так і в контролі ( $p > 0,05$ ). Інформаційний критерій Айкайке (AIC) для даної моделі становить 14,39. Частоти генотипів 1267 А→G поліморфізму гена HSP70-2 в дівчат із вульвовагінітами та практично здорових вірогідно не відрізнялись.

Серед домінантної, рецесивної, наддомінантної та адитивної моделей успадкування ми вибрали найкращу (найдієвішу) з найнижчим інформаційним критерієм Айкайке (AIC). Такою стала рецесивна модель, для якої інформаційний критерій Айкайке становив 12,4. Отримані дані засвідчують, що вульвовагініти в дівчат успадковуються як рецесивна ознака, яка фенотипово (клінічно) здатна проявитись тільки за певних сприятливих для цього умов.

Для вивчення впливу 1267 А→G поліморфізму гена HSP70-2 на продукцію про- та протизапальних цитокінів виконали аналіз вмісту IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 у плазмі крові та sIgA в піховому вмісті хворих і практично здорових, у т.ч. залежно від генотипів аналізованого гена, вміст цитокінів вважали низьким (нижній квартиль дослідної групи) за: IL-1 $\beta$   $\leq 6,4$  пг/мл, TNF $\alpha$   $\leq 6,6$  пг/мл, IL-10  $\leq 5,17$  пг/мл і sIgA  $\leq 1,0$  нг/мл відповідно. Висока концентрація цитокінів (третій квартиль дослідної групи): IL-1 $\beta$   $\geq 7,98$  пг/мл, TNF $\alpha$   $\geq 7,40$ , IL-10  $\geq 6,1$  пг/мл і IL-13 sIgA  $\geq 5,3$  нг/мл відповідно. У хворих на вульвовагініти переважала середня та висока продукція прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$  і TNF $\alpha$ ) у 2,89 рази ( $\chi^2 = 33,03$ ,  $p < 0,001$ ), що свідчить про підвищену активність Т-лімфоцитів хелперів 1-го типу (Th1) та макрофагів. У свою чергу, TNF $\alpha$  і IL-1 $\beta$  є факторами активації, росту і дозрівання

T- і В-лімфоцитів, НК-клітин, фібробластів, клітин ендотелію; IL-1 $\beta$  взаємодіє з Th2 та індукує синтез IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IF- $\gamma$ , експресію рецепторів IL-2, підвищує секрецію антитіл В-лімфоцитами, викликає хемотаксис макрофагів, нейтрофілів, сприяє їх міграції через ендотелій судин у вогнище запалення, де активує синтез цитокінів, простагландинів, колагену і фібронектину, білків гострої фази (С-реактивного тощо), виявляє пірогенну дію. При цьому ми встановили компенсаторне підвищення альтернативними шляхами вмісту протизапального IL-10 на 22,01% ( $p < 0,001$ ). IL-10 відомий як інгібітор активності Th1-клітин, сприяє розвитку гуморальної відповіді, стимулює В-лімфоцити, тучні клітини, інгібує клітинну імунну відповідь, зменшує проліферацію Т-клітин і продукцію прозапальних цитокінів. Кількість осіб із високою та середньою продукцією IL-10 та секреторного sIgA переважали над такими з низькою в 4 і 3,12 рази ( $\chi^2 = 50,4$  і  $\chi^2 = 37,03$ ,  $p < 0,001$ ) відповідно. Загалом концентрація аналізованих цитокінів була вірогідно більшою в дівчат із вульвовагінітами, ніж у практично здорових у 1,22-2,6 рази ( $p \leq 0,001$ ).

Серед носіїв GG-генотипу вірогідно частіше спостерігалися особи з продукцією IL-1 $\beta$  вище за середню (2-й, 3-й квартиль) на 25,72% (87,88% проти 62,16%,  $\chi^2 = 6,04$ ,  $p = 0,014$ ), ніж

у носіїв А-алеля (AA+AG-генотипи), а також IL-10 — на 26,37% (93,94% проти 67,57%,  $\chi^2 = 7,58$ ,  $p = 0,006$  відповідно). Вірогідної різниці в частоті осіб за рівнями продукції TNF- $\alpha$  та sIgA з урахуванням генотипів аналізованого гена не встановили.

Концентрація аналізованих маркерів функціонування імунної системи у хворих на вульвовагініти вірогідно переважала над такою в практично здорових незалежно від генотипів гена HSP70-2 (дещо більше в носіїв GG-генотипу гена HSP70-2 за рівнем IL-1 $\beta$ TNF $\alpha$ ). Однак саме в дівчат дослідної групи з GG-генотипом вміст IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  перевищував такий у власниць AA+AG-генотипів на 12,13% ( $p = 0,04$ ) та 7,19% ( $p = 0,055$ ) відповідно. Решта показників з урахуванням алельного стану гена HSP70-2 між групами не відрізнялись.

## Висновки

Таким чином, мутація у 1267-й позиції промоторної зони гена HSP70-2 спостерігається загалом у 2,86% випадків. Розподіл А- і G-алелей А-1267G поліморфізму гена HSP70-2 засвідчує відносну однорідність розподілу в обстеженій популяції дівчат-підлітків Північної Буковини з переважанням дикого G-алеля як у контролі (75,0%), так і серед хворих на вульвовагініти (72,14%).

*Надійшла до редакції 23.08.2018 р.*

## Список використаної літератури

1. Астахов В.М. Статеве виховання та підготовка до шлюбу як шлях до формування адекватної репродуктивної поведінки / В.М. Астахов, О.В. Бацилева // Неонатологія, хірургія та перинатальна медицина. — 2012. — Т. II, № 4 (6). — С. 7-14.
2. Вдовиченко Ю.П. Сучасні аспекти профілактики і лікування вульвовагініту змішаного генезу / Ю.П. Вдовиченко, П.Н. Баскаков, К.Н. Масленников // Здоров'я жінки. — 2009. — № 5 (41). — С. 16-17.
3. Жуковская И.Г. Хронический неспецифический вагинит как маркер заболеваний репродуктивной системы / И.Г. Жуковская, Е.А. Сандакова // Гинекология. — 2012. — № 7 (75). — С. 15-19.
4. Мандрик С.Я. Вплив саліцилату і деоксихолату натрію на рівень експресії білків теплового шоку Hsp70 і Hsp90 у культурі клітин раку шлунка людини / С.Я. Мандрик, Л.Л. Сидорик, П.В. Погрібний [та ін.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. (Серия «Биология, химия»). — 2007. — Т. 20 (59), № 1. — С. 157-162.
5. Association between heat shock protein 72 gene polymorphism and failure of premature neonates / A. Fekete, A. Treszl, P. Tóth-Heyn [et al.] // Pediatr. Res. — 2003. — Vol. 54 (4). — P. 452-455.
6. Pockley A.G. Heat shock proteins as regulators of the immune response / A.G. Pockley // Lancet. — 2003. — Vol. 362 (9382). — P. 469-476.

## Analysis of A1267G polymorphism of gene HSP70-2 in the structure of patients with vulvovaginitis girls of puberty age

**O.I. Bodnariuk, O.A. Andriiets, O.V. Bochkariova**

### Abstract

The thesis describes a problem of increasing of the diagnostics of vulvovaginitis in girls. The study contains the complex researches of the condition of the systemic and local immunity and profile of cytokines. The analysis of A1267G polymorphism of the gene HSP70-2 (id.: rs1061581) in the structure of the patients suffering from vulvovaginitis has been performed for the first time; there has been established its influence on the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines.

**Keywords:** vulvovaginitis, girls of puberty age, polymorphism of gene HSP70-2.