

Реферат

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА TLR4 Asp299Gly СРЕДИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С В ПОЛТАВСКОЙ ОБЛАСТИ

Дубинская Г.М., Сизова Л.М., Коваль Т.И., Шлыкова О.А.

Ключевые слова: хронический гепатит С, полиморфизм, ген TLR4, генотип.

Целью исследования было выяснение распространённости полиморфизма Asp299Gly гена TLR4 среди больных хроническим гепатитом С и здоровых лиц, а также уточнения роли функционального полиморфизма в генах, кодирующих TLR4 в риске развития хронического гепатита С. Проведено обследование 81 больного хроническим гепатитом С, которые находились на лечении в Полтавской областной клинической инфекционной больнице и 81 практически здоровых жителей Полтавской области. Результаты проведенных исследований показали, что частота гетерозиготного генотипа Asp/Gly TLR4 у больных хроническим гепатитом С составляет 14,8% и превышает показатели популяционного контроля в 4 раза (3,7%, $p < 0,05$), частота выявления мутантной аллели 299Gly среди больных хроническим гепатитом С составляет 7,4% ($p < 0,05$). Установлено, что наличие полиморфноизменённого генотипа TLR4 позволяет прогнозировать развитие хронического гепатита С. Согласно расчета показателя соотношения шансов, наличие мутантного аллеля 299Gly TLR4 в 4,2 раза повышает риск развития хронического гепатита С ($OR=4,24$; 95% CI 1,16-15,22).

Summary

PREVALENCE OF GENE TLR4 ASP299GLY POLYMORPHISM AMONG PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C IN POLTAVA REGION

Dubinska G. M., Sizov L.M., Koval T.I., Shlykova O.A.

Key words: chronic hepatitis C, polymorphism, gene TLR4, genotype.

The aim of the study was to determine the prevalence of polymorphisms Asp299Gly TLR4 gene in patients with chronic hepatitis C and healthy individuals, as well as to clarify the role of functional polymorphisms in genes encoding TLR4 in the risk of developing chronic hepatitis C. The study involved 81 patients with chronic hepatitis C who were treated at the Poltava Regional Clinical Hospital of Infectious Diseases, and 81 healthy residents of the Poltava region. The studies showed that the frequency of heterozygous genotype Asp / Gly TLR4 in the patients with chronic hepatitis C is 14.8% higher than in the population of control group in 4 times (3.7%, $p < 0.05$), the frequency of detection of mutant alleles 299Gly among the patients with chronic hepatitis C is 7.4% ($p < 0.05$). It has been established that the presence of TLR4 genotype allows of predicting the development of chronic hepatitis C. According to the calculation of odds ratios, the presence of the mutant allele 299Gly TLR4 increases risk of chronic hepatitis C ($OR = 4,24$; 95% CI 1,16-15.22) in 4.2 times.

УДК 618.177-06:616.36:575.113

Жданович О.І., Коломійченко Т.В., Бойчук О.Г., Головчак І.С.

ПОЛІМОРФІЗМИ ГЕНУ ФІБРИНОГЕН БЕТА У ЖІНОК З БЕЗПЛІДДЯМ ТА ЗАХВОРЮВАННЯМИ ПЕЧІНКИ

Державна установа «Інститут педіатрії, акушерства та гінекології НАМН України»

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика

Івано-Франківський національний медичний університет

Досліджено 18 жінок з трубно-перітонеальним безпліддям, серед них 8 жінок з функціональними порушеннями гепато-біліарної системи (1-а група), останні 10 жінок без таких ознак склали 2-у групу. До функціональних порушень відносили наявність УЗД-ознак порушень печінки та біохімічних маркерів. Проведеними дослідженнями встановлено підвищення частоти поліморфізмів С148Т, -455GА гену β -fibrinogen та їх несприятливих сполучень у жінок з безпліддям та функціональними порушеннями гепатобіліарної системи, що вказує на схильність до розвитку тромбозів та акушерських ускладнень. Наявність алельних варіантів гену β -fibrinogen є преморбідним тлом, на якому можуть розвинути репродуктивні порушення, оцінка генетичного статусу жінки дозволить прогнозувати ефективність програм ДРТ, здійснювати преєравідарну підготовку для запобігання можливих акушерських і перинатальних ускладнень.

Ключові слова: безпліддя, допоміжні репродуктивні технології, патологія печінки, гемостаз, ген β -fibrinogen

Вступ

Порушення системи гемостазу супроводжують більшість патологічних процесів в організмі, зокрема пов'язані як з порушеннями репродуктивної функції жінки, так і з патологією гепатобіліарної системи.

Деякі автори вважають, що причиною порушення дітородної функції і безпліддя можуть бути зміни в системі гемостазу, аутоімунні реакції [1].

Найбільш вразливим етапом програми ДРТ на сьогоднішній день є період імплантації та

ранні терміни вагітності, частота раннього самовільного переривання вагітності залишається високою. Висловлюються припущення, що однією з причин порушення імплантації і раннього переривання вагітності можуть бути зміни в системі гемостазу. Зіставлення параметрів гемостазу у пацієнок програми ЕКЗ в ефективних і неефективних циклах стимуляції показує, що одним з лабільних параметрів схильних до впливу стимуляції суперовуляції і показових на ранніх етапах ембріогенезу, є концентрація фібриногену. Крім того, за наявності у жінки генетичної та придбанної форми тромбофілії, можуть мати місце субклінічні аборти, що оцінюється як безпліддя неясного генезу [2, 3, 4].

Печінка відіграє дуже суттєву роль в процесах гемостазу: патологія гепатобіліарної системи, що призводить до її функціональної неповноцінності, позначається на всіх компонентах гемостазу. Печінка є місцем синтезу всіх факторів згортання і їх інгібіторів за винятком фактора Віллебранда і відповідає за елімінацію комплексів «активованний фактор - інгібітор». Захворювання печінки призводять до складних комплексних порушень в системі гемостазу, але при цьому зберігається нестійкий баланс між згортуючою та антизгортуючою системою, який легко порушується у той чи інший бік, тому у пацієнтів з ураженнями печінки може бути схильність як до кровотеч, так і до тромбозів. Порушення функції печінки можуть супроводжуватись кількісними і якісними порушеннями фібриногену [5, 6].

На згортуючу систему крові також впливає гіперестрогенемія, що супроводжує програми ДРТ [4].

Отже, порушення системи гемостазу не тільки можуть бути однією з причин безпліддя, особливо за наявності гепатобіліарної патології, а і обумовлювати успішність програм ДРТ, збереження індукованої вагітності, ускладнення її перебігу, перинатальні наслідки.

Усі ці порушення можуть бути обумовлені генетичною схильністю до порушень системи гемостазу, зокрема поліморфізмами гену фібріноген β , які вважають одними з первинних маркерів тромбофілії і пов'язують з невиношуванням вагітності та преєклампсією [3, 7].

Фібриноген - глікопротеїн гострої фази, що синтезується в печінці. Він складається з трьох поліпептидів $A\alpha$, $B\beta$ і γ , які кодуються альфа (FGA), бета (FGB) і гамма (FGG) генами, відповідно [8]. Фібриноген є важливим компонентом згортання крові і основним чинником, що визначає в'язкість крові та агрегацію тромбоцитів. Під дією ферменту тромбіну цей білок здатний перетворюватися на фібрин і утворювати тромб. Він модулює функцію ендотелію і сприяє проліферації клітин гладких м'язів і міграції. Останнім часом, з підвищеними фібриногеном пов'язують ожиріння [9].

Локалізація гену фібриноген бета (FGB) - 4q28 (рисунок 1).

Ділянка ДНК у регуляторній області гена FGB, в якому відбувається заміна гуаніну (G) на аденін (A) у позиції -455, позначається як генетичний маркер G (-455) A. Наявність заміни впливає на інтенсивність синтезу білка фібриногену. Частота зустрічання мінорного (A) алеля в європейській популяції становить, за даними різних авторів, від 5 до 10%.

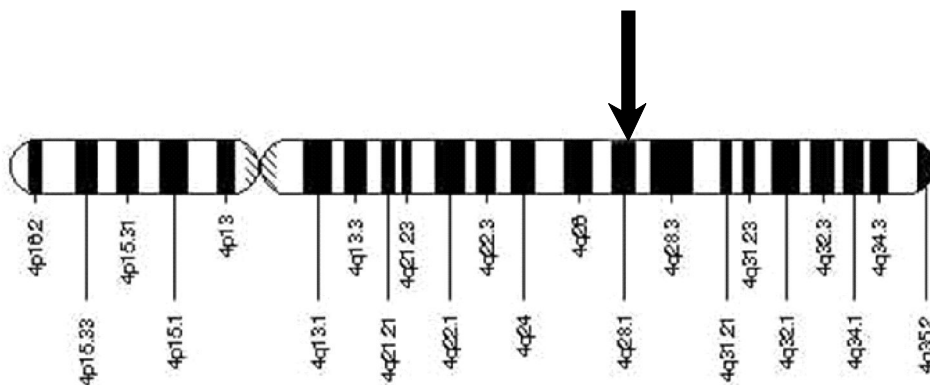


Рисунок 1 – Хромосомна локалізація гену фібриноген бета (4q28)

Мутація -455A бета фібриногену (FGB) супроводжується підвищеною експресією гена, що призводить до підвищеного рівня фібриногену в крові і збільшує ймовірність утворення тромбів, що може призводити до тромбозів і кардіоваскулярних захворювань та акушерських ускладнень. У дослідженні групи здорових донорів було встановлено, що мутація -455A призводить до підвищеного вмісту фібриногену в крові [8].

Поліморфізм -156С> Т гена FGB полягає у нуклеотидній заміні цитозину (С) на тимін (Т) в

промоторній ділянці гена. Варіант Т супроводжується підвищеною експресією гена, що призводить до збільшення вмісту фібриногену в крові і підвищує ймовірність утворення тромбів. За рахунок цього носії варіанту Т мають більший ризик захворювань серцево-судинної системи, порушень плацентації та інших акушерських ускладнень.

Наявність алельних варіантів генів є преморбідним тлом, на якому можуть розвинути репродуктивні порушення, оцінка генетичного ста-

тусу жінки дозволить прогнозувати ефективність програм ДРТ, здійснювати прегравідарну підготовку для запобігання можливих акушерських і перинатальних ускладнень.

Мета

Дослідити поліморфні варіанти гену фібриноген β у жінок з безпліддям та порушеннями гепатобіліарної системи.

Матеріали та методи

Досліджено 18 жінок з трубно-

перітонеальним безпліддям, серед них 8 жінок з функціональними порушеннями гепато-біліарної системи (1-а група), останні 10 жінок без таких ознак склали 2-у групу. До функціональних порушень відносили наявність УЗД-ознак порушень печінки та біохімічних маркерів (трансамінази, лужна фосфатаза, білірубін).

З таблиці 1 видно, що групи жінок достовірно не відрізнялись ні за віком, ні за тривалістю безпліддя.

Таблиця 1.

Характеристика обстежених жінок, абс. ч. (%)

Показник	Група жінок	
	1-а, n= 8	2-а, n= 10
Вік, років до 30	1 (12,5)	2 (20,0)
30 – 40	5 (62,5)	7 (70,0)
40 і більше	2 (25,0)	1 (10,0)
Тривалість безпліддя до 5 років	5 (62,5)	5 (50,0)

Молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів за генами β -fibrinogen (C148T, -455GA) проводилось в молекулярно-генетичній лабораторії Державного закладу «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України». Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти в якості антикоагулянту («Sarstedt», Німеччина), заморожували та зберігали при $t -20^{\circ}\text{C}$. Із зразків крові проводили виділення геномної ДНК за допомогою комерційного набору «ДНК-сорб-В» (відповідно до інструкції наданої виробником). Для визначення C148T та -455GA гена β -fibrinogen використовували протокол з олігонуклеотидними праймерами з застосуванням методу ПЛР з наступним аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Для цього ампліфікували специфічні ділянки генів за допомогою пари специфічних праймерів («Metabion», Німеччина). Для ампліфікації брали 3 мкл ДНК та додавали до суміші, що містить 12,5 мкл Dream Taq Green PCR po-

бочого розчину, по 20 pmol праймеру 1 та 2, об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. ПЛР проводили в термоциклері «FlexCycler BU» (Analytik Jena (Німеччина). Продукти ампліфікації фрагментів ДНК гену β -fibrinogen (C148T, -455GA) підлягали гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеаз рестрикції *HindIII*. Стан ампліфікаційних та рестрикційних фрагментів аналізували за допомогою горизонтального електрофорезу в 2% агарозному гелі (160 V протягом 40 хвилин). Візуалізацію отриманих результатів проводили за допомогою транслюмінатора та за молекулярною вагою фрагментів ДНК досліджуваних генів визначали генотип особи.

Результати дослідження та їх обговорення

За отриманими даними у жінок з безпліддям та функціональними порушеннями гепатобіліарної системи встановлена вища частота патологічних поліморфізмів C148T гену β -fibrinogen (рисунок 2).

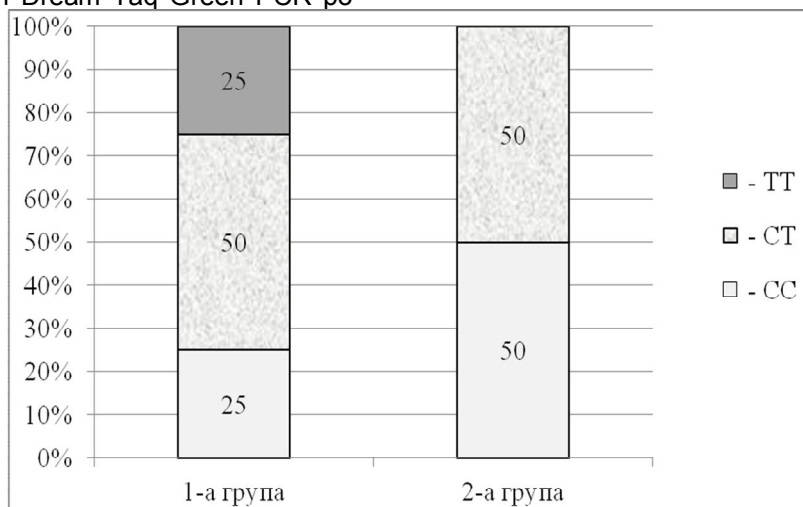


Рисунок 2 - Частоти генотипів поліморфізму C148T гену β -fibrinogen в досліджуваних групах

Так, нормальний варіант поліморфізму у гомозиготній формі CC зустрічався лише у 37,5 % обстежених проти половини жінок з безпліддям без порушень печінки. Гетерозиготна форма поліморфізму CT відмічена відповідно у половини жінок обох груп. Мутантний варіант поліморфізму, пов'язаний зі збільшенням ризику тромбозів та інших патологічних станів, у гомозиготній формі відмічено у 25,0 % жінок 1-ї групи, а у жінок 2-ї групи – не відмічався. Таким чином, 70,0 % жінок з безпліддям та порушеннями печінки та половина жінок були носіями мутантного варіан-

ту T поліморфізму у гетеро- або гомозиготній формі проти половини жінок без таких порушень, що значно перевищує показники європейської популяції згідно літературних даних.

Дослідженнями розподілу частот варіантів генотипів за поліморфізмом -455GA гену β -fibrinogen у жінок з безпліддям при порушеннях печінки встановлено зниження частоти протективного алелю G і збільшення частоти алелю A, відповідального за ризик розвитку тромбозів та акушерських ускладнень (рисунк 3) переважно за рахунок гетерозиготної форми (GA).

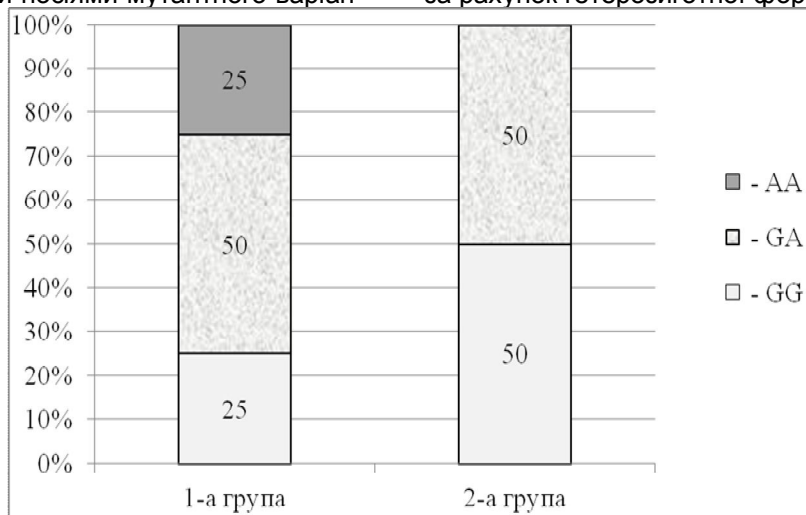


Рисунок 3 - Частоти генотипів поліморфізму -455GA гену β -fibrinogen в досліджуваних групах

Таблиця 2.
Сполучення генотипів C148T, -455GA гену β -fibrinogen у жінок з безпліддям та патологією гепатобілірної системи, абс.ч. (%)

Сполучення генотипів eNOS	1-а, n= 8	2-а, n= 10
CC x GG	2 (25,0)	5 (50,0)
CC x GA	–	–
CC x AA	–	–
CT x GG	–	–
CT x GA	4 (50,0)	5 (50,0)
CT x AA	–	–
TT x GG	–	–
TT x GA	–	–
TT x AA	2 (25,0)	–

Досить рідкісний у загальній популяції гомозиготний варіант AA спостерігався у 25,0 % жінок 1-ї групи.

Аналіз можливих сполучень поліморфізмів C148T, -455GA гену β -fibrinogen у жінок з безпліддям показав (таблиця 2), що з 9 можливих сполучень відмічено лише 3 варіанти, причому у жінок обох груп повністю співпадали як гомозиготні форми, так і гетерозиготні форми обох поліморфізмів, а сполучення гомозиготних форм, які обумовлюють розвиток тромбозів та акушерських ускладнень, зустрічались лише у жінок з безпліддям та гепатобілірною патологією.

Висновки та перспективи подальших розробок

Проведеними дослідженнями встановлено

підвищення частоти поліморфізмів C148T, -455GA гену β -fibrinogen та їх несприятливих сполучень у жінок з безпліддям та функціональними порушеннями гепатобілірної системи, що вказує на схильність до розвитку тромбозів та акушерських ускладнень.

Наявність алельних варіантів гену β -fibrinogen є преморбідним тлом, на якому можуть розвинути репродуктивні порушення, оцінка генетичного статусу жінки дозволить прогнозувати ефективність програм ДРТ, здійснювати прегравідарну підготовку для запобігання можливих акушерських і перинатальних ускладнень.

Література

1. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion / Jose' Bellver, S.R. Soares, C. Al'vares [et all.] // Human reproduction. – 2008. – V. 23, N 2. – P. 278-284.
2. Джанджгава Ж.Г. Неудачи ЭКО и материнская тромбофилия / Ж.Г. Джанджгава, В.О. Бицадзе // Проблемы репродукции. – 2005. – N 5. – С. 41-43.
3. Баранов В.С. Определение наследственной предрасположенности к некоторым частым заболеваниям при беременности / В.С. Баранов, Э.К. Айламазян. – СПб.: Н-Л, 2009. – 66 с.
4. Саидова Р.А. Исследование состояния системы гемостаза у женщин с подозрением на гиперпластические процессы эндометрия в репродуктивном периоде / Р.А. Саидова, Е.В. Федина // Вестник новых медицинских технологий. – 2006. – Вып. № 3, том XIII. – С. 55-57.
5. Caldwell S.H. Coagulation disorders and hemostasis in liver disease: pathophysiology and critical assessment of current management / S.H. Caldwell, M. Hoffman, T. Lisman [et all.] // Hepatology. – 2006. – Vol. 44. – P. 1039-1046.
6. Буланова Е.Л. Нарушения гемостаза у больных с поражениями печени / Е.Л. Буланова // Достижения биологии та медицини. – 2012. – № 1(19). – С. 70-75.
7. Camilleri R. –455G/A β -fibrinogen gene polymorphism, factor V Leiden, prothrombin G20210A mutation and MTHFR C677T, and placental vascular complications / R. Camilleri, S. Raymond, D. Peebles [et all.] // Blood Coagulation & Fibrinolysis. – V. 15. – P. 139-147.
8. Van 't H.F.M. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration / H.F.M. Van 't, S.J. Bahr, A. Silveira [et all.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 1999. – V. 19 (12). – P. 3063-3070.
9. Mosesson M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions / M.W. Mosesson // J Thromb Haemost. – 2005. – N 3. – P. 1894-1904.

References

1. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion / Jose' Bellver, S.R. Soares, C. Al'vares [et all.] // Human reproduction. – 2008. – V. 23, N 2. – P. 278-284.
2. Dzhandzhgava Zh.G. Neudachi 'EKO i materinskaya trombofiliya / Zh.G. Dzhandzhgava, V.O. Bicadze // Problemy reprodukcii. – 2005. – N 5. – S. 41-43.
3. Baranov V.S. Opredelenie nasledstvennoj predraspolzhenosti k nekotorym chastym zabolevaniyam pri beremennosti / V.S. Baranov, 'E.K. Ajlamazyan. – SPb.: N-L, 2009. – 66 s.
4. Caidova R.A. Issledovanie sostoyaniya sistemy gemostaza u zhenschin s podozreniem na giperplasticheskie processy 'endometriya v reproduktivnom periode / R.A. Caidova, E.V. Fedina // Vestnik novyh medicinskih tehnologij. – 2006. – Vyp. № 3, tom XIII. – S. 55-57.
5. Caldwell S.H. Coagulation disorders and hemostasis in liver disease: pathophysiology and critical assessment of current management / S.H. Caldwell, M. Hoffman, T. Lisman [et all.] // Hepatology. – 2006. – Vol. 44. – P. 1039-1046.
6. Bulanova E.L. Narusheniya gemostaza u bol'nyh s porazheniyami pecheni / E.L. Bulanova // Dosyagnennya biologii ta medicini. – 2012. – № 1(19). – S. 70-75.
7. Camilleri R. –455G/A β -fibrinogen gene polymorphism, factor V Leiden, prothrombin G20210A mutation and MTHFR C677T, and placental vascular complications / R. Camilleri, S. Raymond, D. Peebles [et all.] // Blood Coagulation & Fibrinolysis. – V. 15. – P. 139-147.
8. Van 't H.F.M. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration / H.F.M. Van 't, S.J. Bahr, A. Silveira [et all.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 1999. – V. 19 (12). – P. 3063-3070.
9. Mosesson M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions / M.W. Mosesson // J Thromb Haemost. – 2005. – N 3. – P. 1894-1904.

Реферат

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ФИБРИНОГЕН БЕТА У ЖЕНЩИН С БЕСПЛОДИЕМ И ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПЕЧЕНИ

Жданович О.И., Коломийченко Т.В., Бойчук О.Г.

Ключевые слова: бесплодие, вспомогательные репродуктивные технологии, патология печени, гемостаз, ген β -fibrinogen.

Исследовано 18 женщин с трубно-перитонеальным бесплодием, среди них 8 женщин с функциональными нарушениями гепатобилиарной системы (первая группа), остальные 10 женщин без таких признаков составили вторую группу. К функциональным нарушениям относили наличие УЗИ-признаков нарушений печени и биохимических маркеров. Проведенными исследованиями установлено повышение частоты полиморфизмов C148T, -455GA гена β -fibrinogen и их неблагоприятных сочетаний у женщин с бесплодием и функциональными нарушениями гепатобилиарной системы, указывает на склонность к развитию тромбозов и акушерских осложнений. Наличие аллельных вариантов гена β -fibrinogen является преморбидным фоном, на котором могут развиваться репродуктивные нарушения, оценка генетического статуса женщины позволит прогнозировать эффективность программ ВРТ, осуществлять прегравидарную подготовку для предотвращения возможных акушерских и перинатальных осложнений.

Summary

BETA-FIBRINOGEN GENE POLYMORPHISMS IN WOMEN WITH INFERTILITY AND LIVER DISEASE

Zhdanovich O.I., Kolomiychenko T.V., Boychuk O.G.

Key words: infertility, assisted reproductive technologies, liver disease, hemostasis, gene β -fibrinogen.

The study involved 18 women with tubal-peritoneal infertility, including 8 women with functional disorders of the hepatobiliary system (the 1st group), the remaining 10 women with no such evidence made up the 2nd group. Functional disorders included the ultrasound evidence of liver affections and biochemical markers. Our investigations revealed increased frequency of polymorphisms C148T, -455GA gene β -fibrinogen and their adverse combinations in women with infertility and functional disorders of the hepatobiliary system that indicated a tendency to develop thrombosis and obstetrical complications. The presence of allelic variants of the gene β -fibrinogen is premorbid background, which can contribute the development of reproductive disorders, therefore genetic evaluation of the status of women will predict the effectiveness of ART programs, and carry out prenatal care to prevent possible obstetric and perinatal complications.