

В.В. Бойко, Е.М. Климова, Д.А. Евтушенко, Т.И. Кордон, С.В. Сушков
ГУ «Институт общей и неотложной хирургии им. В.Т.Зайцева НАМН Украины», 61103 г. Харьков,
въезд Балакирева, 1

ВЗАИМОСВЯЗЬ ГЕНОМНЫХ И ЭПИГЕНОМНЫХ ПРЕДИКТОРОВ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ И СТЕПЕНЬЮ ВЫРАЖЕННОСТИ СПАЕЧНОЙ БОЛЕЗНИ

РЕЗЮМЕ. В работе исследовали некоторые геномные и эпигеномные предикторы, взаимосвязанные с риском развития и степенью выраженности спаечной болезни брюшины (СББ).

С помощью методов ПЦР выявлено наличие мутаций участка 807 гена интегрин ITGA2. Показано, что у 65,2% пациентов со СББ имели место одиночные (С-Т) и двойные (Т-Т) замены основания цитозина на тимин в гене интегрин ITGA2.

Серологическое фенотипирование полиморфизма лейкоцитарных аллелей HLA I класса выявило высокую степень частоты встречаемости аллелей I класса HLA A9, A33, B13 в популяционной выборке обследованных пациентов со СББ.

Выявили повышение экспрессии адгезивных молекул CD31+, CD54+, незавершенность эндоцитоза микроорганизмов фагоцитирующими клетками, снижение кислородного резерва фагоцитирующих нейтрофилов, повышение С-реактивного белка, гаптоглобина, снижение антиоксидантного белка церулоплазмина, повышение высокопатогенных циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и среднемолекулярных пептидов (ПСММ), наличие тканеспецифических аутоантител: к коллагену, эластину, клеткам тонкого и толстого кишечника. Также выявили нарушение экспрессии кластеров дифференцировки CD субпопуляций Т-лимфоцитов – хелперов CD4+ и киллеров CD8+.

У пациентов, у которых в предоперационном периоде выявлен полиморфизм гена интегрин ITGA2 и HLA I класса, снижение барьерной функции фагоцитоза, снижение антиоксидантных факторов, изменения гуморального звена иммунитета и нарушения экспрессии кластеров дифференцировки CD, являются группой риска с высокой вероятностью развития СББ. Для этих пациентов должны быть предусмотрены лечебные мероприятия по профилактике развития спаечной болезни.

Ключевые слова: фиброгенез; спаечная болезнь брюшины; мутации гена интегрин ITGA2; полиморфизм аллелей I класса HLA; иммунный дисбаланс.

ВВЕДЕНИЕ.

Фиброгенез развивается при разнообразных патологических состояниях – заболеваниях органов желудочно-кишечного тракта, при спаечной болезни, кишечной непроходимости, печеночной недостаточности, при сердечно-сосудистых заболеваниях, легочном фиброзе, патологии репродуктивных органов, бесплодии, образовании келоидных рубцов и других метаболических нарушениях при разрастании соединительной ткани [1, 2].

Нарушения структурно-функциональной организации соединительной ткани являются частыми послеоперационными осложнениями, развивающимися у 67-93% пациентов после хирургического лечения, которые клинически проявляются выраженным болевым синдромом при спаечной болезни брюшины и органов малого таза, кишечной непроходимостью и др. [3-7]. Эти изменения соединительной ткани обусловлены комплексом реакций воспаления, активацией коагуляции, фибринолиза и др, которые индуцированы инфекционными антигенами, или являются следствием спорадических мутаций генов-кандидатов факторов адгезии. [8]. Структурно-функциональные нарушения соединительной ткани [5] характери-

зуются склерозированием плазматических мембран, усилением фиброгенеза стромы тканей и сосудистых стенок, нарушениями ремоделирования внеклеточного коллагенового матрикса [9-10].

Развитию фиброза также может способствовать снижение активности металлопротеиназ, которые обеспечивают своевременную деградацию внеклеточного матрикса [11].

Известно, что патогенез фиброзов может быть следствием генетической предрасположенности к структурно-функциональным нарушениям соединительной ткани в виде дисплазии или может развиваться под действием средовых факторов, формирующих патологические метаболические пути во многих органах и системах за счет сочетанного влияния геномных и эпигеномных факторов [12-13].

Важную роль на различных стадиях воспалительного процесса выполняют адгезивные молекулы и интегрины, которые определяют межклеточный сигналинг при ремоделировании межклеточного матрикса [13].

Изучение особенностей иммунного ответа, а также исследования изменений структурной

организации генов-интегринов помогут понять этиологические факторы и механизмы патогенеза спаечной болезни для прогнозирования ее развития и степени тяжести течения [14].

Также недостаточно изучены афферентные и эфферентные звенья иммунореактивности и иммунорезистентности при спаечной болезни, в том числе нарушения адгезивных свойств клеточных рецепторов; изменения барьерной функции фагоцитирующих клеток и показателей гуморального и клеточного звеньев адаптивного иммунитета при спаечной болезни. Факторы иммунорезистентности играют важную роль в формировании воспалительного процесса и могут служить специфическими маркерами развития и распространенности спайкообразования.

Цель: исследовать взаимосвязь развития, тяжести и распространенности спаечной болезни с частотой встречаемости мутации гена тромбоцитарного интегринна ITGA2 и нарушением различных звеньев иммунореактивности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В работе использованы образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови, форменные элементы и сыворотка крови пациентов со спаечной болезнью брюшины (СББ). Общее количество обследованных пациентов составило 43 человека. Возраст пациентов составил от 33 до 60 лет. Степень выраженности спаечной болезни брюшины (I – IV) определялась симптомокомплексом - наличием послеоперационного келлоидного рубца, боли, послеоперационной вентральной грыжи, острой кишечной непроходимости, частичной кишечной непроходимости и тяжести течения.

Выявление мутаций гена ITGA-2 в геноме пациентов определяли методом ПЦР с помощью набора реагентов для амплификации «SNP-ЭКС-ПРЕСС-РВ». Экстракция геномной ДНК проводилась из лейкоцитов периферической крови с использованием реагента «ДНК-экспресс-кровь». ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе в реальном времени.

Определение фенотипа лейкоцитарных антигенов HLA I класса – А, В проводили методом комплементзависимой цитотоксичности с помощью панели гистотипирующих сывороток.

Функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови оценивали методом световой микроскопии по показателям фагоцитарного индекса (ФИ), фагоцитарного числа (ФЧ) и индекса завершенности фагоцитоза (ИЗФ).

Окислительно-восстановительную активность нейтрофилов оценивали методом световой микроскопии в тесте восстановления нитросинего

тетразолия (НСТ-тест).

Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов и константу ЦИК определяли методом осаждения в градиенте полиэтиленгликоля с последующей спектрофотометрией.

Содержание пептидов средней молекулярной массы определяли методом осаждения раствором ТХУ с последующей спектрофотометрией.

Лимфоцитотоксичность определяли методом Тerasaki по цитотоксическому эффекту ауто-сыворотки на аутолимфоциты в присутствии комплемента.

Содержание С-реактивного белка определяли методом агглютинации в латекс-тесте. Количественное определение проводили методом многократных разведений сыворотки крови и повторных реакций агглютинации.

Содержание серогликоидов, церулоплазмينا и гаптоглобина определяли методом спектрофотометрии.

Определение концентрации органоспецифических антител к коллагену и эластину проводили методом иммуноферментного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для выяснения возможной взаимосвязи между развитием, выраженностью СББ и генетическим полиморфизмом гена интегринна ITGA2 исследовали частоту встречаемости единичных и двойных замен оснований цитозина (С) на тимин (Т).

В первую подгруппу были объединены 15 пациентов из 43 со СББ, у которых не выявили мутаций гена тромбоцитарного интегринна ITGA2. У этих 15 пациентов, которые составили 34,8% от всей обследованной выборки пациентов со спаечной болезнью брюшины (СББ), участок гена 807 тромбоцитарного интегринна был представлен двумя нуклеотидами цитозина (С-С).

Во вторую подгруппу были объединены 24 обследованных пациента со СББ, у которых выявили единичную замену оснований цитозина на тимин (С-Т), что составило 55,8% (наибольшая частота встречаемости мутации гена ITGA2 в данной популяционной выборке).

Замена обеих оснований цитозина (С-С) на тимин – (Т-Т) в гене интегринна ITGA2 была выявлена у 4 пациентов, что составило 9,4% от общего числа обследованных пациентов со СББ. Эти пациенты составили третью подгруппу.

Следовательно, из всей обследованной выборки пациентов со СББ у лиц второй и третьей подгруппы, что составило 65,2% из всей популяционной выборки больных со СББ, имелись различные типы мутаций замены оснований цитозина на тимин, а у остальных 34,8% не были выяв-

лены мутации данного гена.

Анализировали возможную взаимосвязь между характером гетерогенности симптомов и тяжестью СББ с одной стороны, и генетическим полиморфизмом гена интегрин ITGA2 с другой стороны, во всех трех подгруппах пациентов со СББ.

Выявлена взаимосвязь между степенью выраженности СББ и характером генного полиморфизма гена интегрин ITGA2.

У 15 пациентов первой подгруппы с нормальным участком 807 гена ITGA2 степень выраженности симптомов спаечной болезни была различна: у 11 пациентов из них была легкая степень выраженности и распространенности СББ; у 4 пациентов выявлена высокая степень тяжести симптомов и распространенности спаечной болезни.

Выявили высокую гетерогенность клинических симптомов спаечной болезни у 24 пациентов второй подгруппы с единичной заменой цитозина на тимин С-Т в участке 807 гена интегрин ITGA2. У 7 пациентов второй подгруппы с одиночной заменой С-Т выявили не более одного симптома спаечной болезни. У 13 пациентов этой подгруппы отмечено слабое проявление 2-3 симптомов спайкообразования; и только у 4 пациентов этой подгруппы выявили высокую степень тяжести и распространенности спайкообразования.

В третьей подгруппе пациентов с двойной заменой цитозина на тимин (Т-Т) выявили максимальную выраженность признаков спаечной болезни, которая сопровождалась выраженными абдоминальными болями у 3 пациентов из 4, а у 1 пациента степень выраженности симптомов была незначительна.

Анализ встречаемости аллелей лейкоцитарных антигенов HLA I-го класса А (A1, A9, A29,

A31, A33,) и В (B7, B13, B16, B56) в популяционной выборке пациентов с различной степенью выраженности спаечной болезни брюшины выявил генетическую гетерогенность частоты встречаемости этих аллелей.

У обследованных больных со СББ выявили различную частоту встречаемости аллелей лейкоцитарных антигенов I класса HLA А и В. Превалировало наличие аллелей A33, A9 и B13. Частота встречаемости гапло- и диплотипов аллелей лейкоцитарных антигенов I класса HLA A33 составила 47%, частота встречаемости гапло- и диплотипов аллелей HLA A9 составила 45%, которые наиболее часто выявляли у обследованных больных с высокой степенью выраженности симптомов спаечной болезни. Встречаемость гапло- и диплотипов HLA B13 была выявлена у 35% обследованных, а аллели B56 выявили у 24% обследованных в популяционной выборке. Симптомы спайкообразования у пациентов с преобладанием диплотипов HLA B13 были менее выражены.

Анализ результатов исследования генетических предикторов развития СББ – точковых мутаций участка 807 гена интегрин ITGA2 и генного полиморфизма лейкоцитарных антигенов HLA I класса А и В свидетельствуют о взаимосвязи генетических предикторов развития и распространенности спаечной болезни.

Анализ показателей иммунорезистентности свидетельствует о их выраженной дисфункции у всех обследованных пациентов со СББ.

Результаты исследования барьерной функции фагоцитоза нейтрофилов выявили недостаточность ферментативной активности лизосомальных ферментов – гранзимов, что проявлялось незавершенным эндоцитозом бактериальных антигенов фагоцитирующими клетками.

Таблица 1.

Показатели фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов в подгруппах пациентов со спаечной болезнью брюшины

Показатели	Исследуемые группы			
	Референтные значения	1 подгруппа участок гена интегрин (С-С)	2 подгруппа участок гена интегрин (С-Т)	3 подгруппа участок гена интегрин (Т-Т)
Фагоцитарный индекс, %	73,1±5,0	83,8±4,6	79,26±2,9	88,3±2,5*
Фагоцитарное число	3,6±0,1	3,1±0,5	3,08±0,8	4,31±0,6*
Индекс завершенности фагоцитоза	1,1±0,02	1,08±0,01	0,97±0,1*	0,94±0,1*

Примечания: * – отличия достоверны от референтных значений (p≤0,05).

В таблиці 1 представлені дані, характеризуючі різні стадії кислородонезалежного фагоцитозу: хемотаксис, адгезію, поглинання антигену фагоцитуючими клітками і наступний процес ендцитозу. У пацієнтів першої підгрупи, у яких відсутні мутації гена тромбоцитарного інтегрину ITGA2, не виявлено порушень всіх досліджуваних стадій фагоцитозу. У більшості обстежених пацієнтів, які мають мутації гена ITGA2 (С-Т) і (Т-Т), виявлено підвищену поглинальну функцію фагоцитуючих нейтрофілів за рахунок збільшення фагоцитарного числа. Во другій підгрупі спостерігали варіабельність показника фагоцитарного числа ($3,08 \pm 0,8$), який характери-

зує поглинальну здатність нейтрофілів, що свідчить про активацію рецепторів фагоцитів. У пацієнтів другої і третьої підгруп со СББ виявлено достовірне зниження переварювальної функції нейтрофільних гранулоцитів, у яких ендцитоз був достовірно зменшений – ($0,97 \pm 0,1$) і ($0,94 \pm 0,1$) відповідно за рахунок дисфункції лізосомальних ферментів -гранзимів.

Аналіз функціонального стану антигенпрезентуючих кліток в кислородозалежному фагоцитозі, який оцінювали за показником НСТ-тесту, виявив зниження індексу стимуляції у всіх хворих со СББ за рахунок багаторазового підвищення спонтанних окислювальних реакцій і зниження індукованих (табл.2).

Таблиця 2.

Показатели НСТ-теста в подгрупах пациентов со спаечной болезнью брюшины

Показатели	Исследуемые группы			
	Референтные значения	1 подгруппа участок гена интегрин (С-С)	2 подгруппа участок гена интегрин (С-Т)	3 подгруппа участок гена интегрин (Т-Т)
НСТ спонтанный	$9,0 \pm 0,5$	$37,3 \pm 5,4^*$	$38,45 \pm 4,7^*$	$46,0 \pm 9,8^*$
НСТ индуцированный	$70,0 \pm 10,0$	$53,5 \pm 7,2$	$61,5 \pm 5,3$	$63,2 \pm 9,8$
СЦК спонтанный	$1,5 \pm 0,3$	$0,54 \pm 0,1^*$	$0,58 \pm 0,1^*$	$0,68 \pm 0,2^*$
СЦК стимулированный	$1,5 \pm 0,3$	$0,98 \pm 0,2^*$	$1,05 \pm 0,1^*$	$1,43 \pm 0,4$
Индекс стимуляции	$8,0 \pm 2,0$	$1,57 \pm 0,3^*$	$1,88 \pm 0,3^*$	$1,57 \pm 0,4^*$

Примечания: * - отличия достоверны от референтных значений ($p \leq 0,05$).

Спостерігали дисбаланс окислювальних реакцій в кислородозалежному фагоцитозі, о якому судили за спонтанною і індукованою окислювальною здатністю нейтрофілів з участіем НАДФН системи і активних форм кислого (АФК) від ($53,5 \pm 7,2$) до ($66,3,2 \pm 0,8$).

Отже, однією з причин несостойливости ендцитозу фагоцитів було змінення резервної окислювальної функції ферментів антигенпрезентуючих фагоцитуючих кліток в кислородозалежному фагоцитозі (табл.2).

Таблиця 3.

Содержание белков острой фазы в сыворотке крови в подгрупах пациентов со спаечной болезнью брюшины

Показатели	Исследуемые группы			
	Референтные значения	1 подгруппа участок гена интегрин (С-С)	2 подгруппа участок гена интегрин (С-Т)	3 подгруппа участок гена интегрин (Т-Т)
С-реактивный белок	$3,0 \pm 1,5$	$13,5 \pm 8,1^*$	$16,8 \pm 8,8^*$	$19,2 \pm 13,14^*$
Гаптоглобин	$1,09 \pm 0,8$	$1,66 \pm 0,5^*$	$1,26 \pm 0,26^*$	$2,51 \pm 0,41^*$
Церулоплазмин	$315,0 \pm 75,0$	$154,1 \pm 16,5^*$	$124,1 \pm 8,86^*$	$122,03 \pm 21,99^*$
Серогликоиды	$4,5 \pm 0,5$	$4,75 \pm 2,1$	$3,78 \pm 8,8^*$	$2,02 \pm 0,43^*$

Примечания: * - отличия достоверны от референтных значений ($p \leq 0,05$).

Изучали острофазовые белки, которые принимают участие в регуляторной адаптивной функции иммунитета, являются маркерами стадии и степени воспалительного процесса, выполняют рецепторную, транспортную и антиоксидантную функцию.

У всех обследованных пациентов со СББ выявлено достоверное многократное увеличение С-реактивного белка, его максимальный уровень отмечен в группе пациентов со СББ, имеющих двойную замену цитозина на тимин (Т-Т). В этой

же подгруппе 3 отмечали максимальное содержание гаптоглобина – железотранспортного белка, при этом церулоплазмин – (антиоксидант, белок, обеспечивающий транспорт меди) в данной группе был самым низким.

Сывороточные гликопротеины серогликоиды в первой (С-С) и второй (С-Т) подгруппах и гаплотипом соответствовали референтным значениям, а в подгруппе 3 с двойной заменой цитозина на тимин (Т-Т) они снижены более чем в два раза.

Таблица 4.

Показатели гуморального иммунитета в подгруппах пациентов со спаечной болезнью брюшины

Показатели	Исследуемые группы			
	Референтные значения	1 подгруппа участок гена интегрин (С-С)	2 подгруппа участок гена интегрин (С-Т)	3 подгруппа участок гена интегрин (Т-Т)
ЛЦТ, %	31,6±4,2	57,1±3,95*	47,1±2,05*	51,25±4,4*
ЦИК, ед.Е.	75,0±18,0	199,75±18,3*	151,29±15,05*	190,2±41,7*
Константа ЦИК	1,3±0,2	1,01±0,03*	0,99±0,03*	1,02±0,07*
ПСММ, ед.Е.	0,210±0,02	0,404±0,08*	330,5±0,09*	0,323±0,02*

Примечания: * - отличия достоверны от референтных значений ($p \leq 0,05$).

Для всех пациентов характерным было увеличение уровня лимфоцитотоксических антител, в некоторых случаях эта величина достигала 62%. Концентрация циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и пептидов средней молекулярной массы (ПСММ) была выше контроля в среднем в 3 и 1,5 раза соответственно. Максимально высокое содержание ПСММ отмечено в первой подгруппе (С-С) – (0,404±0,008) ед.Е. Низкая константа ЦИК выявлена во всех обследованных пациентов со СББ.

Исследовали возможное наличие мощных факторов тканевой и клеточной деструкции – аутоиммунные антитела, специфичные к компонентам внеклеточного матрикса – эластину и коллагену, и клеточным мембранам кишечника.

Выявили определенный репертуар аутоиммунных антител к 2 компонентам внеклеточного матрикса и к антигенным эпитомам клеток тонкой и толстой кишки. У больных со СББ первой подгруппы, не имевших мутаций исследуемого гена, концентрация аутоантител к коллагену, эластину была повышена более чем в 10 раз. У пациентов второй подгруппы с единичной заменой цитозина на тимин (С-Т), выявили повышенное содержание аутоантител только к одному компоненту межклеточного матрикса – к коллагену, и к эпитомам клеток толстой кишки. У пациентов третьей подгруппы с двойной заменой цитозина на тимин (Т-Т) в гене интегрин выявили максимальное увеличение содержания сывороточных аутоантител к коллагену (табл.5).

Спектр и концентрация аутоантител в подгруппах пациентов со спаечной болезнью брюшины

Показатели	Референтные значения	Исследуемые группы		
		1 подгруппа участок гена интегрина (С-С)	2 подгруппа участок гена интегрина (С-Т)	3 подгруппа участок гена интегрина (Т-Т)
ААТ к коллагену	0,002±0,001	0,029±0,025*	0,028±0,002*	0,079±0,031*
ААТ к эластину	0,002±0,001	0,034±0,025+	0,007±0,004	0,033±0,022*
ААТ к клеткам тонкой кишки	0,002±0,001	0,007±0,005	0,004±0,003	0,005±0,003
ААТ к клеткам толстой кишки	0,002±0,001	0,002±0,001	0,015±0,009*	0,001±0,001

Примечания: * - отличия достоверны от референтных значений ($p \leq 0,05$).

Изучали функциональное состояние Т-лимфоцитов по изменению экспрессии кластеров дифференцировки CD.

У пациентов без мутации гена тромбоцитарного интегрина С-С в первой подгруппе экспрессия молекул CD2+ на активированных Т-лимфоцитах была достоверно повышена относительно референтных значений, и превышала более чем в 3 раза их уровень в подгруппах пациентов с мутациями. Экспрессия молекул CD3+ в популяции общих Т-лимфоцитов, у пациентов со СББ 1 подгруппы (С-С) напротив, была в два раза ниже, чем в подгруппах 2 (С-Т) и 3 (Т-Т). Во второй подгруппе (С-Т) отмечен выраженный дефицит CD4-

зитивных Т-хелперов. Максимальное снижение CD8-позитивных киллерных клеток отмечено в подгруппе 1 (С-С). Выявили разнонаправленные изменения функциональной активности Т-лимфоцитов – хелперов и киллеров у пациентов, имеющих мутации гена тромбоцитарного интегрина, и в группе пациентов с отсутствием мутации исследуемого гена.

В первой подгруппе без мутации гена интегрина выявили значительное увеличение кластеров дифференцировки CD2+-Т-активированных лимфоцитов, резкое снижение общих CD3+-Т-лимфоцитов, и низкую экспрессию Т-киллерных клеток CD8+.

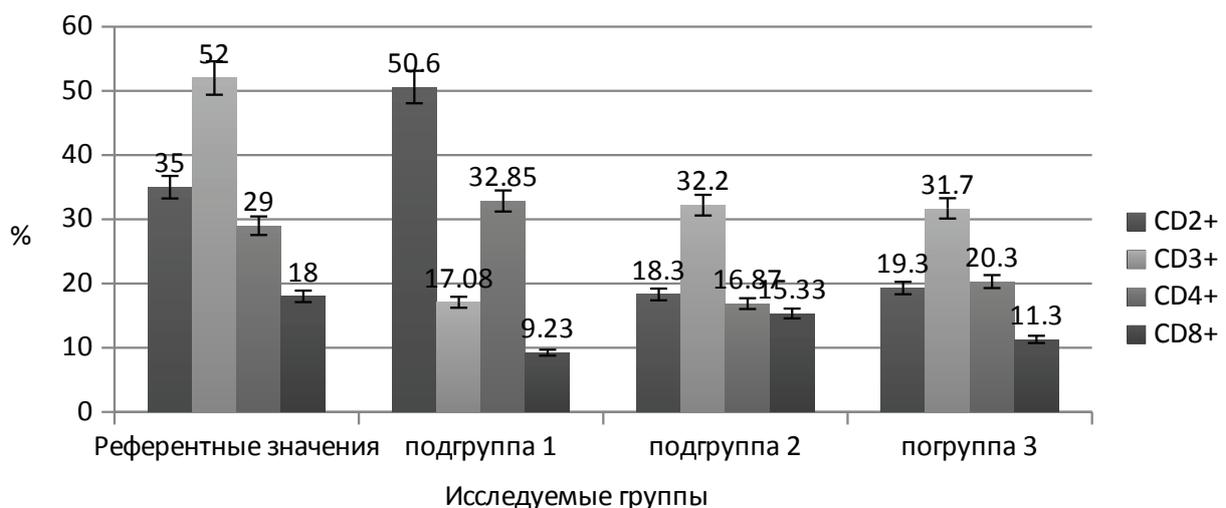


Рис. 2. Соотношение субпопуляций Т-лимфоцитов, экспрессирующих различные кластеры у пациентов трех подгрупп со спаечной болезнью брюшины

МУЛЬТИФАКТОРІАЛЬНІ ЗАХВОРЮВАННЯ

Таким образом, увеличение субпопуляции активированных CD2⁺-Т-лимфоцитов, достаточный уровень Т-хелперов и снижение экспрессии CD3⁺ может свидетельствовать об нарушении функций Т-хелпер-зависимого антителообразования и изменению дифференцировки плазматических В-клеток.

Во второй и третьей подгруппах у пациентов с выявленными мутациями (С-Т и Т-Т) гена

ITGA2 наблюдали угнетение экспрессии рецепторов CD2⁺, CD4⁺ субпопуляций Т-лимфоцитов. Резкое игнибирование киллерной субпопуляции в этих подгруппах может снижать функциональную активность Т-системы иммунитета в процессах деградации и ремоделировании межклеточного матрикса, а снижение активированных Т-лимфоцитов способствует нарушению межклеточного сигналинга иммунокомпетентных клеток.

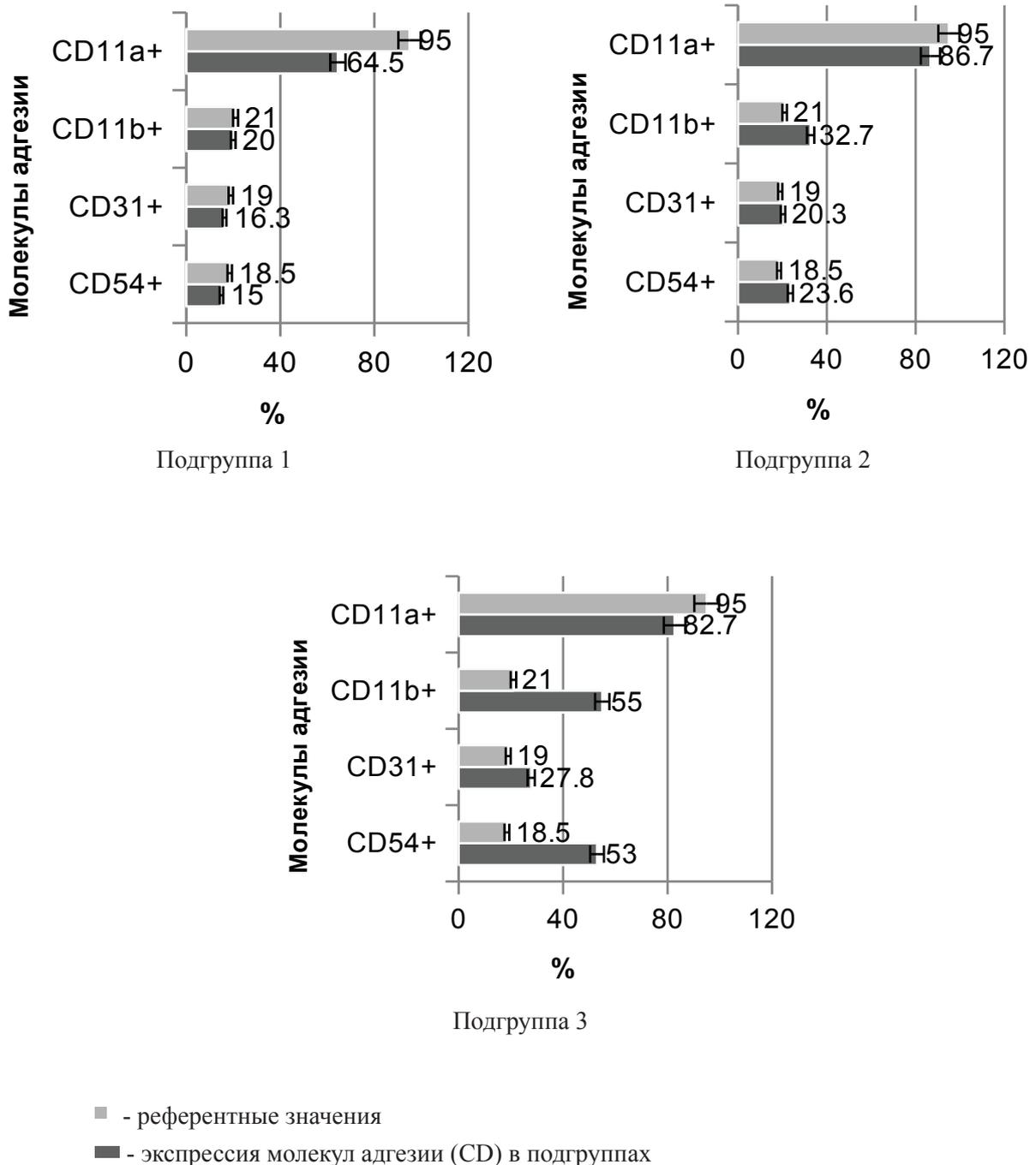


Рис. 3. Экспрессия молекул адгезии у пациентов трех подгрупп со спаечной болезнью брюшины

Об усилении адгезивных свойств иммунокомпетентных клеток судили по увеличению кластеров дифференцировки CD54+ и CD31+. Экспрессия специфических доменов на максимально активированных CD11a+ и CD11b+ коррелировала с многократным компенсаторным увеличением фагоцитарного числа в третьей подгруппе, что свидетельствует о нарушении соотношения между адгезивной и поглотительной способностью с одной стороны, и недостаточности переваривающей способности с другой стороны, приводящей к несостоятельности фагоцитоза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, полученные в результате сравнительного анализа, о роли геномных и эпигеномных факторов в развитии спаечной болезни и выраженности ее клинических симптомов свидетельствует о их различном вкладе в эти процессы.

Результаты исследования показали, что у 34,8 % обследованных пациентов со СББ, которых объединили в первую подгруппу, не выявлены мутации участка 807 гена интегрин ITGA2. У 55,8 % всех обследованных пациентов со СББ, объединенных во вторую подгруппу, выявили единичную замену оснований цитозина на тимин (С-Т), что представляло наибольшую частоту встречаемости точковых мутаций в обследованной популяционной выборке. Третья подгруппа включала пациентов, у которых выявили замену обеих оснований цитозина (С-С) на тимин – (Т-Т) в гене интегрин ITGA2 – 9,4% от общего числа обследованных пациентов со СББ.

Общая частота встречаемости всех типов мутаций гена интегрин ITGA2 у обследованных пациентов составила 65,2%, что свидетельствует о высоком уровне и значимости геномных изменений в данной популяционной выборке.

Степень выраженности симптомов СББ у пациентов с мутациями гена интегрин и без них она была различной. В первой подгруппе у 26,7% пациентов в отсутствие мутаций гена интегрин ITGA2 выявили выраженные клинические симптомы СББ. Во второй подгруппе пациентов с одиночными заменами оснований цитозина на тимин (С-Т) у 83,4% выявили незначительную выраженность симптомов СББ, а у 16,6% пациентов отмечали выраженные симптомы распространенной спаечной болезни. В третьей подгруппе с двойной заменой основания цитозина на тимин (Т-Т) в гене интегрин ITGA2 у 25% наблюдали незначительные проявления СББ, а у 75% - выраженную манифестацию симптомов спаечной болезни.

Следовательно, нет жесткой взаимосвязи с мутациями гена интегрин ITGA2 с выраженностью спаечной болезни.

Наряду с выявленными точковыми мутациями тромбоцитарного интегрин ITGA2, была установлена высокая степень полиморфизма лейкоцитарных аллелей HLA I класса у всех обследованных пациентов со СББ в популяционной выборке. Из всех встречающихся полиморфных аллелей отмечали высокую степень частоты встречаемости аллелей HLA I класса A9, A33 и B13 во всех подгруппах.

Независимо от наличия точковых мутаций гена интегрин, которые выявили у 65,2% всех обследованных, наблюдали выраженные изменения показателей иммунореактивности. Характер этих изменений проявлялся повышением экспрессии адгезивных молекул CD31+, CD54+, незавершенностью эндоцитоза фагоцитирующими клетками, снижением кислородного резерва фагоцитирующих нейтрофилов, повышением С-реактивного белка, гаптоглобина, снижением антиоксидантного белка церулоплазмينا, увеличением содержания высокопатогенных циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и среднемoleкулярных пептидов (ПСММ), наличием тканеспецифических аутоантител: к коллагену, эластину, клеткам тонкой и толстой кишки. Выявленные нарушения экспрессии кластеров дифференцировки CD субпопуляций Т-лимфоцитов – хелперов CD4+ и киллеров CD8+ свидетельствуют о наличии выраженного иммунодефицита в Т-клеточном звене иммунитета у всех пациентов со спаечной болезнью.

Что касается особенностей проявления симптомов СББ, то в третьей подгруппе с двойной заменой цитозина на тимин (Т-Т) у пациентов были выявлены грубые рубцы после аппендэктомии, у них также наблюдали выраженные изменения гуморального звена иммунитета и высокое содержание антител к эластину.

Механизмы, лежащие в основе нарушения иммунорезистентности под действием факторов окружения, могут быть связаны с изменением гистонового кода и характера метилирования генов иммунного ответа. Однако, полученные нами результаты свидетельствуют о полигенной природе спаечной болезни и она может быть детерминирована не только генетическими, но и эпигеномными факторами, такими как регуляция экспрессии генома путем метилирования ДНК определенных сайтов или путем выбора адаптивной стратегий формирования иммунного ответа на определенные экзо- и эндогенные антигены [15].

Генетические нарушения, вызванные изменением первичной структуры гена, могут существенно изменять кинетику адгезивные свойства тромбоцитов. Повышение скорости адгезии тромбоцитов может быть связано не только с полиморфизмом генетических

маркеров С807Т, но и с другими эпигеномными нарушениями, затрагивающими различные звенья резистентности и иммуногенетический контроль. В некоторых случаях в значительной степени эпигеномные факторы, такие как метилирование ДНК, влияют на экспрессию гена. Известно, что в геноме с максимальной частотой происходит метилирование по цитозину (С) [15]. Каждый ген вследствие небольших делеций может находиться в разных полиморфных состояниях, в которых активность белковых продуктов будет различной. В том случае, если происходят мутации поверхностных рецепторов интегринов, они могут быть элиминированы Т-киллерными клетками CD8+. В некоторых случаях в тканях могут накапливаться чужеродные белки после прохождения процессинга в фагоцитирующих клетках, что может приводить к увеличению количества клеток с незавершенным фагоцитозом [16].

Активация белков острой фазы и различных медиаторов воспаления, в том числе цитокинов, приводит к фиброгенному повреждающему ответу. Это может приводить к увеличению объема коллагенового матрикса [17].

Возникновение и развитие спаечной болезни в разной степени взаимосвязано с геномными и эпигеномными предикторами, а выраженность и распространенность спайкообразования в большой степени зависит от нарушения иммунорезистентности и в некоторой степени с наличием генного полиморфизма факторов клеточной адгезии.

У пациентов, у которых в предоперационном периоде выявлен полиморфизм гена интегрин ITGA2 и HLA I класса, снижение барьерной функции фагоцитоза, снижение антиоксидантных

факторов, изменения гуморального звена иммунитета и нарушения экспрессии кластеров дифференцировки CD, являются группой риска с высокой вероятностью развития СББ. Для этих пациентов должны быть предусмотрены лечебные мероприятия по профилактике развития спаечной болезни.

ВЫВОДЫ.

1. Геномными факторами риска развития СББ является наличие полиморфизма точковых мутаций гена интегрин ITGA2. У 34,8% пациентов со спаечной болезнью брюшины развитие данной патологии может быть сопряжено не с точковыми мутациями, а другими эпигеномными факторами.

2. Выявлена взаимосвязь полиморфизма лейкоцитарных антигенов гистосовместимости I класса - HLA A9, A33, B56, B13 с высоким риском развития СББ.

3. К эпигеномным факторам, ассоциированным с риском развития СББ, относятся изменения экспрессии генов молекул адгезии (CD31+, CD54+), показателей иммунорезистентности – снижение ферментативной активности нейтрофильных гранулоцитов, наличие органоспецифических аутоантител, выраженный иммунодефицит в Т-клеточном звене, повышение цитотоксических факторов сыворотки крови – ЦИК, ПСММ, ЛЦТ.

4. Обнаружена взаимосвязь степени выраженности СББ с увеличением концентрации С-реактивного белка, гаптоглобина, и снижением церулоплазмينا, повышением высокопатогенных ЦИК и ПСММ, наличием тканеспецифических аутоантител: к коллагену, эластину, клеткам тонкого и толстого кишечника, снижением экспрессии кластеров дифференцировки CD субпопуляций Т-лимфоцитов – хелперов CD4+ и киллеров CD8+.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tommaso S, Massari S, Malvasi A, Vergara D, Maffia M, Greco M, Tinelli A. Selective genetic analysis of myoma pseudocapsule and potential biological impact on uterine fibroid medical therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2015. – Vol.19. – №:1. – P.7-12.
2. Gressner O.A., Gressner A.M. Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases // *Liver Int.*— 2008.— Vol. 28.— P. 1065-1079.
3. Филенко Б.П., Лазарев С.М. Этиопатогенез спайкообразования // *Вестник хирургии*, 2009. Том 168, №3. С.116-118.
4. Исаева Н. В., Дралюк М. Г. Современный взгляд на клиническое значение эпидурально-го фиброза после поясничных дискэктомий // *Хирургия позвоночника*. 2010. №1. С.35-45.
5. Назарова М. В., Кириллова С. В. Идиопатический фиброз легких описание болезни и клинический случай // *VetPharma*. 2014. №4 (20). С.32-38.
6. Дубровщик О. И., Мармыш Г. Г., Довнар И. С., Фридман К. М., Казеннов С. С. Спаечная кишечная непроходимость: тактика, лечение, профилактика рецидивов // *Журнал ГрГМУ*. 2012. №2 (38). С.20-23.
7. Ткаченко Л. В., Михин И. В., Минаева Е. А. Профилактика и лечение спаечной болезни малого таза при трубно-перитонеальном бесплодии // *Вестник ВолГМУ*. 2010. №1 (33). С.63-66.
8. Жалялов А.С., Баландина А.Н., Купраш А.Д.,

- Шривастава А., Шибек А.М. Современные представления о системе фибринолиза и методах диагностики ее нарушений // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2017. – Том 16. – № 1. – С. 69–82.
9. Plenz GA, Deng MC, Robenek H, Volker W (2003). «Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis». *Atherosclerosis* 166 (1): 1-11. DOI:10.1016/S0021-9150(01)00766-3. PMID 12482545
 10. Смирнов И.Е., Кустова О.В., Сорокина Т.Е., Кучеренко А.Г. Маркеры фиброзирования при хронической бронхолегочной патологии у детей // Российский педиатрический журнал. 2015. №1. С.14-20.
 11. Badra G., Lotfy M., El(Refaie A. et al. Significance of serum matrix metalloproteinase(9 and tissue inhibitor of metallo(proteinase(1 in chronic hepatitis C patients // *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*— 2010.— Vol. 57, N 1.— P. 29-42.
 12. Аллергические, коллагеновые и аутоиммунные заболевания // Диспротеинемии / Пер. с болг. (авт. коллектив: Вапцаров И. Йомтов М., Савов С., Дюкмеджиев И., Эшкенази М.). – София: Медицина и физкультура, 1978. – С. 285–295.
 13. Строев Ю.И., Чурилов Л.П., Агапов М.М. и др. Клиническая патофизиология раннего метаболического синдрома: патогенетическая роль юношеского диспитуитаризма, дисплазий соединительной ткани и аутоиммунного тиреоидита // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* – 2011. – № 3. – С. 3–15.
 14. Yann Ch., Kanaji S., Jacquelin B., Chang M., Nugent D. J., Kunicki Th. J. Transcriptional and epigenetic regulation of the integrin collagen receptor locus ITGA1-PELO-ITGA2 // *Biochim Biophys Acta.* 2007. – Vol. 1769. – N 9-10. – P. 546–558.
 15. Ванюшин Б.Ф. Эпигенетика сегодня и завтра // *Вавиловский журнал генетики и селекции,* 2013, том 17, No 4/2. С. 805 -832.
 16. Цебржинский О.И. Некоторые аспекты антиоксидантного статуса // *Физиология и патология перекисного окисления липидов, гемостаза и иммуногенеза.* - Полтава, 1992. -С. 120-155.
 17. Santamato A., Fransvea E., Dituri F. et al. Hepatic stellate cells stimulate HCC cell migration via laminin-5 production // *Clin. Sci. (Lond).* — 2011. — Vol. 121. — P. 159-168.

В.В. Бойко, О.М. Климова, Д.А. Євтушенко, Т.І. Кордон, С.В. Сушков

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ГЕНОМНИХ І ЕПІГЕНОМНИХ ПРЕДИКТОРІВ З РИЗИКОМ РОЗВИТКУ І СТУПЕНЕМ ВИРАЖЕНОСТІ СПАЙКОВОЇ ХВОРОБИ

РЕЗЮМЕ. В роботі досліджували деякі геномні і епігеномні предиктори, взаємопов'язані з ризиком розвитку і ступенем вираженості спайкової хвороби очеревини (СХО).

За допомогою методів ПЛР виявлено наявність мутацій ділянки 807 гена інтегрину ITGA2. Показано, що у 65,2% пацієнтів з СХО мали місце поодинокі (С-Т) і подвійні (Т-Т) заміни цитозину на тимін в гені інтегрину ITGA2.

Серологічне фенотипування поліморфізму лейкоцитарних алелей HLA I класу виявило високу ступінь частоти зустрічальності алелів I класу HLA A9, A33, B13 в популяційній вибірці обстежених пацієнтів зі СХО.

Виявили підвищення експресії адгезивних молекул CD31 +, CD54 +, незавершеність ендоцитозу мікроорганізмів фагоцитуючими клітинами, зниження кисневого резерву фагоцитуючих нейтрофілів, підвищення С-реактивного білка, гаптоглобіну, зниження антиоксидантного білка церулоплазміну, підвищення високопатогенних циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) і середньомолекулярних пептидів (ПСММ), наявність тканиноспецифічних аутоантитіл: до колагену, еластину, клітин тонкого і товстого кишечника. Також виявили порушення експресії кластерів диференціювання CD субпопуляцій Т-лімфоцитів - хелперів CD4 + і кілерів CD8 +.

Пацієнти, у яких в передопераційному періоді виявлено поліморфізм гена інтегрину ITGA2 і HLA I класу, зниження бар'єрної функції фагоцитозу, зниження антиоксидантних факторів, зміни гуморальної ланки імунітету і порушення експресії кластерів диференціювання CD, є групою ризику з високою ймовірністю розвитку СХО. Для цих пацієнтів мають бути передбачені лікувальні заходи з профілактики розвитку спайкової хвороби.

Ключові слова: фіброгенез; спайкова хвороба очеревини; мутації гена інтегрину ITGA2; поліморфізм алелів I класу; HLA імунний дисбаланс.

V.V. Boyko, O.M. Klimova, D.A. Evtushenko, T.I. Kordon, S.V. Sushkov

INTERCONNECTION OF GENOMIC AND EPIGENOMIC PREDICTORS ASSOCIATED WITH THE RISK OF DEVELOPMENT AND THE SEVERITY OF ADHESIVE PERITONEAL DISEASE

SUMMARY. Some genomic and epigenomic predictors associated with the risk of development and the severity of adhesive peritoneal disease (APD) were investigated in this work.

The presence of mutations in region 807 of the integrin ITGA2 gene was detected using PCR methods. It was shown that 65.2% of patients with APD had single (C-T) and double (T-T) cytosine substitutions for thymine.

Serological phenotyping of polymorphism of leukocyte alleles HLA class I revealed a high degree of frequency of occurrence of class I alleles HLA A9, A33, B13 in a population sampling of patients with APD.

Increased adhesive molecules CD31 +, CD54 +, endocytosis incompleteness of microorganisms by phagocytic cells, reduced oxygen reserve of phagocytic neutrophils, increased acute-phase proteins - C-reactive protein, haptoglobin, reduced antioxidant protein ceruloplasmin, increased levels of immune circulating complexes and medium molecular weight peptides, the presence of tissue-specific autoantibodies: to collagen, elastin, cells of the small and large intestines.

Violation of the expression of CD differentiation clusters of helper and killer subpopulations of T-lymphocytes was also detected.

Patients who have identified ITGA2 and HLA class I integrin gene polymorphism in the preoperative period, reduced phagocytosis barrier function, reduced antioxidant ceruloplasmin, humoral sensitization, and impaired expression of CD differentiation clusters are at high risk of developing APD. For these patients, therapeutic measures should be taken to prevent the development of adhesive disease.

Key words: fibrogenesis; peritoneal commissural disease; integrin ITGA2 gene mutations; HLA class I alleles polymorphism; immune imbalance.

Надійшло до редакції 01.12.2018р.

Підписано до друку 21.12.2018р.