

7. Молчанова Л.В. Молекулярные аспекты полиорганной недостаточности: молекулы адгезии / Л.В.Молчанова, В.В. Мороз // Реаниматология и анестезиология. – 2005. – №2. – С. 10–16.

ENDOTOXIN -DETERMINATED SERUM ACTIVITY AND
CONTENT OF CERTAIN PROTEIN FRACTIONS OF BLOOD IN
PATIENTS WITH CHRONIC PANCREATITIS AND CHRONIC
OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

N.M. Zhelezniakova

Kharkiv National Medical University

It is shown that in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is formed the endogenous intoxication syndrome, the main component of which is the increase of middle molecules. In case of combined course of chronic pancreatitis and COPD severity of the syndrome to a greater extent due to the accumulation of toxin-bearing fractions of albumin and globulin, which increases may lead to the formation of autoimmune reactions.

УДК 616.36-004.2:575.191

Взаимосвязь полиморфизма гена ADIPOR2 с
прогрессированием неалкогольной жировой
болезни печени

Е.В. Колесникова

ГУ «Институт терапии им. Л.Т. Малой АМН Украины» (Харьков)

Рецепторы адипонектина (ADIPOR) были клонированы в 2003 году, предполагалось, что их экспрессия тесно связана с инсулинорезистентностью [1]. Исследования Kaser и соавт. показали, что экспрессия рецепторов адипонектина положительно коррелирует с чувствительностью к инсулину. Варианты ADIPOR также могут быть связаны не только с ИР, но и с ожирением, и накоплением жира в печени [2, 3].

Рецепторы адипонектина, возможно, в значительной степени связаны с прогрессированием неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) поскольку инсулинорезистентность и избыточное накопление жира приводят к истощению функциональной активности «стеатозной» печени.

Некоторые исследования показали, что полиморфизмы генов рецепторов 1 и 2 адипонектина (ADIPOR1, ADIPOR2) связаны с уровнем инсулина натощак и после приема пищи, а также массой тела. Поэтому, исходя из патофизиологических механизмов развития НАЖБП, мы предположили, что полиморфизм генов ADIPOR может иметь некоторое отношение к прогрессированию НАЖБП. Целью исследования явилась оценка распространенности аллелей и генотипов ADIPOR2 и выявление ассоциации генетического полиморфизма с прогрессированием НАЖБП.

Работа выполнена в рамках НИР отдела заболеваний печени и желудочно-кишечного тракта «Разработать способы выявления и профилактики неалкогольной жировой болезни печени на основе изучения клинических, фено- и генотипических особенностей у пациентов с метаболическим синдромом», номер государственной регистрации 0110U002879.

Материалы и методы исследования.

Объектом исследования были 102 человека с НАЖБП, средний возраст которых составил (43,6±3,8) года, из них 58 мужчин и 38 женщин. У 82 (85,4%) пациентов имела место избыточная масса тела, у 54 (56,2%) – диагностировали нарушения углеводного обмена в виде нарушения толерантности к углеводам или сахарного диабета 2 типа (СД-2). Клинические признаки артериальной гипертензии были выявлены у 52 (54,2%) пациентов с НАЖБП, дислипидемии – у 48 (50,0%), ишемической болезни сердца – у 34 (35,4%). У большинства обследованных пациентов верифицировано наличие метаболического синдрома, согласно критериям IDF, 2005. Контрольную группу составили 20 здоровых лиц.

Всем пациентам, включенным в исследование, на основании проведенной компьютерной томографии (КТ) установлен диагноз стеатоз печени, по критериям, предложенным Vimbbaum V. et. al, 2007.

Все пациенты употребляли менее 20 г/день этанола, не имели признаков хронического вирусного В, С, Д гепатита; аутоиммунного и лекарственного гепатита, болезни Коновалова-Вильсона, идиопатического гемохроматоза, врожденной недостаточности α 1-антитрипсина.

Молекулярно-генетическое тестирование ДНК выполняли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови по стандартному протоколу с использованием набора реагентов DIAtom™ DNA Prep Prep 200 (производство ООО «Лаборатория ИзоГен»). Принцип действия набора «DIAtom™ DNA Prep» основан на использовании лизирующего агента с гуанидинтиоцианатом, который предназначен для разрушения клеток, солюбилизации клеточного дебриса, а также денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии лизирующего реагента ДНК активно сорбируется на NucleoS™ сорбенте, затем легко отмывается от солей и белков спиртовым раствором. ДНК, элюированная из сорбента Экстра-Геном™ или чистой водой, может исследоваться различными методами.

Методической основой генотипирования являлась тетрапраймерная полимеразная цепная реакция с использованием двух внутренних и внешних аллель-специфичных праймеров.

Метод позволяет амплифицировать фрагменты ДНК различной длины, соответствующие альтернативным аллелям. Каждый внешний праймер в сочетании с соответствующим ему внутренним праймером инициирует амплификацию аллель-специфичных фрагментов (231 н.п. – норма и 1+4 – 66 н.п. – мутация).

Дизайн олигонуклеотидных праймеров для проведения полимеразной цепной реакции осуществлялся посредством программы Vector NTI (“Invitrogen”) и информационного ресурса NCBI.

Методом ПЦР проводилось определение нуклеотидной последовательности гена ADIPOR1 666089 в автоматическом режиме на термоциклерах “Терцик”(“ДНК-технология”), GeneAmp® 9700” с 96-ячеечным блоком (“Applied Biosystems”) с

использованием коммерческого набора реактивов GenePak@ PCR Core «Изоген» в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя.

Температурно-часовой режим ПЦР оптимизирован для амплификации данной нуклеотидной последовательности: иницирующая денатурация – 95 °С – 2 мин – 1 цикл; денатурация – 95 °С – 30 с; отжиг праймеров – 56 °С – 15 с; 40 циклов; элонгация – 74 °С – 30 с; завершающая элонгация – 74 °С – 2 мин – 1 цикл.

Детекция ПЦР-продуктов проводилась с помощью горизонтального электрофореза в пластине 2,5% агарозного геля с добавлением бромистого этидия – специфического интеркалирующего флуоресцентного ДНК(РНК)-красителя – с использованием стандартного трис-боратного буфера при напряженности поля ~20 В/см в течение 30 минут. Поглощая ультрафиолетовый свет с максимальной длиной волны 256 нм, бромид этидия, связанный с участком ДНК (ампликоном), способен в соответствии с правилом Стокса флуоресцировать, что регистрируется в видимом спектре (610–620 нм) в виде оранжевой полоски. Получаемые результаты электрофореза ампликонов оценивали в проходящем ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе TFP-M/WL (“VILBER LOURMAT”). Фиксирование результатов проводилось посредством стандартной гель-документирующей системы с использованием программного обеспечения Vitran Photo.

Количественное определение С-реактивного протеина (СРП) осуществлялось при помощи набора реактивов DRG (США), определение уровня гиалуроновой кислоты (ГК) в сыворотке крови - методом твердофазного ферментного анализа с использованием набора Corgenix (США).

Для статистической обработки данных использовался пакет программ обработки данных общего назначения Statistica for Windows версии 6.0. На первом этапе расчета были получены дискриптивные (описательные) статистики для показателей, измеряемых в количественной шкале. Такими характеристиками являются: медиана и среднее значение как меры положения; стандартное отклонение и квартили как меры рассеивания; минимальное и максимальное значение как показатель размаха

выборки. Распределения всех анализируемых количественных показателей достоверно отличались от нормального (критерий Колмогорова-Смирнова), поэтому в тексте дальнейшего изложения для их характеристики преимущественно использовались медиана (50-й процентиль) и 25-й и 75-й процентиля (верхний и нижний квартили). Для описания качественной вариации традиционно использовали частоту встречаемости признака. Для исследования влияния независимой переменной на зависимую применялись непараметрические аналоги дисперсионного анализа - критерий Краскела-Уоллиса и медианный тест. Для получения достоверности различий между группами, представленными альтернативной вариацией, использовался точный метод Фишера.

Результаты исследования и их обсуждение.

У обследованных пациентов с НАЖБП в сравнении с контрольной группой, репрезентативной по полу и возрасту, отмечались достоверные изменения маркера хронического воспаления - повышение СРП и уровня ГК, $p < 0,05$.

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера ADIPOR2 (rs 767870) показал, что у пациентов НАЖБП превалирует Т аллель и генотип ТТ (табл. 1).

Таблица 1 – Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера ADIPOR2 (rs 767870) у больных НАЖБП.

| Аллели и генотипы | Абс. значение (%) |
|-------------------|-------------------|
| Аллель Т | 98 (96,0) |
| Аллель С | 25 (24,5) |
| Генотип ТТ | 77 (75,5) |
| Генотип ТС | 21 (20,6) |
| Генотип СС | 4 (39,2) |

Изучение содержания в сыворотке крови пациентов с НАЖБП СРП и ГК показало, что у пациентов носителей ТТ генотипа уровень СРП составил $(11,23 \pm 2,72)$ мг/л, а уровень ГК

– (42,06±14,44) нг/мл; у носителей ТС генотипа аналогичные показатели имели значения (9,84±2,39) мг/л и (34,04±13,48) нг/мл, соответственно. Незначительные изменения неинвазивных маркеров, отражающих прогрессирование НАЖБП, отмечались у носителей СС генотипа, у которых уровень СРП составил (10,41±2,77) мг/л, ГК – (33,07±11,06) нг/мл, соответственно (табл. 2).

Таблица 2 – Сравнительная характеристика содержания в сыворотке крови СРП и ГК у больных НАЖБП в зависимости от генотипов.

| Показатель | Статистические показатели | | | | | | |
|------------|---------------------------|---------|---------|----------|--------------|---------------|--------------|
| | среднее | медиана | минимум | максимум | нижн. кварт. | верхн. кварт. | станд. откл. |
| ТС | | | | | | | |
| СРП (мг/л) | 9,84 | 8,69 | 6,31 | 13,14 | 7,9 | 12,06 | 2,39 |
| ГК(нг/мл) | 34,04 | 37,8 | 12,19 | 57,12 | 22,21 | 42,19 | 13,48 |
| ТГ | | | | | | | |
| СРП (мг/л) | 11,23 | 11,89 | 5,84 | 16,5 | 8,44 | 13,54 | 2,72 |
| ГК(нг/мл) | 42,06 | 45,99 | 13,79 | 65,2 | 29,46 | 55,03 | 14,44 |
| СС | | | | | | | |
| СРП (мг/л) | 10,41 | 10,58 | 7,63 | 12,87 | 8,03 | 12,80 | 2,77 |
| ГК(нг/мл) | 33,07 | 36,42 | 17,14 | 42,31 | 25,94 | 40,21 | 11,06 |

Следует обратить внимание на то, что различия показателей СРП и ГК в зависимости от выделенных генотипов были достоверны (табл. 3).

Таблица 3 – Достоверность различий (p) уровней СРП и ГК у больных НАЖБП в зависимости от генотипов ТС, ТГ, СС (критерий Краскела-Уоллиса).

| Показатель | Уровень значимости |
|------------|--------------------|
| СРП | 0,020226 |
| ГК | 0,01121 |

Учитывая, что по мере прогрессирования НАЖБП нарастает сывороточная концентрация неинвазивных биомаркеров ГК и СРП, что было продемонстрировано в исследованиях Hiroyuki K. 2006 [4], а также исходя из ранее полученных собственных данных [5], можно предположить, что повышенные уровни ГК и СРП у пациентов с НАЖБП сопряжены не только с носительством Т аллеля, но и являются косвенным доказательством более тяжелого течения НАЖБП.

Нами показано, что пациенты с НАЖБП, являющиеся носителями минорного аллеля ADIPOR2 rs767870, в сравнении с носителями ТТ и ТС генотипа, имеют меньшую вероятность прогрессирования НАЖБП, что подтверждается уровнями СРП и ГК.

С одной стороны, одним из механизмов прогрессирования «жирной» печени считается наличие воспаления в условиях ИР. С другой, адипоцитокнины – секреторные вещества, реализующие свои эффекты при ИР и гиперинсулинемии поддерживают реакции воспаления и фиброз, что «утяжеляют» болезнь, т.е. способствуют ее прогрессивному течению [6]. В этой связи диагностическая ценность СРП, продуцируемого адипоцитокнинами, и ГК, играющей структурную роль соединительнотканного матрикса и вырабатываемую фибробластами, приобретает значение в качестве индивидуального теста для мониторинга функции печени и подбора дифференцированной терапии НАЖБП.

В нашем исследовании продемонстрирована прямая связь между СРП, ГК и генотипом ТТ ADIPOR2 (rs 767870), что дает основание считать, что наличие у пациентов НАЖБП генотипа ТТ ADIPOR2 (rs 767870) ассоциировано с высоким риском прогрессирования НАЖБП, подтверждая возможную этиологическую (решающую) роль генетического полиморфизма в развитие воспаления, а также прогрессирования заболевания вплоть до тяжелых стадий НАЖБП.

При этом, в опубликованных работах представлены разноречивые результаты. Так Lopez-Vermejo A. с коллегами утверждает, что экспрессия ADIPOR2, коррелирует с уровнем инсулина и активностью трансаминаз у пациентов сахарным диабетом 2 типа [7, 8]. Результаты, полученные Halvatsiotis, выявили

наличие связи ADIPOR2 с развитием коронарных событий [9], в то время как работа, выполненная под руководством Kotronen A., показала ассоциацию ADIPOR2 (rs 767870) с аккумуляцией жира в печени [10]. По данным других исследований [11, 12] ни один из SNP в ADIPOR2 не был связан с развитием СД-2 и НАЖБП.

Нами не найдено публикаций относительно взаимосвязей полиморфного гена ADIPOR2 rs767870 с прогрессированием НАЖБП. Тем не менее, результаты исследования показали, что у пациентов, которые являются носителями аллеля Т в однонуклеотидном полиморфизме (SNP) intron Т>С rs 767870 гена ADIPOR2, развитие НАЖБП ассоциировано с маркерами прогрессирования – уровнем СРП и ГК.

Вероятно, еще одним механизмом, который ответственен за стимуляцию (ингибирование) воспалительных и фибротических процессов при НАЖБП, является генетическая детерминированность, ассоциированная с полиморфизмом ADIPOR2 (rs 767870).

Отсутствие ассоциаций между активностью трансаминаз, липидным и углеводным профилем и генотипами полиморфного гена ADIPOR2 rs 767870 у пациентов с НАЖБП, вероятно, обусловлены тем, что выбранный SNP мог иметь не очень хорошее покрытие для изучения вариаций гена. С другой стороны, каждый из генов, связанных с развитием НАЖБП, возможно, играет небольшую роль в патогенезе заболевания, а различные НАЖБП-ассоциированные гены могут в совокупности значительно повысить риск развития и прогрессирования НАЖБП.

Выводы.

Предрасположенность к развитию и прогрессированию НАЖБП у пациентов, имеющих метаболические нарушения, обусловлена достоверной ассоциацией аллелей и генотипов полиморфного маркера гена ADIPOR2.

Полученные данные подтверждают генетическую детерминированность прогрессирования НАЖБП. Определение общей генетической природы при НАЖБП и связанных с ней ожирением, СД-2, дислипидемией, позволит не только на доклиническом этапе выявлять группы риска в этой категории пациентов, но и своевременно начать превентивные мероприятия

по предупреждению прогрессирования НАЖБП, на основании выявления носителей T аллеля в SNP 767870 ADIPOR2. Такой индивидуализированный подход и комплексная оценка необходимы для снижения частоты возникновения осложнений НАЖБП, связанных с прогрессированием в цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному, а также для улучшения качества жизни этого контингента больных.

Перспективы дальнейших исследований в этом направлении должны базироваться на изучении роли генов-кандидатов развития и прогрессирования НАЖБП на большем объеме выборки, их связи с различными метаболическими параметрами, что позволит уточнить роль генов, в т.ч. ADIPOR2 в формировании НАЖБП.

1. Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training / *M. Blüher, Jr. J. Bullen, J.H. Lee [et al.]* // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2006. – №91. – P. 2310–2316.
2. Adiponectin and its receptors in nonalcoholic steatohepatitis / *S. Kaser, A. Moschen, A. Cayon [et al.]* // *Gut.* – 2005. – V.54(1). – P. 117–121.
3. Association of ADIPOR2 gene variants with cardiovascular disease and type 2 diabetes risk in individuals with impaired glucose tolerance: the Finnish Diabetes Prevention Study / *N. Siitonen, L. Pulkkinen, J. Lindström [et al.]* // *Cardiovascular Diabetology.* – 2011. – V. 10. – P. 83.
4. Hyaluronic acid levels can predict severe fibrosis and platelet counts can predict cirrhosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease / *K. Hiroyuki, H. Etsuko, Y. Satoru [et al.]* // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – V.21. – P. 1459–1465.
5. *Kolesnikova O.V.* Diagnostic value of the combined biochemical markers for establishment of the early stages of nonalcoholic steatohepatitis / *O.V. Kolesnikova, V.D. Nemtsova, I.D. Chupin* // *EASL Monothematic Conference “Liver fibrosis: common and organ specific mechanism”.* – Petersburg. – 2011. – P. 115.
6. Replacement of histological findings: Serum hyaluronic acid for fibrosis, high sensitive C-reactive protein for necroinflammation in

- chronic viral hepatitis / *S. Yilmaz, K. Bayan, Y. Tüzün [et al.] // Int. J. Clin. Pract.* – 2007. – Vol. 61. – P. 438–443.
7. Association of ADIPOR2 with liver function tests in type 2 diabetic subjects / *A. Lopez-Bermejo, P. Botas-Cervero., F. Ortega-Delgado [et al.] // Obesity.* – 2008. – V.16. – P. 2308–2313.
 8. Genetic Analysis of ADIPOR1 and ADIPOR2 Candidate Polymorphisms for Type 2 Diabetes in the Caucasian Population / *M. Vaxillaire, A. Dechaume, V. Vasseur-Delannoy [et al.] // Diabetes.* – 2006. – V.55(3). – P. 856–861.
 9. *Halvatsiotis I.* Genetic variation in the adiponectin receptor 2 (ADIPOR2) gene is associated with coronary artery disease and increased ADIPOR2 expression in peripheral monocytes / *I. Halvatsiotis, P.C. Tsiotra, I. Ikonomidis // Cardiovasc. Diabetol.* – 2010. – V. 9. – P. 10.
 10. Genetic variation in the ADIPOR2 gene is associated with liver fat content and its surrogate markers in three independent Cohorts / *A. Kotronen, H. Yki-Jaärvinen, A. Aminoff [et al.] // European Journal of Endocrinology.* – 2009. – V. 160. – P. 593–602.
 11. The association of SNPs in ADIPOQ, ADIPOR1, and ADIPOR2 with insulin sensitivity in a cohort of adolescents and their parents / *L.J. Rasmussen-Torvik, J.S. Pankow, Jr. Jacobs [et al.] // Hum. Genet.* – 2009. – V.125(1). – P. 21–28.
 12. *Hardy J.* Genomewide association studies and human disease / *J. Hardy, A. Singleton // N. Engl. J. Med.* – 2009. – V.360(17). – P. 1759–1768.

**ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА ADIPOR2 З
ПРОГРЕСУВАННЯМ НЕАЛКОГОЛЬНОЇ ЖИРОВОЇ ХВОРОБИ
ПЕЧІНКИ**

О.В. Колеснікова

ДУ «Інститут терапії ім. Л.Т. Малої АМН України» (Харків)

У статті представлені результати, які свідчать про те, що існує схильність до прогресування НАЖХП у пацієнтів, що мають метаболічні порушення. Це обумовлено достовірною асоціацією алелів і генотипів поліморфного маркера гену ADIPOR2 у пацієнтів з НАЖХП. Встановлено, що SNP в інtronі 5 гену ADIPOR2

асоційовано у хворих на НАЖХП з підвищенням неінвазивних маркерів прогресування захворювання - С-реактивним протеїном і гіалуронової кислотою. Знання особливостей генотипу хворих НАЖХП необхідно для вибору індивідуального алгоритму лікування.

RELATIONSHIP GENE POLYMORPHISM OF ADIPOR2 WITH THE PROGRESSION NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

O.V. Kolesnikova

GI “L. T. Malaya Therapy Institute of the NAMSU”

The article presents results which indicate that there is a predisposition to progression NAFLD in patients with metabolic disorders. This is due to the reliable association of alleles and genotypes of polymorphic gene markers ADIPOR2 in patients with NAFLD. It is established that the SNP in intron 5 of the ADIPOR2 gene associated with NAFLD patients an increase non-invasive markers of disease progression - C-reactive protein and hyaluronic acid. Knowledge of the characteristics of NAFLD patients with genotype necessary for the choice of individual algorithm for treatment.

УДК 616.329-002.2:611-018.5:577.115

Ліпідний профіль сироватки крові при ерозивному гастродуоденіті у хворих з різною масою тіла

Т.В. Майкова, Л.В. Демешкіна, І.А. Сиротенко
ДУ “Інститут гастроентерології НАМН України” (Дніпропетровськ)

Актуальність проблеми. Епідеміологічні дослідження, які проведені на великій популяції населення, встановили високий ризик розвитку ерозій у СО ГДЗ у хворих з ожирінням [1, 2]. Проте, досліджень, спрямованих на вивчення особливостей формування,