

Б.І. Третяк, Г.В. Макух, Д.В. Заставна

АНАЛІЗ ПОЛІМОРФНОГО ЛОКУСУ АРА-1 ГЕНА ІНСУЛІНОПОДІБНОГО ФАКТОРУ РОСТУ-II (IGF-II) ЯК МОЖЛИВОГО МАРКЕРА ПОРУШЕНЬ ЕМБРІОНАЛЬНОГО РОЗВИТКУ ТА М'ЯЗОВОЇ СЛАБКОСТІ У ЛЮДИНИ

ДУ "Інститут спадкової патології НАМН України",
м. Львів, Україна

Інсуліноподібні фактори росту (IGFs) — аутокринні регулятори клітинної проліферації та диференціації. Одним із найбільш вивчених регуляторів раннього ембріонального та плацентарного розвитку людини є інсуліноподібний фактор росту-II (IGF-II) [10]. Він стимулює ріст трофобласта, розвиток і дозрівання плаценти, а його дисфункція може бути однією з причин мимовільних викиднів [1, 6].

З іншого боку, IGFs мають паракринні властивості. Зокрема, IGF-II має нейротропні властивості, а за окремими повідомленнями [11] його введення *in vivo* продовжує життєздатність нервових клітин, навіть у період їх природної смерті. IGF-II відіграє роль в патогенезі нейродегенеративних розладів, таких як хвороба Альцгеймера [7] та при різного роду м'язових ураженнях [4]. IGF-II має цитопротекторну дію проти цитокін-індукованого клітинного апоптозу [8, 9, 14]. При цьому чисельні роботи [1, 5, 15] присвячені вивченню ауто- та паракринних властивостей IGF-II в асоціації з особливостями однонуклеотидних поліморфізмів (SNP — Single Nucleotide Polymorphism) у різних ділянках *IGF-II*-гену. Очевидно, що будь-який точковий поліморфізм, що перешкоджає експресії *IGF-II*-гену, чи призводить до його гіперекспресії, може мати згубні наслідки для повноцінного росту та розвитку організму людини внутрішньоутробного, чи постнатального періоду. Одним із функціональних SNP є поліморфний локус Ара-1 в екзоні 9 гена *IGF-II* [12, 13].

Виходячи з вище сказаного, метою даного дослідження було вивчення генотипів поліморфного локусу Ара-1 гена *IGF-II* у пацієнтів з м'язовою слабкістю та в клітинах ворсин хоріону мимовільно перерваних ембріонів людини.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Пацієнти (n=146) з м'язовою слабкістю та підвищеним рівнем креатинкінази проходили обстеження у Львівському міжобласному медико-генетичному центрі ДУ "Інститут спадкової патології АМНУ", Тернопільському, Закарпатському медико-генетичних кабінетах та перебували на стаціонарному лікуванні у Львівській обласній дитячій клінічній лікарні та у Львівській обласній спеціалізованій клінічній дитячій лікарні. Всім пацієнтам виключено діагноз прогресуючої м'язової дистрофії Дюшена–Беккера та спінальної аміотрофії. Клітини ворсин хоріона (n=107) отримані шляхом препарування біологічного матеріалу мимовільно перерваних вагітностей, скерованого для генетичного дослідження в ДУ "Інститут спадкової патології АМНУ" з гінекологічних відділень клінік м. Львова (Обласної, Перинатального центру та Лікарні швидкої допомоги). Гестаційний вік мимовільно перерваних ембріонів складав 5–10 тижнів. Контроль склали практично здорові індивіди (n=40) без порушень функції м'язів та без обтяженого акушерсько-генетичного анамнезу.

Проводили виділення та очистку ДНК із лейкоцитів периферійної крові та клітин ворсин хоріона методом ферментативного розщеплення та подальшої фенольної екстракції або методом висолювання. На подальших етапах дослідження проводили ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro*, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері "Терцик" ("ДНК-технологія", Росія). Використовували ендонуклеазу рестрикції, термостабільну Taq-полімераза та олігонуклеотидні праймери ("Fermentas", м. Вільнюс, Литва). Проводили електрофоретичне розділення продуктів ПЛР та аналіз поліморфізму довжин рестриктних фрагментів (ПДРФ) у 2% агарозному гелі. Гелі фарбували бромистим етидієм та сканували в ультрафіолетовому транслюмінаторі [3]. На електрофореграмі (рис.) у випадку наявності сайту рестрикції візуалізується фрагмент вагою 229 п.н. (генотип В/В). При відсутності сайту рестрикції ампліфікат залишається не зміненим і має розмір 292 п.н. (генотип А/А). У випадку гетерозиготного носійства поліморфізму Ара-1 екзону 9 гена *IGF-II* візуалізуються два фрагменти 292 та 229 п.н. (генотип А/В).

Статистичний аналіз проводили з використанням критерію Пірсона χ^2 та коефіцієнта шансів

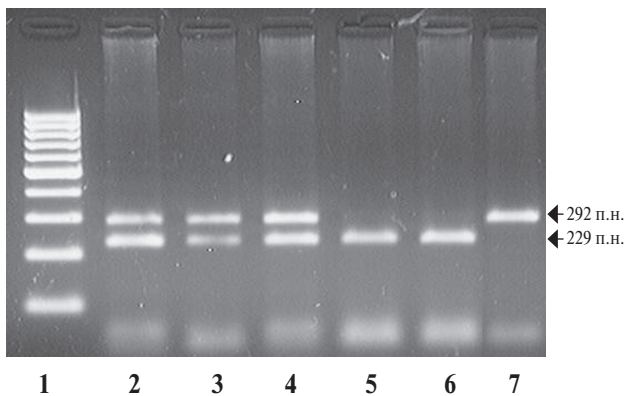


Рис. Аналіз поліморфного локусу Ара-1 екзон 9 гена *IGF-II*, 2% агарозний гель: 1 – Ladder 100 bp; 2–4 – генотип АВ; 5, 6 – генотип ВВ; 7 – генотип АА

(OR – odds ratio). Для всіх статистичних тестів якості критерію статистичної достовірності розглядали 95%-й рівень значущості.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведено молекулярно-генетичний аналіз поліморфного локусу Ара-1 екзону 9 гена *IGF-II* в отриманих зразках ДНК. Встановлений розподіл генотипів локусу Ара-1 гена *IGF-II* у пацієнтів з м'язовою слабкістю представлено у табл. 1. Отримані результати порівнювали з контрольною групою практично здорових осіб. Як видно, у контролі з найнижчою частотою зустрічається генотип АА – його частота складає 10%, а з найвищою частотою – генотип ВВ поліморфного локусу Ара-1 гена *IGF-II*. Гетерозиготний варіант досліджуваних алелів (генотип – АВ) виявлено у 22,5% осіб контрольної групи. Частота алелів А та В у контрольній групі становила 0,21 й 0,79, відповідно. Щодо розподілу генотипів в осіб контрольної групи, встановлено відхилення від рівноваги Харді–Вайнберга у сторону незначного браку гетерозиготного генотипу АВ.

Як видно з даних приведених у табл. 1, статистичне опрацювання результатів з обчислен-

ням критеріїв Пірсона χ^2 показало вірогідно значне зниження частоти генотипу ВВ та вірогідно значне підвищення частоти АВ генотипу у дослідній групі, порівняно з контролем. Більше того, підрахунок коефіцієнта OR показав, що наявність генотипу АВ вірогідно підвищує ризик розвитку м'язової слабкості більше, ніж у 2 рази (OR=2,3359, CI – 1,0366–5,2636, $p<0,05$).

На підставі отриманих результатів, очевидно, що генотипом “агресором” у групі пацієнтів з м'язовою слабкістю є АВ генотип, а протекторним генотипом є генотип ВВ поліморфного локусу Ара-1 гена *IGF-II*. За частотою генотипу АА група пацієнтів з м'язовою слабкістю не відрізнялася від контрольної групи здорових осіб. Не встановлено вірогідних відмінностей щодо частот алелів між контрольною та дослідною групою. Розподіл генотипів у дослідній групі пацієнтів із м'язовою слабкістю та підвищеними рівнями креатинкінази відповідав рівновазі Харді–Вайнберга.

Наступним етапом роботи було вивчення особливостей розподілу генотипів локусу Ара-1 гена *IGF-II* в мимовільно перерваних ембріонів людини на ранніх етапах онтогенезу. Як вже зазначалося, вивчали ДНК, отриману з клітин ворсин хоріона. Всього досліджено 107 мимовільно перерваних ембріонів. Отримані результати представлені у табл. 2.

Як видно з даних наведених у табл. 2, вірогідно значима різниця між контрольними та дослідними показниками спостерігалася за частотою генотипів ВВ та АВ. Щодо генотипу АА поліморфного локусу Ара-1 гена *IGF-II*, то його частота у ДНК мимовільно елімінованих ембріонів не відрізнялася від контрольної групи здорових осіб. Отже, як і у випадку осіб з м'язовою слабкістю, мимовільно перервані ембріони характеризувалися вірогідно значимо підвищеною частотою АВ генотипу, вірогідно значимо зниженою частотою ВВ генотипу у

Таблиця 1

Розподіл генотипів локусу Ара-1 гена *IGF-II* у пацієнтів з м'язовою слабкістю

Генотип	Контрольна група, n=40		Дослідна група I, n=46		χ^2	p
	n	%	n	%		
ВВ	27	67,5	72	49,3	4,17	<0,05
АВ	9	22,5	59	40,4	4,34	<0,05
АА	4	10,0	15	10,3	0,00256	>0,05

Розподіл генотипів локусу Ара-1 гена інсуліноподібного фактора росту-II в клітинах ворсин хоріона мимовільно перерваних ембріонів людини

Генотип	Контрольна група, n=40		Дослідна група II, n=107		χ^2	p
	n	%	n	%		
BB	27	67,5	22	20,6	28,87	<0,001
AB	9	22,5	74	69,2	25,17	<0,001
AA	4	10,0	11	10,2	0,00249	>0,05

порівнянні з контрольною групою. Тобто, і для даної дослідної групи генотипом — агресором є генотип АВ, а генотипом-протектором є генотип ВВ. Встановлено вірогідно вищу частоту алеля А у генетичному матеріалі самовільно елімінованих ембріонів у порівнянні із його поширеністю в осіб контрольної групи. У результаті проведеного аналізу відповідності отриманого розподілу генотипів рівновазі Харді–Вайнберга, встановлена вища ніж теоретично очікувана частота гетерозиготного генотипу АВ. Очевидно, ембріони із такими генотипом частіше елімінуються у порівнянні із зародками з гомозиготними генотипами АА чи ВВ поліморфного локусу Ара-1 гена *IGF-II*. Підрахунок коефіцієнта OR підтвердив, що наявність генотипу АВ у зародка вірогідно підвищує ризик мимовільного переривання вагітності майже у 8 разів (OR=7,7239, CI — 3,3079–18,035, p<0,01). Отримані результати можуть пояснювати й брак гетерозигот у контрольній вибірці.

Представлені вище результати спонукали нас порівняти між собою групу пацієнтів з м'язовою слабкістю та мимовільно перервані ембріони людини по частоті досліджуваних генотипів локусу Ара-1 гена *IGF-I*. Отримані результати представлені у табл. 3.

Як свідчать дані, наведені у табл. 3, за частотою ВВ та АВ генотипів досліджувані групи вірогідно значимо відрізнялися між собою (p<0,001). Як і у випадку порівняння із контрольною групою (табл. 2) у мимовільно перерваних ембріонів при вірогідно значимому підвищенні частоти генотипу-агресора АВ спостерігали вірогідно значиме зниження генотипу-протектора ВВ, порівняно з групою пацієнтів з м'язовою слабкістю. Такі результати є логічними, оскільки до дослідної групи I, як і до контрольної вибірки увійшли життєздатні індивіди.

Підсумовуючи отримані результати, ми погоджуємося з іншими дослідниками, що *IGF-II* має беззаперечне значення для повноцінного росту та розвитку людського організму на різних етапах онтогенезу. При цьому, ауто- та паракринна дія *IGF-II* асоціюється з особливостями розподілу точкових нуклеотидних поліморфізмів у різних ділянках *IGF-II*-гену, і як підтверджують отримані нами дані, беззаперечно важливим при цьому є регіон Ара-1.

Ген *IGF-II* відноситься до імпринтованих генів (від англ. imprint — відбиток), що передбачає не традиційно біалельну, а моноалельну експресію гена, в залежності від кого (батька,

Таблиця 3

Порівняння особливостей розподілу генотипів локусу Ара-1 гена *IGF-II* в групі мимовільно перерваних ембріонів людини та в групі пацієнтів з м'язовою слабкістю

Генотип	Дослідна група I*, n=146		Дослідна група II**, n=107		χ^2	p
	n	%	n	%		
BB	72	49,3	22	20,6	21,86	<0,001
AB	59	40,4	74	69,2	20,46	<0,001
AA	15	10,3	11	10,2	0,030	>0,05

Примітки. * — Дослідна група I — ДНК пацієнтів з м'язовою слабкістю. ** — Дослідна група II — ДНК мимовільно перерваних ембріонів.

чи матері) отриманий цей алель [1, 3, 6]. Втрата імпринтингу з тих, чи інших причин призводить до змін експресії відповідного гена. У зв'язку з цим ми не виключаємо, що особливості розподілу генотипів Ара-1 *IGF-II*-гена у досліджуваних нами групах пацієнтів з м'язовою слабкістю та в клітинах ворсин хоріона мимовільно перерваних вагітностей асоціюються саме з механізмами втрати імпринтингу, що передбачає необхідність поглиблення даних досліджень.

Отримані нами результати щодо розподілу SNP Ара-1 *IGF-II*-гена у мимовільно перерваних ембріонів людини узгоджуються з результатами, отриманими J. Chen et al. [2]. Разом з тим, J. Chen et al. довели кореляцію між втратою імпринтингу та хромосомними аномаліями мимовільно перерваних абортусів. Враховуючи те, що хромосомні аномалії ембріонів домінують у спектрі причин ранніх репродуктивних втрат ми не виключаємо, що вірогідне підвищення частоти критичних генотипів Ара-1 *IGF-II*, яке ми спостерігали в групі мимовільно перерваних ембріонів може обумовлюватися саме хромосомними аномаліями обстежуваних ембріонів.

Ми також не виключаємо, що наявність певних SNP *IGF-II*-гена спричиняється до втрати *IGF-II* цитопротекторної дії проти цитокін-індукованого клітинного апоптозу (згідно з даними J. Petrik et al. [9], B.A. Narayanan et al. [8], C.E. Stewart et al. [14]), що очевидно також може спричинятися до мимовільного переривання вагітності.

ВИСНОВКИ

1. Молекулярно-генетичний аналіз поліморфного локусу Ара-1 екзону 9 гена *IGF-II* показав вірогідно значиме зниження частоти генотипу ВВ та вірогідно значиме підвищення частоти АВ генотипу у групі пацієнтів із м'язовою слабкістю та підвищеним рівнем креатинінази, порівняно з контролем.

2. Генетичний матеріал самовільно елімінованих ембріонів людини характеризувався вірогідно підвищеною частотою АВ генотипу та значимо зниженою частотою ВВ генотипу у порівнянні з контрольною групою та групою осіб із м'язовою слабкістю.

3. Наявність генотипу АВ поліморфного локусу Ара-1 екзону 9 гена *IGF-II* вірогідно підвищує ризик розвитку м'язової слабкості більше, ніж у два рази (OR=2,34) та мимовільного переривання вагітності майже у вісім разів (OR=7,72).

4. Встановлене у контрольній групі відхилення від рівноваги Харді–Вайнберга, у сторону незначного браку гетерозиготного генотипу АВ може бути спричинене тим, що ембріони із таким генотипом частіше елімінуються у порівнянні із зародками з гомозиготними генотипами АА чи ВВ поліморфного локусу Ара-1 гена *IGF-II*, що може реалізуватися через механізми втрати імпринтингу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кашеварова А.А. Статус метилювання імпринтованого гена *SNRPN* при ранній ембріональній гибелі у человека / А.А. Кашеварова, Е.А. Саженова, И.Н. Лебедев, С.А. Назаренко // Бюллетень СО РАМН. — 2006. — №1 (119). — С. 101–105.
2. Chen J. Study on the Imprinting Status of Insulin-Like Growth Factor II (*IGF-II*) Gene in Villus during 6–10 Gestational Weeks / Jianhong Chen, Qun Fang, Baojiang Chen et al. // *Obstetrics and Gynecology International*. — 2010. — Vol. 21. — P. 310–314.
3. Coleman W. *Molecular Diagnostics for the Clinical Laboratory* / W. Coleman, G. Tsongalis. — Totowa N.J.: Humana Press, 2006. — P. 567.
4. Devaney J.M. *IGF-II Gene Region Polymorphisms Related to Exertional Muscle Damage* / J.M. Devaney, E.P. Hoffman, H. Gordish-Dressman et al. // *J. Appl. Physiol.* — 2007. — Vol. 8. — P. 1–27.
5. Heude B. *VNTR polymorphism of the insulin gene and childhood overweight in a general population* / Barbara Heude, Severine Dubois, Marie-Aline Charies et al. // *Obesity Research*. — 2004. — Vol. 25. — P. 47–53.
6. Maher E.R. *Imprinting and assisted reproductive technology* / E.R. Maher // *Hum. Mol. Genet.* — 2005. — Vol. 14. — Review Issue I. — P. 134–138.
7. Majores M. *The insulin gene VNTR polymorphism in Alzheimer's study* / M. Majores, H. Kolsch, M. Bagli et al. // *J. of neural transmission*. — 2002. — Vol. 109. — P. 1029–1034.
8. Narayanan B.A. *IGF-II down regulation associated cell cycle arrest in colon cancer cell exposed to phenolic antioxidant ellagic acid*. / B.A. Narayanan, G.G. RE // *Anti-cancer Res.* — 2001. — Vol. 21. — P. 359–364.
9. Petrik J. *Overexpression of insulin-like growth factor-II in transgenic mice is associated with pancreatic islet cell hyperplasia* / J. Petrik, J.M. Pell, E. Arany E. et al. // *Endocrinology*. — 1999. — Vol. 140. — P. 2353–2363.
10. Fang Q., Wang Y.-X., Zhou Y. *Insulin-like growth factor binding protein I and human embryonic development during 6–10 gestation weeks* // *Chinese Medical Journal*. — 2004. — Vol. 117, № 4. — P. 488–491.
11. Rind H.B. *Target-derived cardiostrophin-1 and insulin-like growth factor-1 promote neurite growth and survival of developing oculomotor neurons* / H.B. Rind, C.S. Bartheld // *Mol. Cell. Neurosci.* — 2002. — Vol. 19. — P. 58–71.
12. Sayer A.A. *Polymorphism of the IGF-II gene, birth weight and grip strength in adult men* / A.A. Sayer, H. Syddall, S.D. O'Dell et al. // *Age Ageing*. — 2002. — Vol. 31. — P. 468–470.
13. Schragar M.A. *Insulin-like growth factor-2 genotype, fat-free mass, and muscle performance across the adult life span* / M.A. Schragar, S.M. Roth, R.E. Ferrell et al. // *J. Appl. Physiol.* — 2004. — Vol. 97. — P. 2176–2183.
14. Stewart C.E. *Insulin-like growth factor-II is an autocrine survival factor for differentiating myoblasts* / C.E. Ste-

wart, P. Rotwein // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271. — P. 11330–11338.

15. Tsai F.-J. *Insulin-Like Growth Factor-II Gene Polymorphism Is Associated With Primary Open Angle Glaucoma* / Fui-Jen Tsai, Hui-Ju Lin, Wen-Chi Chen et al. // *J. of Clinical Laboratory Analysis.* — 2003. — Vol. 17. — P. 259–263.

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНОГО ЛОКУСА АРА-1 ГЕНА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА-II КАК ВОЗМОЖНОГО МАРКЕРА НАРУШЕНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ И МЫШЕЧНОЙ СЛАБОСТИ У ЧЕЛОВЕКА

Б.И. Третьяк, Г.В. Макух, Д.В. Заставна

Проведен молекулярно-генетический анализ и установлено распределение аллелей и генотипов полиморфного локуса Ара-1 импринтированного гена инсулиноподобного фактора роста-II (IGF-II) у пациентов с мышечной слабостью и повышенным уровнем креатинкиназы, ворсинках хориона произвольно элиминированных эмбрионов человека и лиц контрольной группы. Установлены достоверные отличия в частотах гетерозиготного генотипа АВ и гомозиготного генотипа ВВ между исследователями и контрольной группой. Наличие генотипа АВ полиморфного локуса Ара-1 экзона 9 гена IGF-II достоверно повышает риск развития мышечной слабости больше, чем в два раза (OR=2,34) и самопроизвольного прерывания беременности почти в восемь раз (OR=7,72). Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга в контрольной группе может быть вызвано тем, что эмбрионы с АВ генотипом чаще элиминируются по сравнению с зародышами с другими генотипами, что может реализоваться через механизмы потери импринтинга.

ANALYSIS OF APA-1 POLYMORPHIC LOCUS OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-II GENE AS A POSSIBLE MARKER OF FETAL DEVELOPMENT DISORDERS AND MUSCLE WEAKNESS IN HUMANS

B.I. Tretyak, H.V. Makukh, D.V. Zastavna

A molecular genetic analysis has been performed and the distribution of alleles and genotypes of polymorphic locus Ара-1 of imprinted gene insulin-like growth factor-II (IGF-II) a patients with muscle weakness and elevated creatine kinase, chorionic villi of miscarriages and the control group have been determined. The differences in the frequencies of heterozygous genotypes АВ and ВВ homozygous genotype between experimental and control groups were established statistically significant. The АВ genotype of IGF-II polymorphic locus Ара-1 significantly increases the risk of muscle weakness more than twice (OR=2,34) and spontaneous abortion in almost eight times (OR=7,72). Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium in the control group can be caused by the fact that embryos with the АВ genotype are more often eliminated compared to other genotypes that could be realized by the mechanisms of imprinting loss.

УДК 616.716.4-001.5-06-092.19

У.Д. Матолич, Л.Є. Лаповець

ДИНАМІКА АКТИВНОСТІ КІСТКОВОГО ІЗОФЕРМЕНТУ ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ В РІЗНІ ТЕРМІНИ УСКЛАДНЕНИХ ПЕРЕЛОМІВ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ

*Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького, кафедра клінічної
лабораторної діагностики, Україна*

В останні роки, незважаючи на застосування нових і вдосконалених методів лікування переломів нижньої щелепи, частота ускладнень коливається в межах від 10 до 30%. Це спричиняє подовження термінів лікування, вторинне зміщення уламків, утворення несправжніх суглобів, які зумовлюють хірургічне втручання [3, 4, 7, 11]. Визначення активності лужної фосфатази в сироватці крові і зокрема її кісткового ізоферменту для діагностики патології кісткової тканини не викликає заперечень. Активність цього ферменту відносять до маркерів формування кісткової тканини, оскільки кістковий ізофермент лужної фосфатази (КІЛФ) продукується остеобластами, і вміст його у кістковій тканині залежить від метаболічної активності цих клітин. Синтез цього ізоферменту зростає в процесі диференціації остеобластів та прискореного кісткоутворення [2, 5, 6].

Метою дослідження є визначення динаміки змін маркера остеогенезу — КІЛФ на 1, 7, 14, 21 добу лікування хворих на ускладненні переломи нижньої щелепи.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Проведено клініко-лабораторне обстеження хворих на ускладнені відкриті переломи нижньої щелепи. Розподіл хворих на групи був проведений таким чином: група А — 52 пацієнти з ранніми ускладненнями переломів нижньої щелепи: набряк, гематома, розрив слизової оболонки, крововилив, запальний інфільтрат, нагноєння кісткової рани, гнійний періостит; група В — 34 пацієнти, що поступили в стаціонар з пізніми ускладненнями переломів нижньої щелепи: посттравматичний остеомієліт, остеоабсцес, неконсолідований злам з періоститом, остеофлегмона (за класифікацією О.О. Тимофєєва, 2004). Середній вік хворих становив від 18 до 50 років. Критеріями оцінки ефективності лікування в обох гру-