

© Бойчук О.Г.

УДК: 618.17+616.36-002:575.171

Бойчук О.Г.

Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, кафедра акушерства, гінекології та репродуктології (пр. Героїв Сталінграда, 16, м. Київ, Україна, 04210)

ПОЛІМОРФНІ ВАРІАНТИ ГЕНУ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ NO СИНТЕТАЗИ У ЖІНОК З БЕЗПЛІДДЯМ ТА ПОРУШЕННЯМИ ГЕПАТОБІЛІАРНОЇ СИСТЕМИ

Резюме. *Обстежено 18 жінок з безпліддям. Встановлено підвищення частоти поліморфізмів G894T та 4b/4a гена eNOS та їх несприятливих сполучень у жінок з безпліддям та функціональними порушеннями гепатобіліарної системи, що вказує на схильність до розвитку ендотеліальної дисфункції. Оцінка генетичного статусу жінки у перспективі може розширити можливості прогнозування ефективності репродуктивних технологій, перинатальних ускладнень та своєчасної профілактики і корекції таких станів.*

Ключові слова: *безпліддя, гепатобіліарні порушення, ендотеліальна дисфункція, ендотеліальна NO синтаза, поліморфізм генів.*

Вступ

На сьогоднішній день, загальновізнано, що ендотеліальна дисфункція є універсальним патогенетичним механізмом більшості захворювань. Механізм участі ендотелію у виникненні і розвитку різних патологічних станів багатогранний, що обумовлено його багатофункціональністю: ендотелій не тільки регулює судинний тонус, а і бере участь у процесах атерогенезу, тромботворення, захисту цілісності судинної стінки [Головченко, Трещинская, 2008]. Крім того ендотелій можна розглядати як унікальний нейроендокринний орган, що виробляє велику кількість біологічно активних речовин, що впливають на тонус та ангіогенез судин, регулюють гемостаз, адгезію і агрегацію тромбоцитів, імунну та протизапальну відповідь [Гомазков, 2000; Aird, 2005].

При захворюваннях печінки відбувається пошкодження ендотеліальних клітин печінкових синусоїдів, зміни внутрішньопечінкової гемодинаміки, збільшення продукції цитокінів і вільних радикалів. Універсальність метаболічних порушень гепатогенного походження передбачає системність травматизації ендотеліального шару. При гепатобіліарній патології маркери ендотеліальної дисфункції відображають вираженість клініко-біохімічних синдромів цитолізу, холестазу, печінково-клітинної недостатності, мезенхімально-запального синдрому, порушень тромбоцитарного гемостазу, фіброзу печінки, неспецифічної запальної відповіді, психовегетативного синдрому [Ермолов, 2000].

У результаті пошкодження ендотелію синусоїдів печінки виникає дисбаланс продукції вазоактивних цитокінів, збільшується вироблення колагену, відбувається зміна фенестрованості синусоїдів. Колагенізація простору Діссе і наростання внутрішньопечінкового судинного опору призводять до порушень печінкового кровообігу, розвитку ішемії та некрозу печінкової тканини з подальшим фіброзом печінки. Процеси ангіогенезу в печінці також тісно пов'язані з функціональною спроможністю ендотелію.

Оксид азоту (NO) синтезується гепатоцитами і клітинами ретикулоендотеліальної системи печінки [Ратникова, Мельников, 2002]. При гострих процесах у печінці

встановлено активізацію синтезу NO, а при хронічних - пригнічення процесів біосинтезу, внаслідок чого порушується баланс між вазоконстрикторами і вазодилаторами [Ноп, 2002].

Ендотеліальна дисфункція відіграє важливу роль і при розладах репродуктивної сфери, зокрема безплідді, синдромі гіперстимуляції яєчників, звичному невиношуванні вагітності [Комиссарова, Кузьмичев, 2010; Ebisch et al., 2008; Манухина и др., 2011; Пальцев, 2011]. Деякі автори навіть вважають її основою патогенезу таких станів.

Безпліддя - це поліетіологічний симптомокомплекс, в основі якого часто лежать структурні зміни ендометрія, інфекційні, ендокринні, імунологічні та генетичні фактори в різних поєднаннях. Важливе місце серед інших факторів ризику формування безпліддя займає генетична схильність, коли носійство тих чи інших алелей певних генів може видозмінювати перебіг біохімічних процесів в організмі та сприяти формуванню репродуктивних порушень, обумовлювати неефективність застосування репродуктивних технологій. При цьому великий інтерес представляє вивчення поліморфізму генів білків, залучених в патогенез ендотеліальної дисфункції.

Оскільки наявність тих чи інших алельних варіантів генів грає роль своєрідного преморбідного фону, в рамках якого можуть розвинути різні репродуктивні порушення, оцінка генетичного статусу жінки дозволила б прогнозувати ефективність репродуктивних технологій, здійснювати повноцінну прегравідарну підготовку, належний моніторинг перебігу такої вагітності та проводити своєчасну корекцію виявлених порушень.

Серед численних факторів ендотеліального походження визнаними маркерами ендотеліальної дисфункції є оксид азоту (NO). Оксид азоту утворюється під дією ферменту NO-синтази (NOS). NO-синтаза існує у вигляді трьох основних ізоформ, які отримали свою назву за типом клітин, в яких вони були вперше виявлені: нейрональна NO-синтаза (nNOS або NOS I), ендотеліальна NO-синтаза (eNOS або NOS III) і NO-синтаза мак-

рофагів або індукцибельна NO-синтаза (iNOS або NOSII). Ендотеліальна NO-синтаза стабільно експресується в ендотеліальних клітинах. Інгібування NO-синтази призводить до судинних органних уражень [Кравченко, Ярмыш, 2008].

Ген eNOS локалізований у 7 хромосомі (7q35 - 36) і складається з 26 екзонів та 25 інтронів, кодує білок, що складається з 1203 амінокислот. На сьогодні описано 18 поліморфних варіантів гена eNOS, серед яких найбільш вивчені два, а саме міні-сателітний повтор в інтроні 4 (eNOS 4a / 4b поліморфізм) і мутація сьомого екзону G894T, яка призводить до заміни основи гуанін на тіамін, а потім - залишку глутамінової кислоти на аспарагінову (Glu298Asp).

Міні-сателіт 4a / 4b в 4-му інтроні гена eNOS налічує 2 алелі, що складаються з 4 або 5 тандемних повторів розміром 27 пар нуклеотидів. Алель 4a гена eNOS включає чотири повтори і коротше алеля 4b на 27 пар нуклеотидів. Нормальний варіант містить 5 повторів (позначається як 4b), мутантний варіант містить 4 повтори (4a).

Вплив варіанту 4a пов'язаний з порушенням експресії гена NOS3, що призводить до зменшення вироблення NO. Для даного варіанту описані асоціації з атеросклерозом, ішемічною хворобою серця та інфарктом міокарда.

Поліморфізм сьомого екзону (G894T) гена eNOS вважають основним чинником ризику й модифікатором перебігу серцево-судинних захворювань. Функціональне значення цих поліморфних варіантів на сьогодні цілком не з'ясоване. Є дані, що в останньому випадку білок eNOS із заміненою амінокислотою нестабільний, легко гідролізується на два фрагменти саме в тому місці, де відбувається її заміна, це може знижувати активність ферменту та впливати на синтез NO [Воронков та ін., 2012; Colombo et al., 2003].

Мета - дослідити поліморфні варіанти гену ендотеліальної NO синтази у жінок з безпліддям та порушеннями гепатобіліарної системи.

Матеріали та методи

Досліджено 18 жінок з трубно-перитонеальним 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.

Молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів за генами eNOS (G894T, 4b/4a) 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 каліе-

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)

вою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти в якості антикоагулянту ("Sarstedt", Германия), заморожували та зберігали при t -200C. Із зразків крові проводили виділення геномної ДНК за допомогою комерційного набору "ДНК-сорб-В" (відповідно до інструкції наданої виробником). Методом алельспецифічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) визначали поліморфні варіанти 4b/4a за геном eNOS за модифікованою методикою. Для визначення G894T поліморфізму гена eNOS, 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 робочого 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 eNOS(G894T) підлягали гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеаз рестрикції Mbol. Стан ампліфікаційних та рестрикційних фрагментів аналізували за допомогою горизонтального електрофору 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. Обговорення

За отриманими даними у жінок з безпліддям та функціональними порушеннями гепатобіліарної системи встановлена вища частота патологічних поліморфізмів 4a / 4b гену eNOS (табл. 2). Так, нормальний варіант поліморфізму у гомозиготній формі 4b/4b зустрічався лише у половини обстежених проти 70,0 % жінок з безпліддям без порушень печінки. Гетерозиготна форма поліморфізму 4b/4a відмічена відповідно у 37,5 та 30,0 % жінок 1-ї та 2-ї групи. Мутантний варіант поліморфізму, пов'язаний зі збільшенням ризику ендотеліальної дисфункції та інших патологічних станів, у гомозиготній формі відмічено у 12,5 % жінок 1-ї групи, а у жінок 2-ї групи - не відмічався. Таким чином, 50,0 % жінок з безпліддям та порушеннями печінки були носіями мутантного алелю 4 у гетеро- або гомозиготній формі проти третини жінок без таких порушень.

Таблиця 2. Частоти генотипів eNOS в досліджуваних групах, абс. ч. (%).

Поліморфізм	Генотип	1-а, n=8	2-а, n=10
4b/4a	4b/4b	4 (50,0)	7 (70,0)
	4b/4a	3 (37,5)	3 (30,0)
	4a/4a	1 (12,5)	-
G894T	GG	3 (37,5)	6 (60,0)
	GT	3 (37,5)	3 (30,0)
	TT	2 (25,0)	1 (10,0)

Таблиця 3. Сполучення генотипів eNOS у жінок з безпліддям та патологією гепатобілірної системи, абс. ч. (%).

Сполучення генотипів eNOS	1-а, n=8	2-а, n=10
4b/4b x GG	1 (12,5)	3 (30,0)
4b/4b x GT	2 (25,0)	3 (30,0)
4b/4b x TT	2 (25,0)	1 (10,0)
4b/4a x GG	1 (12,5)	3 (30,0)
4b/4a x GT	1 (12,5)	-
4b/4a x TT	-	-
4a/4a x GG	1 (12,5)	-
4a/4a x GT	-	-
4a/4a x TT	-	-

Дослідженнями розподілу частот варіантів генотипів за поліморфізмом G894T сьомого екзону гена eNOS у жінок з безпліддям при порушеннях печінки встановлено зниження частоти протективного алелю G і збільшення частоти алелю T, відповідального за ризик розвитку ендотеліальної дисфункції (див. табл. 2) переважно за рахунок гетерозиготної форми (GT). Досить рідкісний у загальній популяції гомозиготний

варіант TT спостерігався у 25,0% та 10,0% жінок 1-ї та 2-ї групи відповідно.

Аналіз можливих сполучень поліморфізмів G894T та 4b/4a гена eNOS у жінок з безпліддям показав (табл. 3), сполучення нормальних генотипів 4b/4b x GG відмічено у третини жінок 2-ї групи, що майже у 3 рази, ніж серед гепатобілірними порушеннями. Сполучення несприятливих гомозиготних форм даних поліморфізмів 4a/4a x TT у обстежених жінок не відмічено, причому найбільш несприятливий варіант кожного з поліморфізмів зустрічався лише у поєднанні з нормальним варіантом іншого (4b/4b x TT та 4a/4a x GG). У жінок 1-ї групи спостерігалось більше різноманіття варіантів сполучень несприятливих поліморфізмів гена eNOS.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Проведеними дослідженнями встановлено підвищення частоти поліморфізмів G894T та 4b/4a гена eNOS та їх несприятливих поєднань у жінок з безпліддям та функціональними порушеннями гепатобілірної системи, що вказує на схильність до розвитку ендотеліальної дисфункції, яка є універсальним патогенетичним механізмом, що відіграє важливу роль як при патології печінки та розладах репродуктивної сфери, зокрема безплідді, так і у ефективності лікування.

У носіїв несприятливих алельних варіантів гену eNOS створюється певне преморбідне тло для розвитку репродуктивних порушень, оцінка генетичного статусу жінки у перспективі може розширити можливості прогнозування ефективності репродуктивних технологій, перинатальних ускладнень та своєчасної профілактики і корекції таких станів.

Список літератури

- Головченко Ю. И. Обзор современных представлений об эндотелиальной дисфункции / Ю. И. Головченко, М. А. Трещинская // Consilium medicum Ukraina. - 2008. - № 11. - С. 38-40.
- Гомазков О. А. Эндотелий - "эндокринное дерево" / О. А. Гомазков // Природа. - 2000. - № 5. - С. 38-46.
- Ермолов С. Ю. Дисфункция эндотелия печеночных гемокапилляров: оценка и коррекция гемодинамики в терапии хронических заболеваний печени / С. Ю. Ермолов, В. Г. Радченко, А. В. Шатров. - СПб, 2000. - 117 с.
- Комиссарова Ю.В. Трубно-перитонеальное бесплодие: клиническое значение определения сосудисто-эндотелиального фактора роста в прогнозировании синдрома гиперстимуляции яичников / Ю. В. Комиссарова, Л. Н. Кузьмичев // Акушерство и гинекология. - 2010. - № 4. - С. 50-54.
- Кравченко Н. А. Регуляция экспрессии эндотелиальной NO-синтазы и дисфункции сосудистого эндотелия при сердечно-сосудистой патологии / Н. А. Кравченко, Н. В. Ярмыш // Цитология и генетика. - 2008. - №4. - С. 69-81.
- Манухина Е. И. Клиническое значение сосудистого эндотелиального фактора роста у больных с синдромом поликистозных яичников / Е. И. Манухина, И. Б. Манухин, Л. Б. Студеная, М. А. Геворкян // Лечащий врач. - 2011. - № 3. <http://www.lvrach.ru/2011/03/15435150/20.02.2015>
- Пальцев М. Оценка состояния сосудистого эндотелия при различных акушерских патологиях / М. Пальцев, Л. Волкова, Е. Пальцева, О. Аляутдина // Врач. - 2011. - № 5. - С.86-87.
- Поліморфні варіанти T(-786)C і G894T гена ендотеліальної NO_синтази та стан вазодилатаційної функції ендотелію у хворих із хронічною серцевою недостатністю / Л.Г.Воронков, Н.Г.Горовенко, І.Д.Мазур [та ін.] // Серце і судини. - 2012. - № 4. - С. 43-51.
- Ратникова Л. И. Значение оксида азота в повреждении гепатоцитов при патологии печени / Л. И. Ратникова, И. В. Мельников // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2002. - № 4. - С. 50-54.
- Aird W.C. Endothelial cells in health and disease / W.C. Aird // Informa HealthCare. - 2005. - 512 p.
- Endothelial nitric oxide syntase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease / M. G. Colombo, U. Paradosi, M. G. Andreassi [et al.] // Clinical Chemistry. - 2003. - Vol. 49(3). - P. 389-395.
- Review of the role of the plasminogen activator system and vascular endothelial growth factor in subfertility / I. Ebisch, C. Thomas, A. Wetzels [et al.] // Fertil. Steril. - 2008. - № 6. - P. 2340-2350.
- Hon W. M. Nitric oxide in liver diseases / W. M. Hon, W. H Lee, H. E. Khoo // II Annals of the New York Academy of sciences. - 2002. - Vol. 962. - P. 278-295.

Бойчук А.Г.

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO СИНТЕТАЗЫ У ЖЕНЩИН С БЕСПЛОДИЕМ И НАРУШЕНИЯМИ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ

Резюме. *Обследованы 18 женщин с бесплодием. Установлено повышение частоты полиморфизмов G894T и 4b / 4a гена eNOS и их неблагоприятных сочетаний у женщин с бесплодием и функциональными нарушениями гепатобилиарной системы, что указывает на склонность к развитию эндотелиальной дисфункции. Оценка генетического статуса женщины в перспективе может расширить возможности прогнозирования эффективности репродуктивных технологий, перинатальных осложнений и своевременной профилактики и коррекции таких состояний.*

Ключевые слова: бесплодие, гепатобилиарные нарушения, эндотелиальная дисфункция, эндотелиальная NO синтаза, полиморфизм генов

Boychuk A. G.

POLYMORPHIC GENE VARIANTS OF ENDOTHELIAL NO SYNTHASE IN WOMEN WITH INFERTILITY AND A HEPATOBILIARY SYSTEM VIOLATION

Summary. *The study included 18 women with infertility. It is found increased frequency of G894T and 4b / 4a gene eNOS polymorphisms and their adverse combinations in women with infertility and a hepatobiliary system functional disorder, which indicates the propensity to develop endothelial dysfunction. Evaluation of the genetic status of women has the potential to expand the capability to predict the effectiveness of reproductive technologies, perinatal complications and timely prevention and correction of such conditions.*

Key words: infertility, hepatobiliary disorder, endothelial dysfunction, endothelial NO synthase, gene polymorphism.

Стаття надійшла до редакції 01.12.2014 р.

Бойчук Олександра Григорівна - к.мед.н., доцент кафедри акушерства та гінекології ДВНЗ "Івано-Франківський національний медичний університет"

© Гайструк Н.А.

УДК: 618.3-06-063.71:7126.91-045.6

Гайструк Н.А.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (вул. Пирогова 56, м. Вінниця, 21018, Україна)

СТАН КОМПЛЕКСУ "МАТИ-ПЛАЦЕНТА-ПЛІД" ПРИ БАГАТОПЛІДНІЙ ВАГІТНОСТІ

Резюме. *Метою дослідження було підвищити ефективність профілактики перинатальних ускладнень у жінок з багатоплідною вагітністю на основі розробки діагностичних і прогностичних критеріїв внутрішньоутробної гіпоксії плодів з використанням клініко-біохімічних і функціональних методів досліджень. Проведено ретроспективний аналіз перебігу багатоплідної вагітності та пологів двійнею 80 жінок. Всі пацієнтки розділені на 2 групи залежно від хоріальності: I група - 37 (46,2 ± 30,40 %) пацієнток з монохоріальною діамніотічeskими двійнятами; II група - 43 (53,8 ± 26,16 %) пацієнток з дихоріальною діамніотічeskими двійнятами. В дослідження включено 25 здорових вагітних жінок (I група) та 60 вагітних з багатопліддям. Вагітні з багатопліддям були розділені на 2 групи: вагітні з багатопліддям (n=20), в яких не спостерігали дистресу плодів та вагітні з багатопліддям (n=40), у яких відмічали дистрес плодів. Дослідження вмісту гомоцистеїну в сироватці крові показало, що у вагітних з багатопліддям відмічається формування синдрому гіпергомоцистеїнемії. У здорових вагітних вміст гомоцистеїну коливається в межах 4,5 - 14,4 мкмоль/л і в середньому становив 8,67 мкмоль/л, тоді як у вагітних з багатопліддям цей показник був вищий і складав 40,0 та 55,0% (p<0,01). Результати проведених досліджень показали, багатоплідна вагітність є чинником ризику розвитку плацентарної недостатності. Для своєчасної діагностики й ефективного контролю за лікувально-профілактичними заходами, що проводяться, необхідно використовувати динамічні ехографічні та доплерометричні дослідження. Багатоплідна вагітність є універсальним чинником ризику розвитку плацентарної недостатності з високим рівнем перинатальної захворюваності і смертності. Вагітні з багатоплідною вагітністю повинні проходити ультразвуковий скринінг в другій половині вагітності. Для зниження частоти перинатальної захворюваності, смертності при багатоплідній вагітності необхідно проводити адекватну оцінку функціонального стану фетоплацентарного комплексу.*

Ключові слова: багатоплідна вагітність, плацентарна недостатність.

Вступ

За останні три десятиріччя у світі відбулося різке зростання частоти багатоплідної вагітності, яка досі вважалась певною біологічною константою. Така тенденція характерна в першу чергу для економічно розвинутих країн, але поступово поширюється і на інші країни. Частково це пов'язується зі збільшенням відсотку вагітностей у жінок віком понад 35 років, частково - з розширенням застосування гормональних препаратів з

метою стимуляції овуляції при лікуванні безпліддя, а також - з розвитком репродуктивної медицини і більш доступним використанням допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). Згідно літературними даними, лише за період з 2000 по 2010 рр. в Україні відбулося зростання частоти багатоплідних пологів більш ніж на 30%, при цьому пологи двійнею складають майже 95%, а інші 5% припадає на пологи трійнею і багатопліддя більш