



Генетические факторы патогенеза спаечной болезни брюшины

В.В. Бойко, Д.А. Евтушенко

Харьковский национальный медицинский университет;

ГУ «Институт общей и неотложной хирургии им. В.Т. Зайцева НАМН Украины»

В данном сообщении авторы изучили взаимосвязь тяжести и распространённости спаечной болезни брюшины (СББ) с частотой встречаемости мутации гена ITGA2 – интегрин и иммунофизиологическими нарушениями, для профилактики развития послеоперационных осложнений.

Генетические нарушения, вызванные изменением первичной структуры гена, могут существенно изменять кинетику и адгезивные свойства тромбоцитов, повышение скорости адгезии тромбоцитов может быть связано не только с полиморфизмом генетических маркёров С800Т, но и с другими эпигеномными нарушениями, затрагивающими различные звенья резистентности и иммуногенетический контроль, а также в некоторых случаях, в значительной степени с эпигенетическим фактором, как метилирование, которое влияет на экспрессию гена.

Анализ результатов обследования генетических мутаций у больных с различной степенью тяжести СББ свидетельствует о наличии взаимосвязи выраженного полиморфизма гена ITGA2 и степени выраженности иммунопатологических реакций с тяжестью проявлений синдрома комплекса спаечной болезни.

Ключевые слова: спаечная болезнь брюшины, ген ITGA2

Введение. Недостаточно изучена совокупность факторов развития спаечной болезни брюшины (СББ), так как гетерогенным является клинический спектр данной патологии, а также наличие индивидуальных предикторов, таких как генетический полиморфизм генов и возможные эпигеномные факторы, определяющих сигналинг и адгезивные свойства иммунокомпетентных клеток [1-3].

Определённая роль в развитии СББ может принадлежать функции белков-интегринов, определяющих межклеточную адгезию, что определяет, в свою очередь, ремоделирование межклеточного матрикса [2,4,5].

Известна роль рецепторных белков тромбоцитов, являющихся гликопротеинами и выполняющих роль интегринов, в нарушении функционирования некоторых звеньев системы гемостаза. Эти экстрацеллюлярные белки являются рецепторами, связывающими коллаген, фибронектин, ламинин, влияют на адгезию тромбоцитов и распознают пролингидроксиллированную последовательность в коллагене. Альфа-2 интегрин ITGA2 принимает активное участие в регуляции экспрессии генов коллагена и коллагеназы, что, в свою очередь, влияет на процессы образования внеклеточного матрикса. Этот интегрин имеет трансмембранный фрагмент, обеспечивающий адгезию, и внутриклеточный фрагмент, участвующий в регуляции генов коллагена [4,6].

Ген ITGA2 локализован в 5 хромосоме, мутации этого гена могут быть в виде замены нуклеотида цитозина (С) на тимин (Т) в позиции 807 участка последовательности ДНК, что приводит к замене аминокислоты в пептидной цепи молекулы альфа-2-субъединицы интегринов. Данный полиморфизм обозначается как генетический маркёр С807Т [7,9,10].

Изменение первичной структуры гена может вызывать изменение свойств рецепторов. Наличие мутации изменяет так же кинетику и адгезивные свойства тромбоцитов. Замена цитозина на тимин в положении С807С приводит к повышению скорости адгезии тромбоцитов и к повышенному риску тромбофилии. Частота встречаемости данного полиморфного варианта составляет 5–7% и является маркёром повышенного риска инфаркта миокарда и других сердечно-сосудистых заболеваний. Популяционная частота встречаемости аллель Т в Европейской популяции составляет около 40% [8,11].

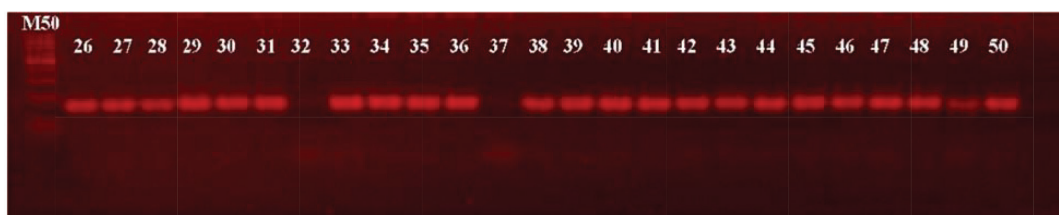
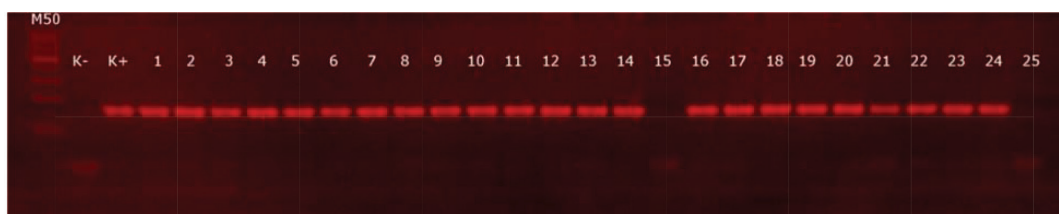
Представляет несомненный интерес изучение роли генетического полиморфизма в выявлении этиологии развития спаечной болезни брюшины, так как этот процесс зависит, с одной стороны, от изменений адгезивных свойств тромбоцитов и патологического нарушения формирования внеклеточного коллагенового матрикса.

Рабочей гипотезой данного сообщения было изучение взаимосвязи (степени влияния) геномных структурных нарушений на пенетрантность и экспрессивность клинических проявлений спаечной болезни брюшины в популяции Харьковского региона.

Цель исследования: изучение взаимосвязи тяжести и распространённости спаечной болезни брюшины с частотой встречаемости мутации гена ITGA2 – интегрин и иммунофизиологическими нарушениями для выяснения возможных механизмов формирования и разработки методов индивидуальной профилактики развития послеоперационных осложнений.

Материал и методы. Больных (n=50) с хирургической абдоминальной патологией исследуемой популяционной выборки, в зависимости от выявленного синдромокомплекса, классифицировали на 3 группы: 1 группа – 18 человек (36% от всей популяционной выборки), имеющие единичные симптомы СББ; 2 группа (n=14; 28%) – больные, имеющие не более двух симптомов СББ; 3 группа (n=11; 22%) – пациенты с тремя и более симптомами СББ, из них у 7 (14%) больных, впервые прооперированных на органах брюшной полости, исследовали полиморфизм гена ITGA2 и частоту встречаемости гапло- и диплотипов методом ПЦР в цельной крови.

ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММЫ ПРОФИЛЕЙ РАЗДЕЛЕНИЯ АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ ДНК ОБРАЗЦОВ ЧЕЛОВЕКА



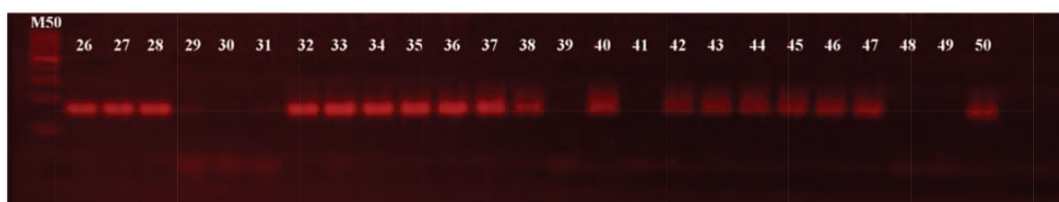
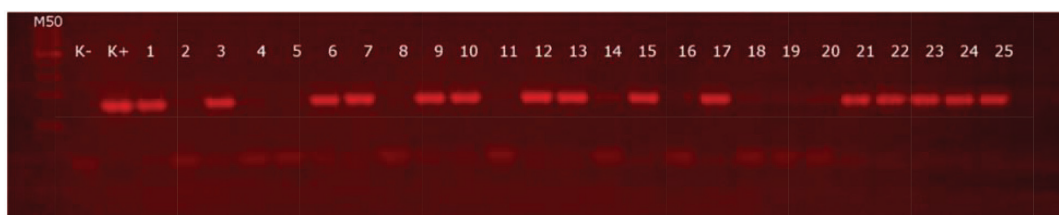
Аллель 1

«M50» – маркёр молекулярной массы ДНК

«K+» – положительный контроль

«K-» – отрицательный контроль

«1...» – № образца соответственно номера регистрации в ООО «Агроген»



Аллель 2

«M50» – маркёр молекулярной массы ДНК

«K+» – положительный контроль

«K-» – отрицательный контроль

«1...» – № образца соответственно номера регистрации в ООО «Агроген»



У всех вышеописанных пациентов исследовали наличие и частоту возможных точковых мутаций гена ITGA2.

Выявление мутаций гена ITGA2 в геноме пациентов определяли методом ПЦР с помощью набора реагентов для амплификации «SNP-ЭКСПРЕСС-РВ». Проводили анализ геномной ДНК, выделенной из лейкоцитов цельной крови пациентов, с помощью специального реагента «ДНК-экспресс-кровь».

Ход исследования. Образцы крови центрифугировали при 3000 об/мин., получали осадок форменных элементов, который выдерживали при -200С до полного замораживания.

После размораживания образцов, в пробирки вносили реагент «ДНК-экспресс-кровь». Затем прогревали при 990С в течение 15 минут. Образцы центрифугировали при 8000 об/мин. в течение 1 минуты, полученный супернатант использовали в качестве исследуемого образца ДНК.

При выполнении ПЦР, для получения реагентов амплификации, готовили реакционные смеси Аллель 1 и Аллель 2. Образец выделенной ДНК амплифицировали с двумя парами аллель-специфических праймеров. Исследуемые образцы вносили в пробирки с рабочей амплификационной смесью: Аллель 1 и Аллель 2, соответственно. В качестве отрицательного контрольного образца использовали разбавитель, в качестве положительного контроля – положительный контроль ДНК.

Детекцию продуктов ПЦР проводили используя программируемый амплификатор, сопряжённый с оптической системой детекции флуоресцентного сигнала, а также ннтеркалирующего красителя Green, который флуоресцирует при встраивании в образующийся двуцепочечный продукт ДНК.

При этом применили FRET-зонды. Система позволяет проводить ПЦР и регистрировать сигнал от образцов по заданным каналам. По кривым накопления флуоресцентного сигнала производили анализ результатов. Для проведения амплификации использовали положительный и отрицательный контрольные образцы ДНК.

Результаты и их обсуждение. У 50 пациентов с абдоминальной патологией исследовали частоту возможных точковых мутаций – замены пар оснований – цитозина (С) на тимин (Т) – в последовательности гена ITGA2.

Распределение пациентов с абдоминальной патологией с наличием гапло- и диплотипов замены пар оснований цитозина (С) на тимин (Т) представлено в таблице 1.

Нормальный диплотип СС гена ITGA2 выявили у 17 пациентов с абдоминальной патологией.

Мутантный диплотип и гаплотип выделили у 33 обследуемых больных с хирургической абдоминальной патологией, что составило 66%.

Максимальная частота встречаемости (58%) отмечена у пациентов с гаплотипом СТ, реже среди обследованных встречался диплотип ТТ (8%). У 34% обследованных пациентов не была выявлена мутация замены основания цитозина на тимин.

По данным литературы, популяционная частота встречаемости мутации ITGA 2 составляет от 35% до 44% [4,9].

Кроме того, у 29 обследованных пациентов выявили единичные замены оснований цитозина на тимин (СТ), что составило 58%. Замена обоих оснований на тимин (ТТ) была выявлена только у 4 пациентов (табл.2). Следовательно, наибольшая частота встре-

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИИ ГЕНА ITGA2 У БОЛЬНЫХ С АБДОМИНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Пациенты с абдоминальной патологией	Гомозигота СС	Гетерозигота СТ	Гомозигота ТТ
Абсолютное количество пациентов (n=50)	17	29	4
Частота встречаемости, %	34%	58%	8%

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИИ ГЕНА ITGA2 У БОЛЬНЫХ С АБДОМИНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ, ПРООПЕРИРОВАННЫХ НА ОРГАНАХ БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ

Пациенты с абдоминальной патологией	Гомозигота СС	Гетерозигота СТ	Гомозигота ТТ
Абсолютное количество пациентов (n=43)	25	24	4
Частота встречаемости, %	34,8%	55,8%	9,4%



чаемости (58%) среди обследованных пациентов приходилась на мутантный гаплотип СТ, а мутантные диплотипы ТТ встречались только в 8% случаев обследований.

У 43 обследованных пациентов из 50 выявлены признаки СББ. Генетический полиморфизм гена ITGA 2 изучали у 43 больных, которые были прооперированы по показаниям на органах брюшной полости. Частоты встречаемости точковых мутаций гена ITGA 2 выявили у 28 пациентов с СББ, что составило 64,2% от всей выборки. У 15 (34,8%) пациентов выборки не выявили точковые мутации замены С на Т. Мутации гена ITGA 2 обнаружены в гетерозиготном состоянии (СТ) у 24 (55,8%) больных. Мутации в гомозиготном состоянии при замене оснований СС на ТТ нами были идентифицированы только у 4 больных, что составило 9,4%.

Наиболее тяжёлые проявления СББ были выявлены у пациентов с двойной заменой оснований ТТ – 75,0%.

Этиология развития спаечной болезни брюшины, как одного из наиболее частых послеоперационных осложнений, может определяться генетическими факторами в виде изменений структурной организации генов.

Генетические нарушения, вызванные изменением первичной структуры гена, могут существенно изменить кинетику и адгезивные свойства тромбоцитов, повышение скорости адгезии тромбоцитов может быть связано не только с полиморфизмом генетических маркёров С800Т, но и с другими эпигеномными нарушениями, затрагивающими различные звенья резистентности и иммуногенетического контроля. В некоторых случаях в значительной степени эпигенетические факторы такие как метилирование влияют на экспрессию гена. Известно, что в геноме с максимальной частотой происходит метилирование по цитозину (С). Каждый ген, вследствие небольших делеций, может быть в разных полиморфных состояниях, в которых активности белковых продуктов разные. Если происходят мутации поверхностных рецепторов интегринов, которые отвечают стандарту, то в соответствии с иммуногенетическим контролем Т-клетки CD8 элиминируют тканевые фрагменты с изменёнными рецепторами. В некоторых случаях в тканях могут откладываться чужеродные белки после прохождения процессинга в фагоцитирующих клетках.

Таким образом, анализ результатов обследования генетических мутаций у больных со спаечной болезнью свидетельствует о наличии взаимосвязи выраженного полиморфизма гена ITGA2 и степени выраженности иммунопатологических реакций с тяжестью проявлений синдрома комплекса спаечной болезни.

ЛИТЕРАТУРА

1. Липатов В.А. Спаечная болезнь брюшины как полиэтиологическое мультифакториальное заболевание / В.А.Липатов, А.Д.Мясников // Сборник материалов Российской научн. конф. с межд. участием «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии». В 2-х томах. – Курск: КГМУ. – 2006. – Том 1. – С. 324-329.
2. Плечев В.В. Новое в диагностике и хирургическом лечении острой спаечной непроходимости / В.В.Плечев, С.А.Пашков, П.Г.Корнилаев [и др.] // Здравоохр. Башкортостана. - 2004. - №1. - С.123-129.
3. Чекмазов И.А. Этиология и патогенез спаек брюшной полости / И.А.Чекмазов // Consil. Med. – 2002. – Т. 4, № 1 (Приложение).
4. Ajzenberg N. Association of the -92C/G and 807C/T polymorphisms of the alpha2 subunit gene with human platelets alpha2beta1 receptor density / N.Ajzenberg [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2005. Aug; 25(8):1756-60.
5. The impact of platelet glycoprotein IIa and Ia polymorphisms in cardiovascular thrombotic disease / M.Charakida, D.Tousoulis, C.Stefanadis, P.Toutouzias // Italian heart journal: official journal of the Italian Federation of Cardiology. - 2003; 4 (1): 17-22.
6. Croft S.A. The GPIa C807T dimorphism associated with platelet collagen receptor density is not a risk factor for myocardial infarction / S.A.Croft [et al.] // Br. J. Haematol. – 1999. Sep; 106 (3):771-6.
7. Di Paola J. Low platelet alpha2beta1 levels in type I von Willebrand disease correlate with impaired platelet function in a high shear stress system / J. Di Paola [et al.] // Blood. – 1999 Jun 1;93(11):3578-82
8. Eckes B. Mechanical tension and integrin alpha 2 beta 1 regulate fibroblast functions / B.Eckes, M.C.Zweers, Z.G.Zhang [et al.] // J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. – 2006; 11 (1): 66-72. PMID 17069012
9. Leone A.M. Scientific letters. Glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and increased risk of recurrent acute coronary syndromes: a five year follow up / A.M.Leone, V.De Stefano, F.Burzotta [et al.] // Heart. – 2004;90:567-569
10. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis / G.A.Plenz, M.C.Deng, H.Robenek, W.Volker // Atherosclerosis. – 2003;166 (1): 1-11. D01:10.1016/S0021- 9150 (01) 00766-3. PMID 12482545.
11. Tsantes A.E. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and coronary artery disease: a meta- analysis / A.E.Tsantes, G.K. Nikolopoulos, P.G. Bagos [et al.] // Int. J. Cardiol. – 2007;118 (2): 189-96. D01:10.1016/j.ijcard. 06.047. PMID 17023078



Summary

Genetic factors in the pathogenesis of adhesive disease of the peritoneum

V.V. Boyko, D.A. Yevtushenko

Kharkov National Medical University;

SI «Institute of General and Emergency Surgery Named after V.T. Zaitsev NAMS of Ukraine»

In this report, the authors examined the relationship of gravity and prevalence of adhesive disease of the peritoneum (ADP) with a occurrence frequency of mutations gene ITGA2 – integrin and immunophysiologic disorders for the prevention of postoperative complications.

Genetic disorders caused by changes in the primary structure of the gene, can significantly alter the kinetics and adhesive properties of platelets, increased platelet adhesion rate may be due not only to genetic polymorphism of markers S800T, but also with other epigenetic disorders that affect various parts of the resistance and immunogenetic control and in some cases, substantially with epigenetic methylation factor that affects gene expression.

Analysis of the results genetic examination in patients with varying severity degrees of ADP indicates a relationship marked gene polymorphism ITGA-2 and severity of immunopathological reactions with symptom complex severity of adhesive disease.

Key words: adhesive disease of the peritoneum, ITGA-2 gene

АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Бойко Валерий Владимирович – директор
ГУ «Институт общей и неотложной хирургии
им. В.Т. Зайцева НАМН Украины», заведующий
кафедрой хирургии № 1 Харьковского
национального медицинского университета;
Украина, г.Харьков, пр.Балакирева, 1
E-mail: dr.yevtushenko_d.a@mail.ru