

ВОВЛЕЧЕННОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА В РАЗВИТИИ АБДОМИНАЛЬНЫХ ГРЫЖ У ЧЕЛОВЕКА

Барт И. И.^{1,2}, Иванов В. П.¹, Иванов С. В.¹, Трубникова Е. В.³

¹ГОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет Росздрава», Курск, Россия (305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3), e-mail:ilyabarth@gmail.com

²НИИ Экологической медицины курского государственного медицинского университета, Курск, Россия (305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3), e-mail:ilyabarth@gmail.com

³ГОУ ВПО «Курский государственный университет», Курск, Россия (305000, г. Курск, ул. Радищева, 33), e-mail: tr-e@list.ru

В статье представлен полиморфизм гена трансформирующего фактора роста у больных с абдоминальными грыжами. Основным патофизиологическим механизмом развития абдоминальных грыж – нарушение качественной структуры соединительной ткани. Трансформирующий фактор роста является цитокином, модулирующим клеточный рост, воспаление, пролиферацию и дифференцировку внеклеточного матричного депонирования и апоптоза. Известно 8 его полиморфизмов. В данном исследовании был проведен анализ полиморфизма -509 С/Т. Исследование проведено на 289 пациентах. 143 человека с абдоминальными грыжами и 146 человек контрольной группы. Различий по половозрастному составу между группами отсутствовали. Молекулярно-генетический анализ производился методикой ПЦР-ПДРФ. В результате проведенного исследования были найдены статистически достоверные различия в частотах аллелей данного полиморфизма между группами. А также были найдены различия между частотой диких и мутантных генотипов со значительным смещением в сторону мутантных генотипов в группе больных с абдоминальными грыжами по сравнению с лицами контрольной группы.

Ключевые слова: абдоминальные грыжи, послеоперационные вентральные грыжи, цитокины, трансформирующий фактор роста, ПЦР-ПДРФ анализ, полиморфизм генов.

TRANSFORMING GROWTH FACTOR IN A CASE OF ABDOMINAL HERNIA

Bart I. I.^{1,2}, Ivanov V. P.¹, Ivanov S. V.¹, Trubnikova E. V.³

¹ Kursk state medical university, Kursk, Russia (305041, Kursk, 3 K.Marks street), e-mail:ilyabarth@gmail.com

²Science laboratory of ecological medicine of kursk state medical university, Kursk, Russia (305041, Kursk, 3 K.Marks street), e-mail:ilyabarth@gmail.com

³Kursk state university, Kursk, Russia (305000, Kursk, 33 Radisheva street), e-mail: tr-e@list.ru

We presents a polymorphism of a transforming growth factor at patients with abdominal hernias in article. Violation of qualitative structure of a connecting tissue is one of the main mechanisms of abdominal hernias. The transforming growth factor is cytokine, modulating cellular growth, an inflammation, proliferation and a differentiation of extracellular matrix and mechanisms of deposition and apoptosis. 8 of its polymorphisms are known. We researched an analysis of -509 C/T of this gene in our study. Research was conducted on 289 patients. 143 persons with abdominal hernias and 146 people of control group. Distinctions of gender and age structure between groups were absent. The molecular and genetic analysis was made by PCR-RFLP. As a result we found a statistically reliable distinctions in frequencies of both alleles of this polymorphism between groups. Distinctions of the frequency of wild and mutant genotypes with considerable shift towards mutant genotypes in a group of patients with abdominal hernias in comparison with persons of control group were also founded.

Keywords: abdominal hernia, incision hernias, cytokines, transforming growth factor, PCR-RLFP analyze, gene polymorphisms.

Введение

На протяжении последних десятилетий количество грыженосителей остается стабильным и составляет 3–6 % численности населения [4]. В общехирургических

стационарах пациенты с грыжами составляют до 10 %, а операция герниопластика является одной из распространенных, достигая 10–21 % [1].

Абдоминальные грыжи выходят через «слабые места» брюшной стенки, это, в большинстве своем, грыжи белой линии живота, пупочные грыжи и послеоперационные вентральные грыжи, которые являются самым частым осложнением в абдоминальной хирургии и занимают лидирующее положение по количеству среди всех абдоминальных грыж [3]. Независимо от вида грыжи в основе лежат одинаковые процессы патогенеза, а именно несостоятельность соединительной ткани в месте выпячивания. Причины данного явления, вероятно, кроются в генетических нарушениях синтеза коллагеновых волокон, которые составляют основу соединительной ткани. В связи с этим важными являются механизмы правильного синтеза коллагена, четкости работы процессов его дифференцировки, а также немаловажную роль играют процессы его катаболизма.

Трансформирующий фактор роста (TGF- β) – это мультипотентный цитокин, являющийся важным модулятором клеточного роста, воспаления, пролиферации и дифференцировки внеклеточного матричного депонирования и апоптоза [5]. TGF- β ингибирует пролиферацию и миграцию гладкомышечных и эндотелиальных клеток [6], оказывает ингибирующие эффекты на иммунную систему, подавляя гемопоэз и провоспалительный цитокиновый ответ. TGF- β контролирует дифференциацию, пролиферацию и активацию всех иммунных клеток, заживление раны, процессы ангиогенеза, вовлечен в процессы аутоиммунного ответа, опуртонистического инфицирования, фиброзных осложнений и т.п. [8]. Обладает хемотаксическими свойствами и может стимулировать продукцию таких цитокинов как ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-альфа в очагах воспаления [7].

Цель исследования

Итак, целью нашего исследования явилось изучение полиморфизма гена TGF- β 1 509 С/Т у больных с абдоминальными грыжами.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужила выборка из 289 пациентов, представителей русской национальности, уроженцев Курской области, находившихся на стационарном лечении в отделении общей хирургии Курской областной клинической больницы. Забор материала проводился на месте.

Экспериментальная группа больных составила 143 человека с абдоминальными грыжами. Из них – 112 женщин и 31 мужчина. Средний возраст больных составил $54,4 \pm 10,9$ года. Преобладающей возрастной группой были люди от 51 до 60 лет (45 человек). Вторыми по величине были возрастные группы 41–50 лет и 61–70 лет, по 18,2 % и 23,7 %

соответственно. 9 % и 7,3 % составили больные в возрастах – 31–40 лет и более 71 года соответственно.

Контрольная группа составила 146 человек. В нее вошли люди без грыжевой болезни, без тяжелых соматических патологий – таких: онкологические заболевания, сахарный диабет, тяжелые формы ишемической болезни сердца (в том числе инфаркты миокарда), артериальной гипертензии и др., находившиеся на стационарном лечении в отделении общей хирургии. Из них 119 женщин и 27 мужчины. Средний возраст их составил $51,2 \pm 12,6$ года. Преобладающей возрастной группой, так же как и в экспериментальной группе, были лица 51–60 лет (49 человек).

ПЦР-анализ

Для анализа полиморфизма -509 С/Т в гене TGF- β 1 была произведена амплификация фрагментов промоторной области данного гена с использованием следующих праймеров: прямой – 5'-CAGTAAATGTATGGGGTCGCAG-3', обратный праймер – 5'-GGTGTCAAGTGGGAGGAGGG-3'. Условия ПЦР были следующие: 3 минуты денатурации при температуре 94 °С, далее 35 циклов 94 °С 60 сек., 61 °С 60 сек., 72 °С 60 сек., завершающий шаг 72 °С в течение 10 минут. Продукты ПЦР-реакции были визуализированы в трансиллюминаторе под ультрафиолетовым светом после электрофореза на 3,5 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Для ПДРФ анализа была использована рестриктаза *Vse21 I*. Рестрикция производилась при 37 °С в течение 10 часов. Для разделения продуктов рестрикции производился электрофорез на 3,5 % агарозном геле в течение 40 минут. Аллель С имела 1 фрагмент длиной 153 п.н., аллель Т имела 2 фрагмента длиной 116+36 п.н., гетерозиготные особи имели комбинацию из всех 3 фрагментов – 153, 116, 36 п.н.

Амплификация производилась методикой ПЦР-ПДРФ. Амплификацию проводили на многоканальном термоциклере "Терцик" (НПО "ДНК-Технология", Москва). С целью оптимизации ПЦР для каждой пары праймеров рассчитывали оптимальный температурно-временной режим отжига и подбирали соответствующую концентрацию MgCl₂.

Статистические методы

Для оценки соответствия распределений генотипов и для сравнения частот аллелей и генотипов в выборках больных и здоровых людей использовали критерий Хи-квадрат Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность. Ожидаемую гетерозиготность рассчитывали по Ne_i, также рассчитывали относительное отклонение ожидаемой гетерозиготности от наблюдаемой.

Для сравнения частот аллелей и генотипов между группами больных и здоровых людей также использовали критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса на непрерывность

[Пузырев, Фрейдин и др., 2009]. Об ассоциации аллелей или генотипов с предрасположенностью к послеоперационному грыжеобразованию судили по величине отношения шансов (OR).

Во всех случаях уровень статистической значимости принимали за 95 % ($p < 0,05$).

Результаты

Распределение частот генотипов данных полиморфизмов и их соответствие популяционному равновесию Харди – Вайберга (РХВ) проводилось отдельно в экспериментальной и контрольной группах. Результаты данного анализа представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Распределение частот генотипов и значения гетерозиготности по полиморфным вариантам генов в контрольной выборке

Ген	Полиморфизм и его локализация в гене	генотип	Распределение генотипов		Уровень гетерозиготности		χ^2 , (p)
					Но	Не	
TGF- β 1	509 С/Т	509 СС	46	39,3 %	0.364	0.488	3,54 (p>0,05)
		509 СТ	43	36,8 %			
		509 ТТ	28	23,9 %			

Но – наблюдаемая.

Не – ожидаемая гетерозиготность.

χ^2 Пирсона и достигнутый уровень значимости для теста на РХВ (df=1).

Таблица 2

Распределение частот генотипов и значения гетерозиготности по полиморфным вариантам генов в экспериментальной группе

Ген	Полиморфизм и его локализация в гене	генотип	Распределение генотипов		Уровень гетерозиготности		χ^2 , (p)
					Но	Не	
TGF- β 1	509 С/Т	509 СС	34	23,6%	0.444	0.497	0,9 (p>0,05)
		509 СТ	64	44,4%			
		509 ТТ	46	32%			

Но – наблюдаемая.

Не – ожидаемая гетерозиготность.

χ^2 Пирсона и достигнутый уровень значимости для теста на РХВ (df=1)

В обеих группах распределение частот генотипа соответствовало критерию Харди – Вайнберга.

Далее был проведен сравнительный анализ частот аллелей и частот генотипов в обеих выборках и их сравнительный анализ между собой. Получены отношения шансов (OR).

Таблица 3

Сравнительная характеристика частот аллелей и частот генотипов полиморфизма гена TGF- β 1 509 С/Т в экспериментальной и контрольной группах

Аллели	Частоты аллелей		Критерий различий χ^2 , (p)	OR
	Больные	Контроль		
509 С	0.458	0.577	7,27 (0,007)*	0,62
509 Т	0.542	0.433		1,61
Генотипы	Частоты генотипов		Критерий различий χ^2 , (p)	OR
	Больные	Контроль		
509 СС	0,236	0,393	7,59 (0,02)*	0,48
509 СТ	0,444	0,368		1,38
509 ТТ	0,319	0,239		1,49

По данным таблицы 3 видно, что имели место статистически достоверные различия между группами по частоте аллелей, критерий χ^2 составил 7,27 . Отношение шансов для мутантного аллеля Т составило 1,61. По частотам генотипов также были выявлены статистически достоверные различия, χ^2 составил 48,67. Для дикого генотипа СС отношение шансов 1,49.

Обсуждение

Учитывая полученные данные, можно утверждать, что у лиц, имеющих мутантный генотип ТТ полиморфизма 509 С/Т гена TGF- β 1, риск заболеть абдоминальной грыжей составляет более чем 7:1. При этом у людей с диким генотипом СС отношение шансов составил всего 0,15. В связи с этим, можно заключить, что мутантный аллель Т ассоциирован с риском развития абдоминальных грыж. Наличие мутантного генотипа данного гена может служить прогностическим признаком развития послеоперационных вентральных грыж, что необходимо учитывать при формировании тактики хирургического лечения.

Список литературы

1. Горбунов О. М. Некоторые организационные вопросы лечения ущемленных грыж живота / О. М. Горбунов, М. Х. Ашхамов, В. Ф. Даничкин // Вестн. хирургии. – 1993. – № 1. – С. 118-120.
2. Зубова С. Г. Молекулярные механизмы действия фактора некроза опухолей α и трансформирующего фактора роста в процессе ответа макрофага на активацию / С. Г. Зубова, Б. В. Окулов // Иммунология. – 2001. – № 5. – С. 18–22.
3. Нелюбин П. С., Галота Е. А., Тимошин А. Д. Хирургическое лечение больных с послеоперационными и рецидивными вентральными грыжами // Хирургия – 2007. – № 7. – С. 69–74.
4. Послеоперационные вентральные грыжи / Н. М. Скутельский, Д. У. Душан, Н. В. Парахоняк, Д. И. Соловьёва // Хирургия. – 1982. – № 10. – С. 57-60.
5. Annes J., Munger J., Rifkin D. Making sense of latent TGF-beta activation // J. Cell. Sci. – 2003. – Vol. 116. – P. 217–224.
6. Blobel G., Schiemann W., Lodish H. Role of transforming growth factor beta in human disease // N. Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 342. – P. 1350–1358.
7. Dieckgraefe B. K., Stenson W. F., Alpers D. H. Gastrointestinal epithelial response to injury // Curr Opin Gastroenterol. – 1996. – № 12. – С. 109-114.
8. Dieckgraefe B. K., Stenson W. F., Alpers D. H. Gastrointestinal epithelial response to injury // Curr Opin Gastroenterol. – 1996. – № 12. – С. 109 – 114.

Рецензенты:

Полоников Алексей Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии Курского государственного медицинского университета Минздрава России, г. Курск.

Солодилова Мария Андреевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии Курского государственного медицинского университета Минздрава России, г. Курск.