

сагиттальных срезах у здоровых юношей разных соматотипов. Установлено, что большинство вертикальных размеров тел, межпозвонковых дисков, поясничного отдела позвоночника в целом достоверно больше или имеют тенденции к большим значениям у юношей эктоморфов по сравнению с юношами с другими соматотипами. Поперечные размеры (средняя ширина) тел третьего-четвертого позвонков достоверно больше или имеют тенденции к большим значениям у юношей мезоморфов и юношей со средним промежуточным соматотипом по сравнению с юношами экто- и эндо-мезоморфами.

Ключевые слова: компьютерная томография, поясничный отдел позвоночника, морфометрия, здоровые юноши, соматотип.

Стаття надійшла 2.10.2014 р.

sagittal-sections in healthy young men of different somatotype. Found that most vertical dimensions of bodies, intervertebral discs lumbar spine in general significantly larger or tend to their higher values in boys with boys ectomorph compared with other somatotype. The transverse dimensions (average width) bodies of the third and fourth vertebrae significantly larger or tend to their high values in boys mesomorph and young men with an average intermediate somatotype compared to boys ecto-and endo-mesomorph.

Key words: computed tomography, lumbar spine, morphometry, healthy young men, somatotype.

Рецензент Похилько В.І.

УДК 616.34:575.191

А. Э. Дорофеев, Е. А. Кирьян*

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, г. Донецк, *ВГУЗ Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», г. Полтава

НЕКОТОРЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИИ КИШЕЧНИКА

Целью данного исследования была оценка генетической предрасположенности по мутациям генов толл-подобных рецепторов у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК). Было обследовано 92 пациента с ВЗК. Среди обследованных было 54 (58,7%) больных неспецифическим язвенным колитом (НЯК) и 38 (41,3%) пациентов с болезнью Крона. Всем больным была проведена ДНК-диагностика, включавшая анализ мутаций толл-подобного рецептора 3 - TLR3 (мутация Phe412Leu) и толл-подобного рецептора 4 – TLR4 (мутация Asp299Gly). У большинства - 60 (65,2%) обследованных больных ВЗК имела генетическая предрасположенность к развитию патологии кишечника. При этом, полиморфизм TLR-3 чаще встречался у больных НЯК, а мутации TLR-4 у пациентов с болезнью Крона. Наличие мутаций толл-подобных рецепторов сочеталось с более тяжелыми формами заболевания и распространенным воспалением в кишечнике.

Ключевые слова: ВЗК, толл-лайк рецепторы, мутации.

В современном мире отмечается значительный рост кишечной патологии. Одним из ведущих механизмов развития как функциональных, так и органических заболеваний кишечника являются генетические мутации [3]. Нарушение сложных генетических, регуляторных, метаболических взаимосвязей приводит к прогрессированию этих заболеваний. Длительный хронический воспалительный процесс может индуцировать возникновение пролиферативных изменений в эпителии кишечника, способствовать появлению неопластических образований.

Эффективность защитных свойств слизистой оболочки кишечника (СОК) является основополагающей в предотвращении возникновения кишечной патологии. Мукозный слой, покрывающий эпителий кишечника, относят к компонентам врожденной и приобретенной иммунной защиты организма. Муцинообразование напрямую зависит от экспрессии генов муцинов. По данным последних исследований, известно не менее 20 независимых генов, отвечающих за синтез муцинов. Различают гелеобразующие и мембрано - связанные муцины. Гены, ответственные за выработку гелеобразующих муцинов, в основном локализируются на хромосомном локусе 11 p 15 [1, 2]. Гены MUC 2, MUC19 распределяются в тканях кишечника и непосредственно отвечают за выработку муцинов слизи эпителия. Муцины выделяются клетками в зоне повреждения или воспаления, защищая эпителий от патогенных микроорганизмов, механического повреждения, действия протеаз, кислой среды секретируемой клетками, секвестрируют биологически активные вещества [10, 12].

Гены, ответственные за выработку мембрано-связанных муцинов размещаются на таких локусах хромосомы, как 7q22, 1q21, 3q29, 3q13, 4q24 и др. В толстом и тонком кишечнике выявляются гены MUC1, MUC 3, MUC 4, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC17, MUC20. Находясь внутри клетки эпителия кишечника, гены MUC1 и MUC4, регулируют передачу внутриклеточных молекулярных сигналов. При локализации домена вне клетки, располагаясь над ее поверхностью, являются составной частью гликокаликса, обуславливая про- и антиадгезивные свойства поверхностной мембраны [4, 9]. Гены, отвечающие за муцинообразование, имеют значительный полиморфизм, что связывают с неравным кроссинговером между гомологичными генами. Однако, несмотря на это, сохраняется видо – и тканеспецифичность экспрессии генов муцинов. Полиморфизм этих генов определяет своевременность ответа на изменения в

окружающем мире, появление микробиотических нарушений.

Мутации в генотипе муцина могут являться пусковым механизмом в формировании патологии кишечника. Выявленные изменения в олигосахаридных цепях муцинов при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК), злокачественной патологии толстой кишки, непосредственно связывают с генетическими изменениями. При появлении аденомы толстой кишки, ген MUC 2 имеет усиленную экспрессию, которая прогрессивно увеличивается при канцероматозных изменениях в случае муцинопродуцирующей опухоли, и снижается при образовании немүцинозной опухоли. Стимуляция гена MUC 3, регулирующего продукцию таких цитопротекторных веществ как аргинин, глутамин, полиамины, способствует репарации эпителия кишечника. При наличии мутаций гена MUC 3 могут появляться структурные изменения слизистой кишечника за счет нарушения репаративных свойств эпителия. Присоединение дисбиоза может провоцировать возникновение воспаления в СОК и приводить к хронизации заболевания.

MUC1 является первым идентифицированным муцином, который кодируется геном, расположенным в 21-ом локусе длинного плеча 1-й хромосомы. По данным некоторых исследователей, выявлено несколько десятков вариантов генетических полиморфизмов MUC1, влияние которых было описано при доброкачественных и злокачественных изменениях эпителия, ВЗК. Ген MUC1 способствует устойчивости эпителия при инфекционной агрессии. Кроме этого, ген регулирует передачу сигнала о появлении инфекции с поверхности эпителия внутрь на сигнальные системы [7, 8].

Увеличение экспрессии гена MUC1 тесно связаны с Toll-подобными рецепторами и транскрипционным фактором NF-κB (карра В – «каппа-би») [11]. В результате усиленной экспрессии происходит обратное подавление нисходящего сигнального каскада Toll-подобных рецепторов, приводящее к снижению секреции провоспалительных цитокинов, выраженности острой фазы воспаления. Перед повышением содержания муцина, происходит активация транскрипционных факторов – NF-κB, Sp1, STAT, которые взаимодействуют с промотором гена MUC1. Усилению экспрессии MUC1 способствуют фактор некроза опухолей альфа (TNF – α), гамма – интерферон (ИФН – γ) [6] и активные формы кислорода. Таким образом, увеличения экспрессии MUC1 в эпителии имеет провоспалительный характер при инфекционном поражении, усиливает устойчивость эпителиального барьера. Кроме этого, отмечается способность гена MUC1 инициировать реакции гуморального и Т – клеточного иммунитета [1].

Некоторые авторы отмечают роль гена MUC1 в развитии опухолевого процесса. MUC1 экспрессируется клетками большинства эпителиальных злокачественных опухолей человека, в том числе и желудочно-кишечного тракта. Так, при деполаризованном распределении MUC1 в клетках опухоли, выявлено неблагоприятное течение колоректального рака (КРР). А повышение уровня экспрессии гена MUC1 коррелирует со степенью дифференцировки рака кишечника, и усилением метастатических процессов [5], что можно использовать для прогнозирования течения заболевания. Таким образом, гены муцинов играют важную роль в поддержании стабильности работы не только кишечника, но и гомеостаза всего организма, с учетом воздействия на иммунологический статус, участия в распознавании инфекционных патогенов, регуляции воспалительной реакции, влияния на трансформацию и прогрессирование неопластических процессов.

Для выявления патогенных компонентов, которые запускают ответные иммунные реакции, в организме имеются сигнальные паттернраспознающие рецепторы. Именно толл-подобные рецепторы (TLR), которые относятся к этому классу, располагаясь на апикальной мембране эпителия кишечника, дают возможность организму своевременно среагировать на чужеродные агенты и запустить защитный иммунный и воспалительный ответы через активацию NF-κB. Некоторые авторы развитие атеросклероза, аллергических, аутоиммунных, инфекционных, а по некоторым данным и онкологических заболеваний связывают с полиморфизмом генов TLR. Так, нарушения структуры паттернраспознающего домена TLR 4, появление полиморфизма Asp299Gly Thr399Ile, взаимосвязаны с риском возникновения ВЗК. Другие исследователи возникновение этих аминокислотных полиморфизмов связывали со стриктурными осложнениями при болезни Крона. Помимо этого, доказано, что полиморфизм гена TLR 4 Asp299Gly изменяет устойчивость макроорганизма к грамотрицательным бактериям, тем самым способствуя возникновению дисбиоза.

При появлении единичных нуклеотидных замен в гене TLR 2, изменяется восприимчивость различных инфекционных агентов. Мутационный полиморфизм в гене TLR 2 Arg753Gln увеличивает склонность к появлению осложненного течения инфекций, обусловленного грамположительными бактериями, вплоть до развития септического состояния.

Появление в гене TLR 9 единичных нуклеотидных замен, имеет корреляцию с опухолевым ростом, а полиморфизмы - 1486 С/Т, 1174 А/Г с повышенным риском возникновения неспецифического язвенного колита. Данные изменения выявляют как в LRR - домене, так в TIR - домене передающем сигналы. Полиморфизм в генах TLR5 Arg392Stop и TLR 6 Ser249Pro также связывают с возникновением ВЗК. Следовательно, генетические мутации TLR могут способствовать появлению воспалительных реакций в эпителии кишечника, тем самым инициируя структурные изменения клеток, влияя на развитие органической патологии. Своевременное выявление полиморфизма генов TLR может помочь в коррекции лечения.

Целью работы была оценка генетической предрасположенности по мутациям генов толл-подобных рецепторов у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.

Материал и методы исследования. Было обследовано 92 пациента с ВЗК. Среди обследованных было 54 (58,7%) больных НЯК и 38 (41,3%) пациентов с болезнью Крона. Всем больным была проведена ДНК-диагностика в отделе молекулярно-генетических исследований ЦНИЛ ДонНМУ им. М. Горького, включавшая анализ мутаций толл-подобного рецептора 3 - TLR3 (мутация Phe412Leu) и толл-подобного рецептора 4 – TLR4 (мутация Asp299Gly). ДНК выделена из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь». В работе были использованы диагностические тест-системы «SNP-экспресс», разработанные НПФ Литех.

Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК с последующим электрофоретической детекцией. Реакция проводилась при следующих условиях: первичная денатурация при 93°C в течение 1 мин, после которой следовали 35 циклов, состоящих из денатурации при 93°C в течение 10 сек, отжига праймеров при 64°C в течение 10 сек, элонгации при 72°C в течение 20 сек. ПЦР проводили на амплификаторе Gene Amp® PCR System 2400 (Applied Biosystems). Анализ амплифицированных фрагментов производили путем электрофореза в 3%-ном агарозном геле, окрашенном в бромистом этидии. Визуализацию результатов проводили в ультрафиолетовом трансиллюминаторе "TFX-20.M" ("Vilber Lourmat", Франция).

Результаты исследования и их обсуждение. Полиморфизм TLR-3, TLR-4 наблюдался более, чем у половины обследованных больных ВЗК – 60 (65,2%) пациентов. Мутация TLR-3 (Phe412Leu) встречалась чаще, чем TLR-4, и отмечалась у 37 (41,1%) больных ВЗК. Преобладающее количество мутаций были гетерозиготными. Полные мутации (Leu/Leu) были отмечены только у 6 (16,2%) обследованных пациентов ВЗК. Частота встречаемости точечной мутации TLR-3 отличалась в зависимости от типа ВЗК. Гетерозиготные мутации (Phe/Leu) преобладали среди больных НЯК - 24 (64,9%). Неполные мутации встречались с меньшей частотой при БК - 13 (35,1%) пациентов. Гомозиготные мутации TLR-3 (Leu/Leu) также преобладали среди пациентов с НЯК - 4 (10,8%), по сравнению с больными БК – 2 (5,4%) пациентов, однако данные отличия не были достоверными. Таким образом, полиморфизм TLR-3 чаще наблюдался у больных НЯК, что может свидетельствовать о преобладании избыточного ответа на бактериальные полисахариды как облигатной, так и факультативной микрофлоры кишечника, запускающего каскад провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-6, IL-12), играющих ключевую роль в формировании ВЗК.

Мутация TLR-4 (Asp299Gly) у обследованных больных наблюдалась несколько реже, чем TLR-3, и встречалась только у 23 (25,0%) пациентов ВЗК. У всех больных отмечались только гетерозиготные мутации TLR-4 (Asp/Gly). Полиморфизм TLR-4 превалировал у больных БК - 15 (65,2%), в отличие от больных НЯК, у которых данная мутация наблюдалась лишь у 8 (34,8%) пациентов. Следовательно, снижение или отсутствие способности адекватного распознавания бактериальных липополисахаридов вследствие мутации TLR-4 более характерно для больных БК. Это приводит к снижению ответа на бактериальный эндотоксин грамотрицательной флоры, индукции и хронизации воспалительного процесса в кишечнике. Возможно, это объясняет тот факт, что нарушение микробиоценоза толстого кишечника за счет патогенной микрофлоры, кишечные инфекции предшествуют развитию, а также провоцируют обострения у пациентов с болезнью Крона чаще, чем у больных НЯК.

Генетическая предрасположенность с сочетанной мутацией TLR-3 и TLR-4 наблюдалась только у 9 (9,8%) больных ВЗК. При этом сочетанные мутации встречались с равной частотой, как у больных НЯК, так и БК, что, возможно, связано с небольшим количеством наблюдений.

Следует отметить, что у пациентов с наличием генетической предрасположенности – мутациями толл-подобных рецепторов заболевание протекало тяжелее и имело более распространенные формы поражения. У пациентов с НЯК сочетанные мутации TLR-3 и TLR-4

виявлені тільки у больних з розпространими формами захворювання: лівостороннім і тотальним НЯК, а середі пацієнтів з дистальними формами НЯК комбіновані мутації не виявлені ні у одного больного. В групі пацієнтів з хворобою Крона комбіновані мутації толл-подібних рецепторів переважно виявлялись у больних з пенетруючою або стенозуючою формою захворювання, що обумовлювало більш тяжке перебігання і передбачало особливості терапії. Крім цього, у больних з наявністю мутацій толл-подібних рецепторів достовірно частіше зустрічались внекишечні прояви ВЗК, особливо у пацієнтів з наявністю точкових мутацій TLR-4 і комбінованих мутацій TLR-3 і TLR-4 ($p < 0,05$).

Висновок

У більшості обстежених больних ВЗК була генетична схильність до розвитку патології кишечника. При цьому, поліморфізм TLR-3 частіше зустрічався у больних НЯК, а мутації TLR-4 у пацієнтів з хворобою Крона. Наявність мутацій толл-подібних рецепторів комбінувалась з більш тяжкими формами захворювання і розпространим запаленням в кишечнику.

Список літератури

1. Dorofeyev A. E. *Izmeneniya ekspressii MUC2, MUC3, MUC4, TFF3 v slizistoy obolochke tolstogo kishechnika u bolnykh nespetsificheskimi yazvennyimi kolitami* / A. E. Dorofeyev, I. V. Vasilenko, O. A. Rassolina // *Gastroenterologiya*. – 2013. – №1 (47).
2. Karmakova T. A. *Mutsin MUC1 kak biologicheskiy marker v morfologicheskikh i serologicheskikh issledovaniyakh u onkologicheskikh bolnykh: avtoref. dis. na zdobuttya nauk. stupenya doktora biol. nauk.: spets. «onkologiya» 14.01.12* / T. A. Karmakova – М., - 2014. – 27 s.
3. Fadeyenko G. D. *Dostizheniya genetiki i genomiki v gastroenterologii* / G. D. Fadeyenko, A. S. Popovich // *Zdorovya Ukrainy*. – Tematichnyi nomer, berezen - 2014. – S. 20 – 21.
4. Albrecht H. 3rd. *MUC1 and MUC4: switching the emphasis from large to small* / H. Albrecht, K. L. Carraway // *Cancer. Biother. Radiopharm.* - 2011 Vol. 26(3). P.261-271.
5. Inagaki Y. *Clinicopathology of sialomucin: MUC1, particularly KL-6 mucin, in gastrointestinal, hepatic and pancreatic cancers* / Y. Inagaki, H. Xu, M. Nakata [et al.] // *Biosci. Trends*. - 2009. Vol. 3(6). P.220-232.
6. Kyo Y. *Antiinflammatory role of MUC1 mucin during infection with nontypeable Haemophilus influenzae* / Y. Kyo, K. Kato, Y.S. Park [et al.] // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* - 2012. Vol. 46(2). P.149-156.
7. McGuckin M. A. *Muc1 mucin limits both Helicobacter pylori colonization of the murine gastric mucosa and associated gastritis* / M. A. McGuckin, A. L. Every, C. D. Skene [et al.] // *Gastroenterology*. - 2007. Vol. 133(4). P.1210-1218.
8. McAuley J. L. *MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection* / J. L. McAuley, S. K. Linden, C. W. Ping [et al.] // *J. Clin. Invest.* - 2007. Vol. 117(8) P.2313-2324.
9. McGuckin M. A. *Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases* / M. A. McGuckin, R. Eri, L. A. Simms [et al.] // *Inflam. Bowel Dis.* – 2009. – №15. – P. 100 – 113.
10. Rubin B.K. *Mucus and mucins* // B.K. Rubin *Otolaryngol. Clin. North. Am.* - 2010. - Vol. 43,(1). - P.27-34.
11. Ueno K. *MUC1 mucin is a negative regulator of toll-like receptor signaling* / K. Ueno, T. Koga, K. Kato [et al.] // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* - 2008. Vol. 38(3). P.263-268.
12. Williams O.W. *Airway mucus: From production to secretion* / O. W. Williams, A. Sharafkhaneh, V. Kim [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* - 2006. - Vol.34 (5). - P.527-536.

Реферати

ДЕЯКІ ГЕНЕТИЧНІ ПРЕДІКТОРИ РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЇ КИШЕЧНИКА

Дорофєєв А. Е., Кир'ян О. А.

Метою цієї роботи була оцінка генетичної схильності до мутацій генів толл-подібних рецепторів у пацієнтів із запальними захворюваннями кишечника (ЗЗК). Було обстежено 92 пацієнта з ЗЗК. Серед обстежених було 54 (58,7%) хворих на неспецифічний виразковий коліт (НВК) та 38 (41,3%) пацієнтів з хворобою Крона. Усім хворим була проведена ДНК-діагностика, яка включала аналіз мутацій толл-подібного рецептора 3 - TLR3 (мутація Phe412Leu) та толл-подібного рецептора 4 - TLR4 (мутація Asp299Gly). У більшості - 60 (65,2%) обстежених хворих ЗЗК була діагностована генетична схильність до розвитку патології кишечника. При цьому, поліморфізм TLR-3 частіше зустрічався у хворих НВК, а мутації TLR-4 у пацієнтів з хворобою Крона. Наявність мутацій толл-подібних рецепторів поєднувалась з більш тяжким перебігом захворювання та розповсюдженням запалення у кишечнику.

Ключові слова: ВЗК, толл-лайк рецептори, мутації.
Стаття надійшла 26.09.2014 р.

SOME GENETIC PREDICTORS OF BOWEL PATHOLOGY DEVELOPMENT

Dorofeyev A. E., Kyryan E. A.

Aim of this study was to analyze genetic predisposition to toll-like receptors genes mutations in patients with inflammatory bowel diseases (IBD). 92 patients with inflammatory bowel diseases were examined. Among them 54 (58.7%) patients with ulcerative colitis and 38 (41.3%) patients with Crohn's disease were observed. In all patients DNA diagnostic with analysis of mutations toll-like receptor 3 - TLR3 (mutation Phe412Leu) and toll-like receptor 4 - TLR4 (mutation Asp299Gly) were performed. In majority of IBD patients - 60 (65.2%) genetic predisposition to bowel pathology was observed. At the same time, TLR-3 polymorphism in ulcerative colitis patients were found more often, but TLR-4 mutations in Crohn's disease patients more often were observed. Presence of toll-like receptors mutations correlated with more severe form of diseases and more extent.

Key words: IBD, Toll-like receptor mutation.
Рецензент Запорожець Т.М.