

УДК: 616.33-002.44-036:575.1]-053.2

ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ПРОГНОЗУВАННЯ
ШЛУНКОВО-КИШКОВИХ КРОВОТЕЧ
У ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА ВИРАЗКОВУ ХВОРОБУ

С.О. Сокольник

Буковинський державний медичний університет
МОЗ України
(м.Чернівці, Україна)**Ключові слова:** діти, шлунково-кишкова кровоте-
ча, виразкова хвороба, генетичний поліморфізм.**Резюме.****Мета.** Вивчити розподіл та дослідити асоціативні зв'язки поліморфізму гена ІЛ-1 β -511СТ та частоти тандемних повторень гена ІЛ-1РА у дітей Чернівецької області, хворих на ускладнену шлунково-кишковою кровотечею виразкову хворобу.**Матеріал і методи.** Обстежено 94 дитини, хворих на ускладнену шлунково-кишковою кровотечею виразкову хворобу, та 50 здорових дітей, віком 7-18 років, що проживають у Чернівецькій області та м. Чернівці. Методом полімеразної ланцюгової реакції визначено генетичний поліморфізм генів ІЛ-1 β -511СТ та ІЛ-1РА в дітей.**Результати.** Ризик виникнення кровотечі в дітей із неускладненим перебігом виразкової хвороби зростає у двічі за наявності алеля ІЛ-1 β -511*Т та у 5,0 і 5,79 рази - алеля Р2-ІЛ-1РА та генотипа Р2Р2-ІЛ-1РА. Носійство генотипів ІЛ-1 β -511СС та Р2Р2-ІЛ-1РА підвищує ризик розвитку кровотечі виразкового генезу в здорових у 3,50 та 2,88 рази.**Заключення.** Вивчення генетичного поліморфізму генів дозволило виділити фактори підвищеного ризику виникнення шлунково-кишкової кровотечі при виразковій хворобі та фактори протекторної дії.**Вступ**

Вивчення різних аспектів патогенезу шлунково-кишкових кровотеч (ШКК) в цілому та при виразковій хворобі шлунка та дванадцятипалої кишки (ВХ) у дітей є одним із актуальних завдань дитячої гастроентерології та дитячої хірургії. Це зумовлено особливостями сучасного перебігу захворювання, до найбільш значущих з яких відносять значне омоложення патології, збільшення кількості рецидивів, тривале збереження гостроти запально-деструктивних процесів, нівелювання сезонності загострень, нетиповість клінічних проявів (олігосимптомний перебіг, безбольовий варіант), збільшення частоти ускладнень та маніфестування з них захворювання, відсутність бажаного ефекту від лікування, резистентність до лікувальних заходів, що проводяться [1]. Одним із найбільш перспективних патогенетичних напрямків є вивчення генетичної компоненти розвитку мультифакторних захворювань та їх ускладнень, яким є ВХ [4].

Вагома роль у формуванні відповіді організму на вплив патогенного фактору при ВХ відводиться імунній системі, в реалізації дії якої та координації імунологічних реакцій особливе значення приділяється інтерлейкінам, які забезпечуючи взаємозв'язок між клітинами імунної, фагоцитарної систем та гемостазом, призводять до регенерації тканин та утворення рубця [2]. Порушення балансу прозапальних та протизапальних інтерлейкінів, рівень їх продукції та вплив на імунорегуляторні й ефекторні імунні механізми визначає вираженість та спрямованість системної запальної реакції при ВХ, що визначає клінічний поліморфізм захворювання, його наслідки та ефективність проведеного лікування, регуляція

чого зумовлена їх генетичним поліморфізмом [3]. Незважаючи на те, що все більша кількість проведених досліджень доводять роль цитокінів у регуляції судинно-тромбоцитарного гемостазу та процесу згортання крові, мало вивченими залишаються питання впливу алельного поліморфізму генів цитокінів на гемостаз при ШКК виразкового генезу [6]. Існує думка, що підвищена концентрація ІЛ-1 β у слизовій оболонці шлунка та дванадцятипалої кишки може сприяти рецидивуванню ВХ та розвитку ускладнень, оскільки він регулює взаємодію між лейкоцитами та ендотеліальними клітинами, що призводить до оклюзії мікроциркуляторного русла та ішемії, а відповідно – до гіпоксії та пошкодження ендотеліально-епітеліальних клітин [5].

Тому, вивчення генетичного поліморфізму генів визначальних цитокінів, варіабельність асоціацій яких спостерігається у різних країнах та етнічних групах, вимагає проведення окремих досліджень для визначення їх ролі в розвитку найпоширенішого ускладнення ВХ – ШКК у конкретної дитини.

Мета роботи – вивчити розподіл та дослідити асоціативні зв'язки поліморфізмів генів інтерлейкіна-1бета (ІЛ-1 β) у промоторній ділянці -511СТ та частоти тандемних повторень гена рецепторного антагоністу інтерлейкіну-1 (ІЛ-1РА) у дітей Чернівецької області, хворих на ускладнену шлунково-кишковою кровотечею виразкову хворобу.

Матеріал і методи

З дотриманням принципів біоетики та підписання інформованої згоди пацієнта проведено комплексне клінічно-параклінічне обстеження 94 дітей, хворих на ВХ, та 50 практично здорових ді-

тей, українців, віком 7-18 років, що проживають у Чернівецькій області та м. Чернівці. Верифікація клінічного діагнозу та класифікація ВХ проводилися відповідно до протоколів лікування дітей за спеціальністю «Дитяча гастроентерологія» (наказ МОЗ України №59 від 29.01.2013 року). Ступінь тяжкості кровотечі та його стійкість оцінювали за класифікацією S. A. Forrest et al. (1974 р., активна кровотеча (FIA, FIB); кровотеча, що відбулася (FIIA, FIIB, FIIC, FIIP)), та показниками загального аналізу крові і коагулограми.

Комплексне обстеження дітей дозволило виділити три групи спостереження: I (29 осіб) - хворі з ШКК, II (65 осіб) – хворі на неускладнену ВХ, III (50 осіб) – здорові діти. Слід зазначити, що до I групи увійшло 14 дітей, що поступили в ургентному порядку на лікування до хірургічного відділення з ознаками кровотечі FI, FIIA, FIIB та 15 дітей з діагнозом неускладненої ВХ, що поступили на лікування до гастроентерологічних відділень лікарень міста (на 2-3 добу після появи клінічної симптоматики) без явних ознак активної кровотечі, однак ендоскопічно встановлено FIIB, FIIC та ознаки нестабільного гемостазу.

Дослідження поліморфізму генів IL-1β-511CT та IL-1PA проводили методом рестрикційного аналізу продуктів ампліфікації специфічних ділянок геному. Кров забирали вранці натще в кількості 1 мл у еппендорф, що вміщував 2,5 % розчин ЕДТА. Загальну геномну ДНК виділяли з крові згідно стандартного протоколу з використанням протеїнази K та додецилсульфату натрію в якості детергенту. Ампліфікацію потрібної ділянки промотора гена здійснювали методом ПЛР на ампліфікаторі PTC-100 (MJ Research Inc, США) з використанням пари специфічних праймерів, що синтезовані фірмою Sigma-Aldrich (Німеччина).

Для генотипування IL-1β за одонуклеотидною заміною -511CT отримані продукти ПЛР обробляли рестриктазою Aval. Для дослідження поліморфізму гена IL-1PA VNTR використовували праймери, що фланірують поліморфний регіон у межах другого інтрону, в якому знаходиться VNTR – 86 п.н. Шляхом ампліфікації визначали фрагменти ДНК із 2, 4, 5 тандемними повторами. Отримані рестриктні фрагменти аналізували методом електрофорезу у 2% агарозному гелі. Розрахунки очікуваних довжин ампліфікатів ДНК проводили за допомогою пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR із використанням послідовності генів, яка наявна у базі даних Genbank. Результати дослідження статистично оброблені за допомогою пакетів комп'ютерних програм «Statistica» for Windows 8.0.0. (SPSS I.N.C.; 1989-1997), «STATISTICA V.6.0» (Stat Soft Inc; 1984-1996). Для перевірки значущості загальної міри зв'язку використовували непараметричний критерій Пірсона (χ^2) та показник відношення шансів (ВШ).

Результати дослідження та їх обговорення

Результати дослідження поліморфізму гена IL-1β у промоторній ділянці -511CT в групах хворих на ВХ та здорових дітей представлено в таблиці 1. Встановлено, що у здорових осіб майже з однаковою частотою траплялися дикий і мутантний алелі гена IL-1β-511CT ($\chi^2=0,16$, $p>0,05$), тоді як в групі хворих на ВХ дітей з вірогідно вищою частотою діагностували дикий алель гена IL-1β-511CT ($\chi^2=46,08$, $p<0,0001$). Порівняльний аналіз частотного розподілу алелей гена IL-1β-511CT в групах спостереження виявив переважання в хворих на ВХ дітей алель IL-1β-511*С, тоді як у здорових осіб – алель IL-1β-511*Т ($\chi^2=15,30$, $p<0,0001$).

Таблиця 1

Розподіл алелей та генотипів гена інтерлейкіна-1бета в дітей

Показник	Алелі		Генотипи		
	IL-1β-511*С	IL-1β-511*Т	IL-1β-511СС	IL-1β-511СТ	IL-1β-511ТТ
Здорові (n=50)	0,510	0,490	0,260	0,500	0,240
Хворі на ВХ (n=94)	0,739	0,261	0,660	0,160	0,181
χ^2 , p	15,30, <0,0001		20,88, <0,0001	18,85, <0,0001	0,76, >0,05
ВШ / 95% ДІ	2,73 / 1,64 – 4,54	0,37 / 0,22 – 0,61	5,51 / 2,57 – 11,82	0,19 / 0,09 – 0,42	0,70 / 0,30 – 1,61

Попри відсутність вірогідних відмінностей між групою хворих та здорових осіб за частотою поширеності генотипу IL-1β-511ТТ ($\chi^2=0,76$, $p>0,05$), генотип IL-1β-511СС траплявся у 2,54 рази частіше ($\chi^2=20,88$, $p<0,0001$), а генотип IL-1β-511СТ у 3,12 рази рідше у хворих на ВХ дітей, порівняно зі здоровими ($\chi^2=18,85$, $p<0,0001$).

Отже, підвищена схильність до розвитку ВХ спостерігається в осіб із диким алелем IL-1β-511*С та гомозиготним за ним генотипом IL-1β-511СС, тоді як мутантний алель IL-1β-511*Т та гетерозиготний за ним генотип IL-1β-511СТ можна розцінювати в якості протекторів.

Внутрішньогруповий розподіл частот алелей гена IL-1β-511CT показав, що як в I, так і II групі вірогідно частіше відсутній генетичний дефект

у структурі гена: так, алель IL-1β-511*С у 1,76 рази в дітей із ШКК та у 3,64 рази в дітей із неускладненою ВХ частіше траплявся, ніж алель IL-1β-511*Т (табл. 2). Однак, незважаючи на це, порівняльний аналіз виявив підвищену схильність до виникнення ШКК в дітей із ВХ за наявності мутації – алеля IL-1β-511*Т (ВШ=2,07, 95 % ДІ [1,05-4,08], $p<0,05$).

У 55,2 % дітей із ШКК та у 70,8 % дітей із неускладненою ВХ траплявся генотип IL-1β-511СС, у 17,2 % і 15,4 % - генотип IL-1β-511СТ та у 27,6 % і 13,8 %- генотип IL-1β-511ТТ. Незважаючи на відсутність вірогідної різниці у розподілі генотипів гена IL-1β-511CT в дітей I та II груп спостереження, у 2,0 рази частіше в дітей із ШКК, ніж у хворих із неускладненою ВХ, траплявся гомо-

зиготний за мутантним алелем генотип ($\chi^2=2,56$, $p>0,05$), тоді як в останніх у 1,28 рази – гомозиготний за диким алелем генотип ($\chi^2=2,17$, $p>0,05$).

Порівняльний аналіз не виявив вірогідної різниці в розподілі алелей серед дітей I та III груп: майже з однаковою частотою в хворих із ШКК та здорових

траплялися як дикий, так і мутантний алелі ($\chi^2=2,43$, $p>0,05$). Проте з вірогідно більшою частотою в I групі, на відміну від III, діагностовано генотип ІЛ-1 β -511СС ($\chi^2=6,72$, $p<0,01$). Наявність даного генотипу в здорових дітей підвищує ризик розвитку ШКК в 3,50 рази (ВШ=3,50, 95 % ДІ [1,33-9,21], $p<0,01$).

Таблиця 2

Розподіл алелей та генотипів гена інтерлейкіна-1бета в групах спостереження

Показник	Алелі		Генотипи		
	ІЛ-1 β -511*С	ІЛ-1 β -511*Т	ІЛ-1 β -511СС	ІЛ-1 β -511СТ	ІЛ-1 β -511ТТ
I група (n=29)	0,638	0,362	0,552	0,172	0,276
II група (n=65)	0,785	0,215	0,708	0,154	0,138
III група (n=50)	0,510	0,490	0,260	0,500	0,240
χ^2	I:II=4,48; I:III=2,43		I:II=2,17 I:III=6,72	I:II=0,02 I:III=8,36	I:II=2,56 I:III=0,12
p	I:II < 0,05 I:III > 0,05		I:II>0,05 I:III<0,01	I:II>0,05 I:III<0,01	I:II>0,05 I:III>0,05
ВШ / 95% ДІ	I:II=0,48 / 0,25-0,95; I:III=1,69 / 0,87-3,29	I:II=2,07 / 1,05-4,08; I:III=0,59 / 0,30-1,15	I:II=0,51 / 0,21-1,26; I:III=3,50 / 1,33-9,21	I:II=1,15 / 0,35-3,71 I:III=0,21 / 0,07-0,63	I:II=2,37 / 0,81-6,95; I:III=1,21 / 0,43-3,42

Враховуючи те, що продукція ІЛ-1 β регулюється також і рецепторним антагоністом ІЛ-1, а, відповідно, концентрація останнього теж визначає рівень впливу ІЛ-1 β на клінічний перебіг захворювання, нами вивчена генетична структура

ІЛ-1РА в групах спостереження, яка показала, що у дітей всіх груп спостереження домінуючими за частотою були алелі з двома та чотирма тандемними повторами (рис.), інші генотипи гена ІЛ-1РА спостерігалися в обстежених із низькою частотою ($p>0,05$).

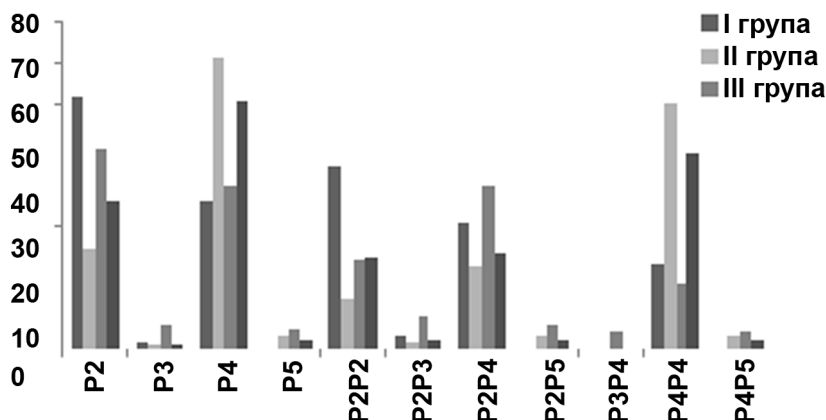


Рис. 1. Розподіл частот алелей та генотипів гена ІЛ-1РА в групах спостереження (%)

Порівняльний аналіз розподілу алелей та генотипів гена ІЛ-1РА в групах здорових та хворих встановив, що частота алеля з чотирма тандемними повторами (P4-ІЛ-1РА) гена ІЛ-1РА у 1,5 рази ($\chi^2=1,0$, $p>0,05$) та гомозиготного за ним генотипа (P4P4-ІЛ-1РА) у 2,99 рази ($\chi^2=14,26$, $p<0,001$) вища, ніж в групі здорових дітей. Тоді як в останніх частіше (у 1,35 рази, $\chi^2=1,91$, $p>0,05$) траплявся алель з двома тандемними повторами (P2-ІЛ-1РА) гена ІЛ-1РА та гетерозиготний за ним генотип (P2P4-ІЛ-1РА) – у 1,71 рази ($\chi^2=4,35$, $p<0,05$).

Аналізуючи частоту алельного поліморфізму гена ІЛ-1РА між групами спостереження варто зазначити, що у хворих із ШКК, дещо частіше, ніж в групі здорових ($\chi^2=4,35$, $p<0,05$) та вірогідно частіше, ніж в групі дітей неускладненою ВХ ($\chi^2=12,18$, $p<0,001$) траплявся алель P2-ІЛ-1РА. Алель P4-ІЛ-1РА в них діагностували рідше, ніж

в дітей II групи ($\chi^2=10,96$, $p<0,01$).

Розподіл генотипів гена ІЛ-1РА теж виявив ряд особливостей. Так, в I групі частота генотипу P2P2-ІЛ-1РА у 3,64 рази перевищувала показник в II групі ($\chi^2=12,22$, $p<0,001$) та у 2,04 рази - в III групі спостереження ($\chi^2=4,52$, $p<0,05$); тоді як генотип P4P4-ІЛ-1РА в них траплявся у 2,90 рази рідше, ніж в II групі ($\chi^2=12,42$, $p<0,001$). Гетерозиготний генотип P2P4-ІЛ-1РА вірогідно частіше траплявся в III групі, порівняно з II, ($\chi^2=5,52$, $p<0,05$) та дещо частіше, ніж в I групі ($\chi^2=0,64$, $p>0,05$).

В результаті проведених досліджень було встановлено, що за наявності алеля з двома тандемними повторами в дітей, хворих на ВХ, ризик виникнення кровотечі зростає у 5,01 рази (95 % ДІ [1,96-12,81]), а гомозиготного за ним генотипа – у 5,79 рази (95 % ДІ [2,04-16,39]) та у 2,88 рази (95 % ДІ [1,07-7,76]) – за наявності останнього у здо-

рових, тоді як алель Р4-ІЛ-1РА (ВШ=0,22, 95 % ДІ [0,08-0,55]) та генотип Р4Р4-ІЛ-1РА (ВШ=0,17, 95 % ДІ [0,06-0,48]) можуть слугувати в якості протекторів до виникнення ШКК в дітей із неускладненою ВХ.

Таким чином, оцінюючи отримані дані слід зазначити, що структура генів ІЛ-1β-511СТ та ІЛ-1РА різниться в дітей, хворих на ВХ, залежно від наявності ШКК та в здорових осіб, що дозволяє розглядати їх в якості факторів ризику або протекції до виникнення кровотечі.

Висновки

1. Фактором підвищеного ризику розвитку ШКК виразкового генезу в дітей Чернівецької об-

Література

1. Белоусов Ю.В. Хеликобактерная инфекция и интрагастральная кислотность у детей / Ю.В. Белоусов // Сучасна гастроентерологія. – 2007. – №2 – С. 26-29.
2. Желудочно-кишечные кровотечения у детей: монография / А.М. Запруднов, К.И. Григорьев, А.Ф. Дронов. - М.: Медицина - 1998. - 207 с.
3. Кононов А.В. Генетическая регуляция и фенотип воспаления при Helicobacter pylori – инфекции / А.В.Кононов // Арх. патологии. - 2009. - № 71 (5). – С.57-63.
4. Camargo M.C. Interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis / M.C. Camargo, R.Mera, P.Correra // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2006. – V.15. – P.1674-1687.
5. Dinorah N Martínez-Carrillo Association of IL1B -511C/-31T haplotype and Helicobacter pylori vacA genotypes with gastric ulcer and chronic gastritis / Dinorah N Martínez-Carrillo, Elvira Garza-González, Reyes Betancourt-Linares // BMC Gastroenterol. – 2010. – Vol.10. – 126.
6. Smith A.J.P. Cytocine and cytocine receptor polymorphism and their functionality / A.J.P. Smith, S.E.Humphries // Cytokine Growth Factor Rev. – 2011. – V.518. – P. 27-39.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЙ У ДЕТЕЙ С ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ

С.А. Сокольник

Буковинский государственный медицинский университет (г.Черновцы, Украина)

Резюме.

Цель. Изучить распределение и исследовать ассоциативные связи полиморфизма гена ІЛ-1β-511СТ и частоты тандемных повторов гена ІЛ-1РА у детей Черновицкой области с осложненной желудочно-кишечным кровотечением язвенной болезнью.

Материал и методы. Обследовано 94 ребенка с осложненной желудочно-кишечным кровотечением и неосложненной язвенной болезнью и 50 здоровых детей в возрасте 7-18 лет, которые проживают в Черновицкой области и городе Черновцы, Методом полимеразной цепной реакции у детей определен генетический полиморфизм генов ІЛ-1β-511СТ и ІЛ-1РА.

Результаты. Риск возникновения кровотечения у детей с неосложненным течением болезни увеличится вдвое при наличие аллели ІЛ-1β-511*Т и в 5,0 и 5,79 раза - аллели Р2-ІЛ-1РА и генотипа Р2Р2-ІЛ-1РА. Носительство генотипов ІЛ-1β-511СС и Р2Р2-ІЛ-1РА увеличивает риск развития кровотечения язвенного генеза у здоровых в 3,50 и 2,88 раза.

Заключение. Изучение генетического полиморфизма генов позволило выделить факторы повышенного риска возникновения желудочно-кишечных кровотечений при язвенной болезни и факторы протекторного действия.

Ключевые слова: дети, желудочно-кишечное кровотечение, язвенная болезнь, генетический полиморфизм.

ласті є носійство ІЛ-1β-511СС та Р2Р2-ІЛ-1РА генотипів генів ІЛ-1β-511СТ та ІЛ-1РА.

2. Наявність ІЛ-1β-511*Т алеля гена ІЛ-1β-511СТ та Р2-ІЛ-1РА алеля та Р2Р2-ІЛ-1РА генотипу гена ІЛ-1РА в дітей, хворих на неускладнену ВХ, асоціюється з підвищеним ризиком виникнення кровотечі.

Перспективи подальших досліджень

Необхідно вивчити частоту поліморфізму генів ІЛ-1β-511СТ та ІЛ-1РА на більшій когорті населення та вивчити асоціативні зв'язки комбінацій алелей та генотипів даних генів з ймовірністю розвитку шлунково-кишкових кровотеч при виразковій хворобі в дітей.

GENETIC ASPECTS OF PREDICTION OF GASTROINTESTINAL BLEEDING IN CHILDREN WITH PEPTIC ULCER

S.O. Sokolnyk

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi, Ukraine)

Summary.

Purpose. To study the distribution and to investigate the associative links of the ІЛ-1β-511СТ gene polymorphism and frequency of tandem repeats of the gene ІЛ-1РА in children of Chernivtsy region with complicated gastrointestinal bleeding ulcer.

Material and methods. The study involved 94 children with complicated gastrointestinal bleeding and uncomplicated peptic ulcer disease and 50 healthy children aged 7-18 years who lived in the Chernivtsy region and the city of Chernivtsy. Genetic polymorphisms of genes ІЛ-1β-511СТ and ІЛ-1РА in children was defined by polymerase chain reaction.

Results. The risk of bleeding in children with uncomplicated illness doubled in the presence of the alleles of ІЛ-1β-511*Т, and 5,0 and 5,79 times - R2 alleles of ІЛ-1РА and genotype R2R2-ІЛ-1РА. Genotype of the ІЛ-1β-511СС and R2R2-ІЛ-1РА carriage increases the risk of bleeding ulcer in healthy children at 3,50 and 2,88 times.

Conclusion. The study of genetic polymorphism of genes made possible to identify the factors of increased risk of gastrointestinal bleeding caused by ulcer and protective factors.

Keywords: children, gastrointestinal bleeding, peptic ulcer, genetic polymorphism.