

АСОЦІАЦІЯ МІЖ ПОЛІМОРФІЗМОМ ГЕНА ТКАНИННОГО ІНГІБІТОРА МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-2 (G303→A) ТА ЗОВНІШНІМИ КИШКОВИМИ НОРИЦЯМИ

Я.Ю. Войтів, О.Ю. Усенко

ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології імені О.О. Шалімова» НАМН України, м. Київ

Ключові слова:

зовнішні кишкові норці,
TIMP-2, поліморфізм
генів.

Буковинський медичний
вісник. Т.24, № 4 (96).
С. 7-11.

DOI: 10.24061/2413-0737.
XXIV.4.96.2020.96

E-mail: voitiv.

yaroslav@gmail.com;
ausenko1962@gmail.com

Мета – провести аналіз частоти поліморфних варіантів гена TIMP-2 (G303→A) у хворих із зовнішніми кишковими норціями.

Матеріал і методи. Об'єктом дослідження були 19 хворих із зовнішніми кишковими норціями, що лікувались у ДУ «НИХТ імені О.О. Шалімова» впродовж 2016-2019 рр. Проведені лабораторні, генетичні, гістологічні, імуногістохімічні та статистичні дослідження.

Результати. У результаті генетичного та статистичного аналізу поліморфізму гена TIMP-2 (G303→A) були визначені варіанти генотипів, які асоційовані з ризиком виникнення зовнішніх кишкових норців. Проаналізовано усі моделі успадкування та визначено найкращу модель із найнижчим інформаційним критерієм Айкайке, якою виявилась рецесивна модель.

Висновки. Зовнішні кишкові норці в 1,58 раза частіше трапляються в носіїв гомозиготного GG генотипу гена TIMP-2 (G303→A) та вдвічі рідше в гетерозигот GA (21,1% проти 40%, $p=0,057$). Носіїв мінорного гомозиготного AA генотипу в групі з кишковими норціями не виявлено, тоді як аналогічний варіант у контрольній групі – у 10% випадків.

АСОЦІАЦІЯ МЕЖДУ ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНА ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 (G303→A) И НАРУЖНЫМИ КИШЕЧНЫМИ СВИЩАМИ

Я.Ю. Войтив, О.Ю. Усенко

Ключевые слова:

наружные кишечные
свищи, TIMP-2,
полиморфизм генов.

Буковинский медицин-
ский вестник. Т.24, № 4
(96). С.7-11.

Цель – провести анализ частоты полиморфных вариантов гена TIMP-2 (G303 → A) у больных с наружными кишечными свищами.

Материал и методы. Объектом исследования были 19 больных с кишечными свищами, лечившихся в ГУ «НИХТ имени А.А. Шалимова» на протяжении 2016-2019 гг. Проведенные лабораторные, генетические, гистологические, иммуногистохимические и статистические исследования.

Результаты. В результате генетического и статистического анализа полиморфизма гена TIMP-2 (G303 → A) были определены варианты генотипов, ассоциированных с риском возникновения наружных кишечных свищей. Проанализированы все модели наследования и определена лучшая модель с низким информационным критерием Айкайке, которой оказалась рецессивная модель.

Выводы. Наружные кишечные свищи в 1,58 раза чаще встречаются у носителей гомозиготного GG генотипа гена TIMP-2 (G303 → A) и вдвое реже у гетерозигот GA (21,1% против 40%, $p = 0,057$). Носителей мінорного гомозиготного AA генотипа в группе с кишечными свищами не было обнаружено, тогда как аналогичный вариант – в контрольной группе в 10% случаев.

Оригінальні дослідження

ASSOCIATION BETWEEN GENE POLYMORPHISM OF THE TISSUE INHIBITOR MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (G303→A) AND ENTEROCUTANEOUS FISTULA

Ya. Yu. Voitiv, O. Yu. Usenko

Key words:

enterocutaneous fistula, tissue inhibitors of metalloproteinase-2, gene polymorphism.

Bukovinian Medical Herald. V.24, № 4 (96). P. 7-11.

Objective – to analyze the frequency of polymorphic variants of tissue inhibitors of metalloproteinase-2 (G303→A) gene in patients with enterocutaneous fistula.**Material and methods.** The object of the study comprises 19 patients with enterocutaneous fistula who were treated in the Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology during 2016-2019. Laboratory, genetic, histological studies and statistical analysis were performed.**Results.** As a result of genetic and statistical analysis of the tissue inhibitors of metalloproteinase-2 (G303→A) gene single nucleotide polymorphisms, genotype variants have been identified that are associated with the risk of enterocutaneous fistula development. All models of inheritance were analyzed and the best model with the lowest Akaike information criterion, which turned out to be a recessive model, has been determined.**Conclusions.** Enterocutaneous fistula is 1,58 times more common in carriers of homozygous GG genotype of the tissue inhibitors of metalloproteinase-2 (G303→A) gene and twice less common in heterozygotes GA (21,1% vs. 40%, $p=0,057$). Carriers of minor homozygotes of AA genotype in the group with enterocutaneous fistula were not detected, while a similar genotype in the control group was found in 10% of cases.

Вступ. Зовнішні кишкові нориці є тяжким ускладненням в абдомінальній хірургії, яке становить реальну загрозу для життя пацієнта. До цього часу в хірургічній спільноті немає єдиної точки зору на причини розвитку кишкових нориць, лікувальної тактики при розвитку цих ускладнень.

Частота виникнення кишкових нориць становить 1-2% від усіх абдомінальних операцій, але вони створюють багато проблем як із хірургічної точки зору, так і з точки зору лікування самого хворого [1]. В англійській літературі найчастіше трапляється проста та зручна класифікація, що базується на анатомічних, функціональних (дебіт у мл/добу) та етіологічних характеристиках кишкової нориці [2]. Популярною є класифікація, що базується на етіології нориці: тип I (стравохідний, гастродуоденальний), тип II (тонка кишка), тип III (товста кишка) та IV тип (зовнішня нориця незалежно від походження) [3].

Післяопераційні кишкові нориці становлять 75–85% усіх кишкових нориць. Післяопераційне ускладнення у вигляді нориці найчастіше розвивається після онкологічних операцій, операцій з приводу запальних захворювань кишок та гострої кишкової непрохідності [4].

Незважаючи на вдосконалення харчової та метаболічної підтримки, антимікробну терапію, поліпшення догляду за ранами та вдосконалення операційної техніки, рівень летальності при цьому ускладненні залишається вкрай високим [5].

З огляду на майже не досліджену роль генетичної схильності в розвитку післяопераційних ускладнень, а саме зовнішніх кишкових нориць, ми задалися метою вивчити поліморфізм гена, що кодує тканинний інгібі-

тор матриксних металопротеїназ 2-го типу (TIMP-2) у даної групи хворих. Обрання саме цього гена не було випадковим — ми керувалися основними відомими патофізіологічними механізмами, які беруть участь у процесах загоєння кишки після ятрогенних пошкоджень, формуванні нориць при запальних захворюваннях кишок [6].

Основними регуляторами матриксних металопротеїназ (MMP) є тканинні інгібітори металопротеїназ (TIMP). Усі чотири групи TIMP здатні пригнічувати протеоліз латентних форм та інгібувати активні форми MMP, але TIMP-1 активніший щодо MMP-9, а TIMP-2 виявляє специфічність стосовно MMP-2 [7].

Під час аналізу літератури нами знайдені публікації про зв'язок алейного поліморфізму гена теплового шоку HSP70-2 та розвитку зовнішніх кишкових нориць [8].

Проте публікацій про дослідження генетичного поліморфізму регуляторів матриксних металопротеїназ в аспекті розвитку зовнішніх кишкових нориць ми не знайшли.

Мета дослідження — провести аналіз частоти поліморфних варіантів гена TIMP-2 (G303→A) у пацієнтів із зовнішніми кишковими норицями.

Матеріал і методи. Об'єктом дослідження були 19 осіб із зовнішніми кишковими норицями, що лікувались у ДУ «НІХТ імені О.О. Шалімова». Для оцінки поліморфізму генів в українській популяції обстежено 80 практично здорових людей, які зіставні за віком і статтю з досліджуваними.

Генетичні дослідження проводили в лабораторії відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Забір букального епітелію проводився з використанням букальних щіток з подальшим заморожуванням зразків та їх зберіганням при температурі -20°C . ДНК для генотипування екстрагували із зразків з використанням наборів Diatom™ Prep 200 («Лаборатория Изоген», РФ) відповідно до протоколу виробника.

Методом ПЛР у реальному часі досліджували такі поліморфізми: C-1306 → T (MMP2), rs243865 та G303 → A (TIMP2), rs9900972. Реакції ампліфікації проводили з використанням Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, США) у кінцевій реакції об'ємом 20 мкл, який містив 2X TaqMan Універсальний Master Mix (Applied Biosystems, США), assay C_1792560_10 і матричну ДНК. Ампліфікація фрагментів генів складалася зі стадії денатурації при 95°C протягом 20 с, а потім 40 циклів ампліфікації при 95°C протягом 3 с і 60°C протягом 30 с. Аналіз даних проводився з 7500 Fast Real-Time PCR Software (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Основну частину статистичного аналізу проведено з використанням програми «Statistica 7.0» (SPSS) та Excel 2000. Номінальні дані подано у вигляді кількісних та відсоткових значень. Достовірність відмінностей середніх величин у групах із різними генотипами визначали за допомогою методики однофакторного статистичного аналізу (URL: <http://www.dgmp.kyiv.ua/index.php/snipka>). Відповідність розподілу генотипів перевіряли за допомогою тесту Харді – Вайнберга. Для порівняння розподілу генотипів у дослідній та контрольній групах застосовували χ^2 -критерій Пірсона.

Результати дослідження та їх обговорення

У досліджуваній групі пацієнтів із зовнішніми кишковими норицями, переважну більшість склали хворі після ургентних операцій з приводу гострої кишкової непрохідності, поширеного перитоніту, деструктивного панкреатиту, гострого деструктивного апендициту. У 42,2% (8 з 19) випадків причиною розвитку нориць була неспроможність швів анастомозів (6), механічне пошкодження стінки під час вісцеролізу (2). У двох випадках нориці виникли у пацієнтів з гігантськими рецидивними вентральними грижами (защемлення кишки в грижовому мішку - 1, фіксація кишки до сітчастого трансплантата - 1, дві товстокишкові нориці у пацієнтів з деструктивним панкреатитом (пролежень від дренажу - 1, парапанкреатичний абсцес - 1); по-

шкодження ДПК під час правобічної нефректомії - 1, перфорація дивертикула товстої кишки - 2, перфорація сліпої та висхідної ободової кишок внаслідок абсцесів очеревинної порожнини. У решті випадків (2) переконливих причин не виявлено.

Критерієм виключення з досліджуваної групи були нориці в пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом, хворобою Крона та кишкові нориці, що виникли на фоні променевої терапії.

З метою виявлення можливої асоціації поліморфних варіантів гена TIMP2 (G303 → A) із ризиком розвитку зовнішніх кишкових нориць був проведений однофакторний статистичний аналіз частоти генотипів у досліджуваних групах пацієнтів (табл. 1).

При аналізі алейного поліморфізму промотору гена TIMP-2 (G303 → A), у групах контролю (n=80) та дослідної групи із зовнішніми кишковими норицями (n=19) відмінності частоти розподілу генотипів були на межі статистичної значущості: $p=0,057$. Відповідність розподілу генотипів до закону Харді-Вайнберга у дослідній групі була перевірена з допомогою тесту χ^2 із 1-м ступенем свободи, без використання корекції Йетса. Проаналізувавши усі моделі успадкування, ми вибрали найкращу модель із найнижчим інформаційним критерієм Айккайке (табл. 2).

В обстеженій популяції у групі контролю та в дослідній групі пацієнтів із зовнішніми кишковими норицями розподіл носіїв генотипів суттєво відрізнявся.

Таблиця 1

Розподіл поліморфних варіантів генів MMP-2 (C-1306 → T), rs243865 та TIMP-2 (G303 → A), rs9900972 у досліджуваних групах

Досліджуваний ген	Контрольна група, n=80 (%)	Дослідна група, n=19 (%)
TIMP-2 (G303 → A),	GG	15 (78,9%)
	GA	4 (21,1%)
	AA	0 (%)
Тест Харді-Вайнберга (χ^2 , p)	$\chi^2=0,18$, $p>0,05$	$\chi^2=0,26$, $p>0,05$
Тест χ^2 , (χ^2 , p)	-	$\chi^2=5,73$, $p=0,057$

Таблиця 2

Відношення шансів для рецесивної моделі успадкування у пацієнтів із зовнішніми кишковими норицями. Відношення шансів з 95% довірчим інтервалом

Генотип	Контрольна група, n=80 (%)	Дослідна група 2 (з зовнішніми кишковими норицями), n=19 (%)	Відношення шансів	p-value	AIC
GG+GA	72 (90%)	19 (100%)	1.00		
AA	8 (10%)	0 (0%)	0 (NA - 1.96545419474352e+266)	1	15.07

Оригінальні дослідження

Так, домінуючий гомозиготний GG варіант в 1,58 раза перевищував показники контролю ($p=0,057$). Гетерозиготний GA генотип у дослідній групі траплявся удвічі рідше, ніж у контролі (21,1% проти 40%, $p=0,057$). Носіїв гомозиготного AA генотипу в групі з кишковими норицями не виявлено, тоді як аналогічний варіант у контрольній групі траплявся в 10% (рис.).

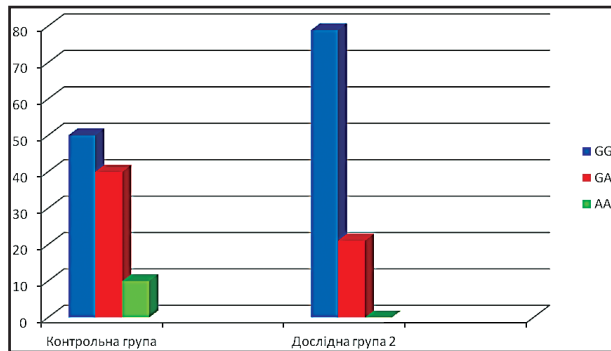


Рис. Розподіл частоти алельного поліморфізму (%) промотору (G303→A) гена TIMP-2

Отримані нами дані дослідження поліморфних варіантів гена TIMP2 (G303→A) в українській популяції ($n=80$) у цілому відповідають популяційним частотам у європейській популяції та США [9].

Найближчими за частотою генотипних варіацій досліджуваних генів були популяції Австрії [10], Нідерландів [11]. При цьому, ми встановили суттєві відмінності при порівнянні з популяціями африканської та азійської раси [12].

У результаті генетичного та статистичного аналізу поліморфізму гена TIMP-2 (G303→A) були визначені варіанти генотипів, які асоційовані з ризиком розвитку зовнішніх кишкових нориць.

Виявлені відмінності частоти розподілу генотипів гена TIMP-2 (G303→A), у групах контролю та дослідної групи із зовнішніми кишковими норицями були на межі статистичної значущості: $p=0,057$.

Враховуючи роль матриксних металопротеїназ та їх інгібіторів у процесах синтезу та протеолізу, ремодельованні екстрацелюлярного матриксу, обміні білків сполучної тканини, здатність впливати на проникність судинної стінки та ангиогенез, актуальність їх вивчення у контексті патогенезу, виникнення зовнішніх кишкових нориць є безсумнівною.

На наш погляд, фокус майбутніх досліджень патогенетичних факторів абдомінальних післяопераційних ускладнень повинен зміститися на більш клітинний та молекулярний рівень. Таким чином, краще розуміння механізмів розвитку кишкових нориць буде сприяти напрацюванню нових діагностичних, прогностичних та лікувальних методик.

Висновки

1. Зовнішні кишкові нориці в 1,58 раза частіше трапляються в носіїв гомозиготного GG генотипу гена TIMP-2 (G303→A) та удвічі рідше у гетерозигот GA (21,1% проти 40%, $p=0,057$). Носіїв мінорного гомози-

готного AA генотипу у групі з кишковими норицями не було виявлено, тоді як аналогічний варіант у контрольній групі траплявся у 10% випадків.

2. Молекулярно-генетичні дослідження можуть бути новим перспективним напрямом для напрацювання сучасних персоналізованих діагностичних критеріїв та моделей прогнозування розвитку та перебігу післяопераційних абдомінальних ускладнень, зокрема зовнішніх кишкових нориць.

Перспективи подальших досліджень. Виявлені нами особливості алельних варіантів гена TIMP-2 (G303→A) у групах пацієнтів із зовнішніми кишковими норицями є підставою для подальшого вивчення та пошуку молекулярно-генетичних маркерів, що кодують основні ланки патогенезу абдомінальних післяопераційних ускладнень.

Список літератури

- Schechter WP, Hirshberg A, Chang DS, Harris HW, Napolitano LM, Wexner SD, et al. Enteric fistulas: principles of management. *J Am Coll Surg.* 2009;209(4):484-91. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2009.05.025.
- Teixeira PGR, Inaba K, Dubose J, Salim A, Brown C, Rhee P, et al. Enterocutaneous fistula complicating trauma laparotomy: a major resource burden. *Am Surg.* 2009;75(1):30-2. DOI: 10.1177/000313480907500106.
- Schein M, Decker GA. Postoperative external alimentary tract fistulas. *Am J Surg.* 1991;161(4):435-8. DOI: 10.1016/0002-9610(91)91107-t.
- Holzheimer RG, Mannick JA, editors. *Surgical treatment—evidence-based and problem-oriented.* München: W. Zuckschwerdt Verlag Munchen; 2001. 843 p.
- Whelan JF, Ivatury RR. Enterocutaneous fistulas: an overview. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2011;37(3):251-58. DOI: 10.1007/s00068-011-0097-2.
- van Haaften WT, Mortensen JH, Karsdal MA, Bay-Jensen AC, Dijkstra G, Olinga P. Misbalance in type III collagen formation/degradation as a novel serological biomarker for penetrating (Montreal B3) Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017 Jul;46(1):26-39. DOI: 10.1111/apt.14092.
- Fassina G, Ferrari N, Brigati C, Benelli R, Santi L, Noonan DM, et al. Tissue inhibitors of metalloproteases: Regulation and biological activities. *Clin Experim Metastas.* 2000;18:111-20.
- Chen J, Ren JA, Han G, Gu GS, Wang GF, Wu XW, et al. Polymorphism of heat shock protein 70-2 and enterocutaneous fistula in Chinese population. *World J Gastroenterol.* 2014;20(35):12559-65. DOI: 10.3748/wjg.v20.i35.12559.
- Population Diversity (Alleles in RefSNP orientation) [Internet]. [Cited, 2020]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs243865>.
- Mossbock G, Weger M, Faschinger Ch, Zimmermann Ch, Schmut O. Role of functional single nucleotide polymorphisms of MMP1, MMP2, and MMP9 in open angle glaucomas. *Mol Vis.* 2010;16:1764-70.
- van Diemen CC, Postma DS, Siedlinski M, Blokstra A, Smit HA, Boezen HM. Genetic variation in TIMP1 but not MMPs predict excess FEV1 decline in two general population-based cohorts. *Respir Res.* 2011;12(1):57.
- Xu E, Lai M, Lv B, Xing X, Huang Q, Xia X. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter is associated with colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324(3):999-1003. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.09.150.

Відомості про авторів

Войтів Я. Ю. – канд.мед.наук, доц., хірург відділу торакоабдомінальної хірургії ДУ «НИХТ ім. О.О. Шалімова» НАМН України, м. Київ, Україна.

Усенко О. Ю. – д-р.мед.наук, проф., чл.-кор. НАМН України, директор ДУ «НИХТ ім. О.О. Шалімова» НАМН України, м. Київ, Україна.

Сведения об авторах

Войтів Я. Ю. – канд.мед.наук, доц., отдел торакоабдоминальной хирургии ГУ «НИХТ им. А.А. Шалимова» АМН Украины, г. Киев, Украина.

Усенко О. Ю. – д-р.мед.наук, проф, чл.-корр. НАМН Украины, директор ГУ «НИХТ им. А.А. Шалимова » НАМН Украины, г. Киев, Украина.

Information about the authors

Voitiv Y.Yu. – MD, PhD (Med), Associate Professor, Surgeon of the Department of Thoracoabdominal Surgery, Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology, Kyiv, Ukraine.

Usenko O.Yu., – MD, PhD, Professor, Director of the Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology, Kyiv, Ukraine.

Надійшла до редакції 18.11.2020
Рецензент — проф. Польовий В.П.
© Я.Ю. Войтів, О.Ю. Усенко, 2020
