

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА УРОКИНАЗЫ С РАЗВИТИЕМ УРОЛИТИАЗА В УЗБЕКИСТАНЕ

А.М. ШАМСИЕВ, Ш.А. ЮСУПОВ, Б.Ш. АДЫЛОВ, Д.А. ДАЛИМОВА,
Ш.У. ТУРДИКУЛОВА, Д.С. ИСЛАМОВА, Л.Р. ХАКИМОВА

Институт биоорганической химии Академии Наук Республики Узбекистан,
Самаркандский Государственный медицинский институт,

Самаркандский филиал детской хирургии Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра педиатрии

Резюме. Полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют о том, что генетические варианты полиморфизма гена Урокиназы маркируемого как 3'-UTR T/C вносят вклад в детерминацию нарушений способствующих развитию МКБ. В частности у жителей Республики Узбекистан генетическими маркерами предрасположенности к МКБ генотипы T/T и C/T. С помощью данных маркеров можно проводить выявление групп риска развития МКБ. Преимущество молекулярно-генетического способа прогнозирования МКБ с использованием генетических маркеров заключается в том, что предрасположенность к данному заболеванию может быть установлена при отсутствии каких-либо клинических или биохимических проявлений, т. е. на самом раннем доклиническом этапе развития патологии, что будет способствовать проведению целенаправленных профилактических мероприятий и повысить качество жизни данных пациентов. Выявлена связь между наличием генотипов T/T и C/T гена Урокиназы и мочекаменной болезнью, считаем целесообразным включить определения гена Урокиназы в комплексную программу профилактики МКБ в Узбекистане.

Ключевые слова: полиморфизм гена, урокиназа, уролитиаз.

RESEARCH OF ASSOCIATION OF POLYMORPHISM OF GENA UROKINAZA WITH UROLITHIASIS DEVELOPMENT IN UZBEKISTAN

A.M. SHAMSIYEV, SH.A. YUSUPOV, B.SH. ADILOV, D.A. DALIMOVA,
SH.U. TURDIKULOVA, D.S. ISLAMOVA, L.R. HAKIMOVA

Institute of Bioorganic chemistry Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Samarkand State Medical Institute,

Samarkand branch of pediatric surgery of the Republican Specialized Scientific and Practical medical Center of pediatrics

Resume. The obtained results in this study suggest that genetic variants of the gene polymorphism to be marked as urokinase 3'-UTR T / C contribute to a determination of the development of the ICD spsobstvuyuschix disorders. In particular, the residents of the Republic of Uzbekistan genetic markers of predisposition to ICD genotypes T / T and P / T. With Policy markers can be carried out identifying risk groups of the ICD. The advantage of molecular-genetic method for predicting the ICD using genetic markers is that a predisposition to the disease may be established in the absence of any clinical or biochemical manifestations, t. E. At a very early preclinical stage of pathology, which will contribute to a focused preventive measures and improve the quality of life of these patients. Found an association between the presence of genotype T / T and C / T gene of urokinase and urolithiasis, consider it appropriate to include the definition of a gene of urokinase in a comprehensive program of prevention ICD in Uzbekistan.

Key words: polymorphism of gena, urokinaza with urolithiasis.

Введение. Лечение большинства состояний, при которых образуются камни в мочевыводящих органах в настоящее время основано преимущественно на симптомах, а не на причинах. Полное понимание молекулярных причин этих состояний, включая идентификацию мутантных генов и их генные продукты должно привести к более рациональным протоколам лечения.

Проблемы профилактики и метафилактики (профилактики рецидива) мочекаменной болезни (МКБ) являются крайне актуальными. Лечение большинства состояний, при которых образуются камни в мочевыводящих органах в настоящее время основано преимущественно на симптомах, а не на причинах. Полное понимание молекулярных причин этих состояний, включая

идентификацию полиморфизмов и мутаций генов ассоциированных с МКБ а также рецидивами МКБ должно привести к эффективной профилактике а также к более рациональным протоколам лечения МКБ. Результаты исследования и данные литературы показали, что на возникновение свойственных уролитиазу обменных нарушений существенное влияние оказывает наследственная предрасположенность в сочетании со средовыми факторами.

Реализация наследственной предрасположенности к уролитиазу связана с генетически обусловленными структурными и функциональными особенностями обмена, нейрогуморальной регуляции, местными факторами. В своих эпидемиологических или клинических исследованиях зарубежные ученые отмечают участие генетических факторов в возникновении уролитиаза [1-3], что позволяет предположить существование конкретных генов, ответственных за возникновение МКБ. Одним из генов кандидатов МКБ является ген Урокиназы.

Ген Урокиназы кодирует Урокиназный активатор плазминогена (УАП,) являющийся сериновой протеиназой. Ген Урокиназы расположен на длинном плече 10 хромосомы [4] в локусе q22.2 и состоит из 11 экзонов и 10 интронов (рис. 1).

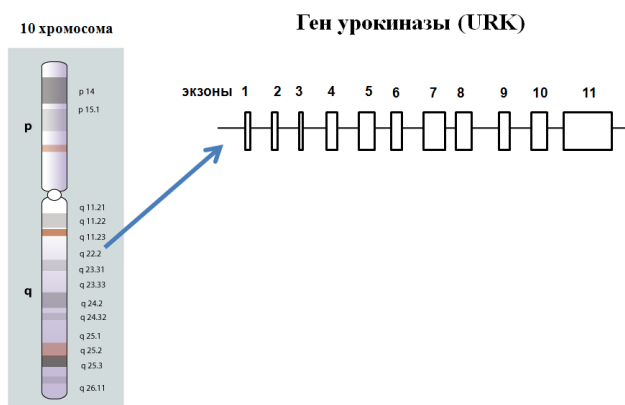


Рис. 1 Хромосомная локализация и структура гена Урокиназы.

Урокиназа, синтезируется в клетках почек и других органах, которая расщепляет плазминоген в плазмин и стимулирует фибринолиз и было высказано предположение о ее важной роли в качестве важного фактора в формировании мочевых камней [5].

Несмотря на множество популяционных молекулярно-генетических исследований все еще недостаточно изучены молекулярно-генетические маркеры МКБ. Следует также отметить, что полиморфизмы некоторых генов в сочетании с обменными нарушениями неодинаково проявляют себя в различных

популяциях в зависимости от пола, возраста, этнической принадлежности их носителей. Это указывает на необходимость с осторожностью переносить результаты, полученные на одной этнической группе, на другие популяции.

Целью нашего исследования являлось изучение ассоциации полиморфизма гена Урокиназы с развитием МКБ в Узбекской популяции.

Материалы и методы: В исследование были включены 100 больных с верифицированным диагнозом МКБ, которые находились на стационарном лечении в Самаркандском филиале детской хирургии Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра педиатрии.

Контрольная группа была сформирована методом случайной выборки и состояла из 94 практически здоровых индивидов соответствующих группе больных по возрасту, полу и национальной принадлежности.

Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови по стандартному протоколу с использованием набора реагентов Diatom™ DNA Prep 200 (производство ООО «Лаборатория ИзоГен»). Принцип действия данного набора основан на использовании лизирующего агента с гуанидинтиоцианатом, который предназначен для разрушения клеток, солюбилизации клеточного дебриса, а также денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии лизирующего реагента ДНК сорбировали на сорбенте NucleoS™, затем отмывали от солей и белков спиртовым раствором. ДНК, элюированная из сорбента Экстра-Геном™ напрямую использовалась для дальнейшего анализа. Генотипирование полиморфизма гена Урокиназы проводилось методом PCR-RFLP. Геномную ДНК пациентов далее подвергали генотипированию с использованием метода PCR-RFLP. ПЦР проводили с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров (F-CCGCAGTCACACCAAGGAAGAG и R-GCCTGAGGGTAAAGCTATTGTCGTGC) и набора реагентов для ПЦР амплификации ДНК GenePak™ PCR Core (производство ООО «Лаборатория ИзоГен»). Использовались готовые для амплификации пробирки Master Mix, которые содержат в лиофилизированном состоянии ингибированную «для горячего старта» Taq ДНК полимеразу, дезоксинуклеозотрифосфаты и хлорид магния с конечными концентрациями, соответственно, 1 и, 200 мкМ и 2,5 mM, а также оптимизированную буферную систему для проведения ПЦР амплификации. В пробирки

Master Mix добавляли по 5 мкл смеси праймеров, с конечной концентрацией 0.5 мкМ, 10 мкл ПЦР diluent и по 5 мкл исследуемой ДНК. Для проведения ПЦР использовали GeneAmp® ПЦР систему 9700 с 96-ячеечным блоком (Applied Biosystems).

Температурно-временной режим амплификации для гена Урокиназы был следующим: 5 мин предварительной денатурации при 95 °С, затем 40 циклов: 95 °С – 30 с, 56 °С – 30 с, 72 °С – 30 с ; и заключительную элонгацию при 72 °С в течение 7 мин. После проведения ПЦР-амплификации фрагмента гена Урокиназы, полученные ПЦР продукты подвергали ПДРФ анализу с использованием эндонуклеазы Vne I (производство НПО “Сибэнзим”). Реакционная смесь для рестрикционного анализа фрагмента гена Урокиназы содержала 3,5 мкл ddH₂O, 1,5 мкл SE буфера, 4 мкл Vne I рестриктазы и 6мкл ПЦР продукта. Затем рестрикционную смесь инкубировали в термостате в течении 16 часов при 37°С. Интерпретацию результатов генотипирования проводили на основании дифференциальной картины бэндов на электрофореграмме (рис. 2).

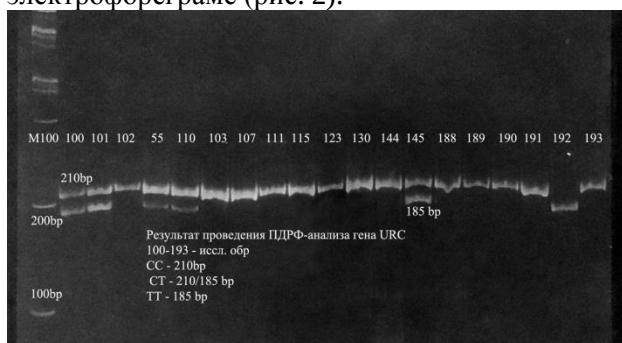


Рис. 2. ПДРФ-анализ 3'-UTR T/C полиморфизма гена Урокиназы.

Результаты и обсуждение.

Распределение частот генотипов гена Урокиназы в контрольной группе соответствовало распределению Харди-Вайнберга. При анализе распределения вариантных генотипов полиморфизма 3'-UTR T/C гена Урокиназы было установлено статистически значимое ($p=0.03$ по

общей модели наследования, $p=0.01$ по доминантной модели наследования) увеличение частоты встречаемости монозигот T/T и гетерозигот C/T у больных по сравнению с соответствующими показателями в группе контроля (рис. 3 и табл. 1).

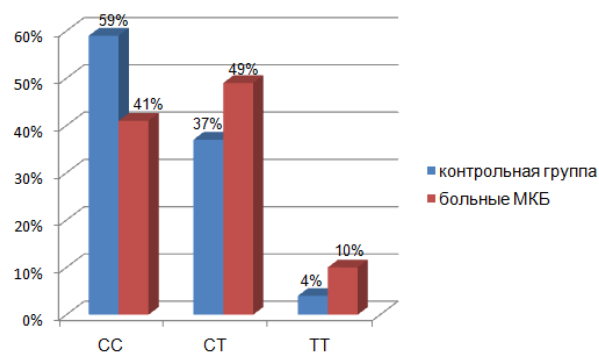


Рис. 3. Распределение частот генотипов полиморфизма гена Урокиназы в контрольной группе и у больных МКБ.

Таким образом, полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют о том, что генетические варианты полиморфизма гена Урокиназы маркируемого как 3'-UTR T/C вносят вклад в детерминацию нарушений способствующих развитию МКБ. В частности у жителей Республики Узбекистан генетическими маркерами предрасположенности к МКБ генотипы T/T и C/T. С помощью данных маркеров можно проводить выявление групп риска развития МКБ. Преимущество молекулярно-генетического способа прогнозирования МКБ с использованием генетических маркеров заключается в том, что предрасположенность к данному заболеванию может быть установлена при отсутствии каких-либо клинических или биохимических проявлений, т.е. на самом раннем доклиническом этапе развития патологии, что будет способствовать проведению целенаправленных профилактических мероприятий и повысить качество жизни данных пациентов.

Таблица 1

Результаты статистического анализа генетической ассоциации генотипов гена Урокиназы с МКБ

модель наследования	Генотипы	Случаи	Контроли	χ^2	p	OR	
		n = 100	n = 94			знач.	95% CI
Общая модель наследования (тест хи-квадрат, df = 2)	C/C	41%	59%	6.77	0.03	0.49	0.28-0.87
	C/T	49%	37%			1.62	0.91 -2.87
	T/T	10%	4%			2.50	0.76-8.27
Доминантная модель наследования (тест хи-квадрат, df = 1)	C/C	41%	59%	5.94	0.01	0.49	0.28-0.87
	C/T+T/T	59%	41%			2.03	1.15-3.60

Таким образом, выявлена связь между наличием генотипов Т/Т и С/Т гена Урокиназы и мочекаменной болезнью в Узбекской популяции, считаем целесообразным включить определения гена Урокиназы в комплексную программу профилактики МКБ в Узбекистане.

Литература:

1. Curhan, G. C., Willett, W. C., Rimm, E. B. & Stampfer, M. J. Family history and risk of kidney stones. J. Am. Soc. Nephrol. 8, 1568–1573 (1997).
2. Goldfarb, D. S., Fischer, M. E., Keich, Y. & Goldberg, J. A twin study of genetic and dietary influences on nephrolithiasis: a report from the Vietnam Era Twin (VET) Registry. Kidney Int. 67, 1053–1061 (2005).
3. Monga, M., Macias, B., Groppo, E. & Hargens, A. Genetic heritability of urinary stone risk in identical twins. J. Urol. 175, 2125–2128 (2006).
4. P Tripputi, F Blasi, P Verde, L A Cannizzaro, B S Emanuel, and C M Croce. Human urokinase gene is located on the long arm of chromosome 10. Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 1985; 82(13): 4448–4452.
5. du Toit PJ, Van Aswegen CH, Steinmann CM, et al. Does urokinase play a role in renal stone formation? Med.

ЎЗБЕКИСТОНДА УРОЛИТИАЗ РИВОЖЛАНИШИ БИЛАН УРОКИНАЗА ГЕНИНИНГ ПОЛИМОРФИЗМ АССОЦИАЦИЯСИНИ ТЕКШИРИШ

А.М. ШАМСИЕВ, Ш.А. ЮСУПОВ,
Б.Ш. АДЫЛОВ, Д.А. ДАЛИМОВА,
Ш.У. ТУРДИКУЛОВА, Д.С. ИСЛАМОВА,
Л.Р. ХАКИМОВА

Ўзбекистон Республикаси Фанлар
Академиясининг биоорганик химия институти,
Самарқанд Давлат тиббиёт институти,
Республика ихтисослаштирилган педиатрия
илмий – амалий тиббиёт маркази болалар
хирургияси Самарқанд филиали

Резюме. Ушбу текширишлардан олинган маълумотларга кўра, 3'-UTR Т/С маркердаги Урокиназа генининг полиморфизм генетик турлари сийдик тош касаллиги (СТК) ривожланишида детерминация бузилишига кўмакчи булади, холбуки Ўзбекистон Республикаси аҳолисида СТК мойиллигига Т/Т ва С/Т генотиплар генетик маркерлар хисобланади. Маркерлар ёрдамида СТК ривожланиш хавф гуруҳларини аниқлаш мумкин. Генетик маркерларни қўллаш билан СТК келиб чиқиши хавфи молекуляр-генетик усул ёрдамида олдиндан билишнинг афзаллиги шундаки, ушбу касалликка мойиллик борлигини клиник ёки биохимик белгилар намоён бўлишдан олдин, яъни касаллик ривожланишининг энг эрта босқичида аниқлаш мумкин. Бу эса профилактик чораларни мақсадга мувофиқ равишда олиб бориш ва ушбу тоифадаги беморлар ҳаёт тарзини яхшилашга имконият беради. Урокиназа генининг Т/Т ва С/Т генотиплари ҳамда СТК уртасида боғлиқлик аниқланди. Ўзбекистонда СТК олдини олиш комплекс дастурига Урокиназа генини аниқлашни киритиш мақсадга мувофиқ деб ҳисоблаймиз.

Калит сўзлар: ген полиморфизми, урокиназа, уролитиаз.