

ВПЛИВ ДИСТРИБУЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА DIO1 НА ПОКАЗНИКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ ДИФУЗНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ПЕЧІНКИ

Буковинський державний медичний університет (м. Чернівці)

Дана стаття є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри внутрішньої медицини «Генетичні, метаболічні аспекти, запалення, дисфункція ендотелію та лікування при поєднаній патології внутрішніх органів», № державної реєстрації 0112U003546.

Вступ. Генетичний поліморфізм є основою фенотипової різниці особистостей і, зокрема, може зумовлювати спадкову схильність до різних захворювань [5,9]. При вивченні цього питання особлива увага приділяється генам, що кодують чинники, які залучені до виникнення різної патології [4,6].

Велике значення останнім часом приділяється поліморфізмам генів селеновмісних протеїнів, з якими пов'язують схильність до розвитку патологічних станів внаслідок порушення активності тих чи інших ферментних систем [6,9].

Важливе значення як у забезпеченні нормально-го функціонування щитоподібної залози мають селеновмісні ензими, у першу чергу дейодинази [7,8]. Загальновідомо, що позатиреоїдне монодейодування тироксину служить основним джерелом трийодтироніну в організмі і каталізується тироксин-5'-дейодиназою. Цей процес забезпечує майже 80% утворення біологічно більш активного (у 8 разів порівняно з тироксином) трийодтироніну, що утворюється за добу [1,2].

Мета дослідження. Дослідити особливості показників тиреоїдного гомеостазу у хворих на хронічні дифузні захворювання печінки (ХДЗП) залежно від А/С поліморфізму гена DIO1.

Об'єкт і методи дослідження. Обстежено 50 хворих на ХДЗП (хронічні гепатити та цирози печінки) віком від 34 до 72 років. Хворі на хронічний гепатит та цироз вірусної етіології, хворобу Вільсона-Коновалова, природжену недостатність α_1 -антитрипсину (α_1 -інгібітора протеїнази), ідіопатичний (генетичний) гемохроматоз, автоімунний гепатит у дослідження не включалися.

Діагноз ХДЗП встановлювали на підставі анамнезу, загальноприйнятого комплексу клінічно-лабораторних та інструментальних методів дослідження, УЗД органів черевної порожнини. Хворі на хронічний гепатит та цироз вірусної етіології, хворобу Вільсона-Коновалова,

природжену недостатність α_1 -антитрипсину (α_1 -інгібітора протеїнази), ідіопатичний (генетичний) гемохроматоз, автоімунний гепатит у дослідження не включалися.

Алелі поліморфних ділянок А/С у гені DIO1 вивчали шляхом виділення геномної ДНК з лейкоцитів периферійної крові із наступною ампліфікацією поліморфної ділянки за допомогою полімеразної ланцюгової реакції на програмованому ампліфікаторі «Amplify-4L» («Biosom», Москва) з індивідуальною температурною програмою для праймерів гену.

Послідовність олігонуклеотидів у праймерах та їх розрахункові позиції на хромосомах наведені у **таблиці 1**.

Екстракцію ДНК проводили за допомогою реактивів «ДНК – сорб – В» варіант 100 (ФГУН ЦНИИЭ, Росія) згідно інструкції. Очищену ДНК зберігали при температурі мінус $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Проби для ПЛР готували за допомогою набору «АмплиСенс – 200 – 1» (ФГУН ЦНИИЭ, Росія).

Для дискримінації алелей гену DIO1 використовували ендонуклеазу рестрикції Bcl I, фірми «СибЭнзим» (Росія).

Залежно від дистрибуції А/С поліморфізму гену DIO1 пацієнтів поділено на три групи: носії АА-генотипу – 17 пацієнтів, АС-генотипу – 24 обстежених та АС-генотипу – 9 хворих.

Особливості тиреоїдного гомеостазу вивчали за визначенням вмісту в сироватці крові вільного тироксину (вТ_4), вільного трийодтироніну (вТ_3) та тиреотропного гормону (ТТГ) із використанням реактивів «ИммуноФА-ТТГ», «ИФА-СвТ₃» та «ИФА-СвТ₄-1» (ЗАО «НВО ИммуноТех»), а також обчисленням коефіцієнта периферійної конверсії вільних тиреоїдних гормонів ($\text{вТ}_3/\text{вТ}_4$).

Таблиця 1

Послідовність олігонуклеотидів у праймерах, використаних для полімеразної ланцюгової реакції при ідентифікації поліморфізму А/С гену DIO1

Назва гену	Локалізація гену на хромосомі	Праймер	Послідовність олігонуклеотидів у праймерах
DIO1	1 p33-p32	Прямий	5'-GAACTTGATGTGAAGGCTGGA-3'
		Зворотний	5'-TAACCTCAGCTGGGAGTTGTTT-3'

Для оцінки функціонального стану системи гіпофіз-щитоподібна залоза визначали коефіцієнти: вільний T_3 /вільний T_4 , вільний T_4 /вільний T_3 , ТТГ/вільний T_3 , ТТГ/вільний T_4 , тиреоїдний індекс (ТІ) [3]:

$$TI = \frac{\text{вільний } T_3 + \text{вільний } T_4}{TTG} \quad (1)$$

Також визначали сумарний тиреоїдний індекс (СТІ), який відображає периферійну активність тиреоїдних гормонів [3]:

$$CTI = \frac{\text{вільний } T_3}{2,38} \cdot 100 + \frac{\text{вільний } T_4}{90} \cdot 100 \quad (2)$$

Антитіла до тиреоглобуліну (АТ-ТГ) та тиреоїдної пероксидази (АТ-ТПО) визначали імуноферментним методом за допомогою наборів реагентів «ИФА-АТ-ТГ-1» та «ИммуноФА-АТ-ТПО» (ЗАО «НВО Иммунотех») на аналізаторі імуноферментних реакцій «Уніплан».

Отримані результати оброблені за допомогою програми Biostat із використанням парного критерію Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення. Характеристика показників тиреоїдного гомеостазу в хворих на ХДЗП залежно від поліморфізму А/С гена DIO1 наведена в **таблиці 2**.

Як видно з наведених даних, рівень ТТГ у сироватці крові хворих на ХДЗП не зазнавав вірогідних змін залежно від дистрибуції поліморфізму гена DIO1.

Вірогідно вищий рівень в T_3 встановлено в носіїв СС-генотипу на 46,6% ($p < 0,001$) та 31,6% ($p < 0,01$), ніж у пацієнтів із АА- та АС-генотипом відповідно.

Вміст у сироватці крові в T_4 у хворих із гомозиготним носійством А-алеля гена DIO1 на 31,3% ($p < 0,05$) вірогідно перевищував відповідний показник у пацієнтів із СС-генотипом.

Показник в T_3 /в T_4 також статистично значуще змінювався залежно від поліморфізму гена DIO1. У групі хворих із СС-генотипом він у 1,5 раза перевищував його значення ($p < 0,05$) у пацієнтів із АА-генотипом та у 1,3 ($p < 0,05$) раза – носіїв АС-генотипу. Залежно від поліморфізму гена DIO1 також змінювався показник в T_4 /в T_3 . Його значення у хворих із АА-генотипом перевищувало відповідний показник у гомозигот за С-алелем у 1,6 раза ($p < 0,05$) та АС-гетерозигот – у 1,2 раза ($p > 0,05$).

Аналогічні закономірності встановлені й щодо показника ТТГ/в T_3 .

Визначалося вірогідно вище у 2,0 і 1,3 раза відповідно значення показників ТІ та СТІ в групі хворих із СС-генотипом щодо групи носіїв АА-генотипу.

Дослідженням титру АТ-ТГ встановлено вірогідне зростання показника у хворих усіх груп порівняно із контрольним значенням: у хворих із СС – генотипом – на 19,0% ($P < 0,001$), АС – генотипом та АА – генотипом – відповідно на 22,1% та 18,4% ($P < 0,001$) без наявності вірогідної міжгрупової різниці (**табл. 2**).

За носійства АА-генотипу спостерігалось вірогідне зростання рівня АТ-ТПО у 2,9 раза ($P < 0,001$)

Таблиця 2

Показники тиреоїдного гомеостазу у хворих на хронічні дифузні захворювання печінки залежно від поліморфізму А/С гена DIO1 ($M \pm m$)

Показник	Контрольна група n=20	Генотипи гена DIO1, n=50		
		АА n=17	АС n=24	СС n=9
Тиреотропний гормон, мМО/л	1,78 ± 0,162	2,73 ± 0,177 $p_1 < 0,001$	2,57 ± 0,292 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	2,31 ± 0,102 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
Вільний T_4 , пмоль/л	15,88 ± 0,894	20,21 ± 1,389 $p_1 < 0,05$	19,26 ± 1,247 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	15,39 ± 1,546 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$
Вільний T_3 , пмоль/л	5,47 ± 0,326	4,46 ± 0,364 $p_1 < 0,05$	4,97 ± 0,280 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	6,54 ± 0,144 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,01$
Вільний T_3 /вільний T_4	0,37 ± 0,029	0,25 ± 0,021 $p_1 < 0,01$	0,29 ± 0,022 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	0,38 ± 0,027 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Вільний T_4 /вільний T_3	3,19 ± 0,337	5,14 ± 0,467 $p_1 < 0,05$	4,22 ± 0,365 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,001$	3,21 ± 0,101 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$
Тиреотропний гормон / вільний T_3	0,35 ± 0,04	0,72 ± 0,098 $p_1 < 0,001$	0,59 ± 0,083 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	0,42 ± 0,049 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$
Тиреотропний гормон / вільний T_4	0,12 ± 0,011	0,15 ± 0,022 $p_1 > 0,05$	0,14 ± 0,018 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	0,12 ± 0,021 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
Тиреоїдний індекс	13,78 ± 1,301	9,82 ± 0,954 $p_1 < 0,05$	13,21 ± 2,810 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	19,44 ± 2,233 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$
Сумарний тиреоїдний індекс	247,60 ± 13,61	209,8 ± 12,19 $p_1 < 0,05$	230,1 ± 11,59 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	262,7 ± 17,64 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$
Антитіла до тиреоглобуліну	26,29 ± 2,446	57,08 ± 6,184 $p_1 < 0,001$	53,01 ± 5,509 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	50,16 ± 6,186 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
Антитіла до тиреоїдної пероксидази, МО/мл	11,94 ± 1,067	35,17 ± 2,831 $p_1 < 0,001$	33,95 ± 4,586 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	29,64 ± 3,764 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$

Примітка: n- кількість спостережень; p_1 – вірогідність змін щодо контролю; p_2 – вірогідність змін щодо групи хворих із АА-генотипом; p_3 – вірогідність змін щодо групи хворих із АС-генотипом.

порівняно з показником контрольної групи, у АС-гетерозигот – 2,8 раза ($P < 0,001$) та у СС-гомозигот – у 2,5 раза ($P < 0,001$).

Таким чином, можна зробити висновок, що дис-трибуція поліморфізму гена DIO1 у хворих на ХДЗП впливає на тиреоїдний гомеостаз організму.

Отже, проведені дослідження вказують на зв'язок дистрибуції поліморфізму гена DIO1 та рівнем вільних тиреоїдних гормонів, а також коефіцієнтами їх співвідношення у хворих на ХДЗП. Гомозиготне носійство С-алеля асоціюється зі зростанням показника VT_3/VT_4 та рівня VT_3 , а також зниженням VT_4 , у той час як носійство АА-генотипу пов'язано зі зменшенням значення VT_3/VT_4 , рівня VT_3 та зростанням вмісту VT_4 .

Висновки.

1. Носійство АА-генотипу гена DIO1 у хворих на хронічні дифузні захворювання печінки асоціюється із зменшенням рівня вільного трийодтироніну в сироватці крові, показника відношення вільного трийодтироніну до вільного тироксину та зростанням вмісту вільного тироксину.

2. А/С поліморфізм гена DIO1 не впливає на титри антитіл до тканини щитоподібної залози у хворих на хронічні дифузні захворювання печінки.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати вказують на необхідність створення диференційованого підходу щодо діагностики та лікування порушень тиреоїдного гомеостазу за хронічних дифузних захворювань печінки залежно від експресії А/С поліморфізму гену DIO1.

Література

1. Макарь Р. Д. Функціональна автономія щитоподібної залози (патогенез, діагностика, лікування) / Р. Д. Макарь // Міжнародний ендокринологічний журнал. – 2007. – Т. 2, №8. – С. 27–34.
2. Олійник В. А. Хронічний лімфоцитарний тиреоїдит (тиреоїдит Хашимото): сучасний стан проблеми (огляд літератури і власні дані) / В. А. Олійник // Ендокринологія. – 2006. – Т. 11, №1. – С. 71–79.
3. Патология щитовидной железы у больных ревматоидным артритом / Б. Т. Турмухамбетова, А. С. Аметов, Л. К. Козлова [и др.] // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2009. – №3. – С. 63–68.
4. Поліморфізм гена гемахроматозу у хворих на хронічний гепатит С / Л. Мороз, В. Дудник, О. Турський [та ін.] // Сучасна гастроентерологія. – 2009. – №2. – С. 26–28.
5. Bastaki M. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans / M Bastaki, K Huen, P. Manzanillo [et al.] // Pharmacogenet Genomics. – 2006 – Vol. 16. – P. 279–286.
6. Chrissobolis S. Glutathione peroxidase-1 plays a major role in protecting against angiotensin II-induced vascular dysfunction / S. Chrissobolis, S. P. Didion, D. A. Kinzenbaw [et al.] // Hypertension. – 2008. – Vol. 51. – P. 872–877.
7. Panicker V. A Common Variation in Deiodinase 1 Gene DIO1 Is Associated with the Relative Levels of Free Thyroxine and Triiodothyronine / V. Panicker, C. Cluett, B. Shields [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2008. – Vol. 93, №8. – P. 3075–3081.
8. Panicker V. Heritability of serum TSH, free T4 and free T3 concentrations: a study of a large UK twin cohort / V. Panicker, S. G. Wilson, T. D. Spector [et al.] // Clin. Endocrinol. (Oxf). – 2008. – Vol. 68. – P. 652–659.
9. Wagner Andreas H. Upregulation of Glutathione Peroxidase Offsets Stretch-Induced Proatherogenic Gene Expression in Human Endothelial Cells Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology / H. Wagner Andreas, O. Kautz, K. Fricke [et al.] // ATVBANA. – 2009 – Vol. 21. – P. 316–325.

УДК 616. 33/. 36:616. 72-007. 24]-085-092

ВПЛИВ ДИСТРИБУЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА DIO1 НА ПОКАЗНИКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ ДИФУЗНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ПЕЧІНКИ

Чимпой К. А., Федів О. І., Паліброда Н. М., Ступницька Г. Я., Павлюкович Н. Д.

Резюме. Вивчено особливості тиреоїдного гомеостазу у хворих на хронічні дифузні захворювання печінки залежно від А / С поліморфізму гена DIO1. Встановлено залежність показників тиреоїдного гомеостазу у хворих на хронічні дифузні захворювання печінки від дистрибуції А/С поліморфізму гена DIO1, а також відсутність зв'язку титру антитіл до тканини щитовидної залози з даним поліморфізмом.

Ключові слова: хронічні дифузні захворювання печінки, поліморфізм, тиреоїдний гомеостаз, антитіла до тканини щитовидної залози.

УДК 616. 33/. 36:616. 72-007. 24]-085-092

ВЛИЯНИЕ ДИСТРИБУЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА DIO1 НА ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ДИФфуЗНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПЕЧЕНИ

Чимпой К. А., Федив О. И., Палиброда Н. М., Ступницкая Г. Я., Павлюкович Н. Д.

Резюме. Изучены особенности тиреоидного гомеостаза у больных хроническими диффузными заболеваниями печени в зависимости от А/С полиморфизма гена DIO1. Установлено зависимость показателей тиреоидного гомеостаза у больных хроническими диффузными заболеваниями печени от дистрибуции А/С полиморфизма гена DIO1, а также отсутствие связи титра антител к ткани щитовидной железы с данным полиморфизмом.

Ключевые слова: хронические диффузные заболевания печени, полиморфизм, тиреоидный гомеостаз, антитела к ткани щитовидной железы.

UDC 616. 33/. 36:616. 72-007. 24]-085-092

Effect of Distribution DIO1 Gene Polymorphism in Figures Functional State of Thyroid Gland in Patients with Chronic Diffuse Liver Diseases

Chympoly K., Fediv O., Palibroda N., Stupnytska G., Pavlyukovich N.

Summary. *Introduction.* Deiodinase enzymes are essential control points of cellular thyroid activity. It was found that certain allelic variants of type I deiodinase (*DIO1*) gene may increase the likelihood of violations of thyroid gland functions. But it is not still clear how polymorphism of this gene affects the development of thyroid dysfunction in patients with chronic diffuse liver diseases (HDLD).

The aim of the research: to study the features of thyroid homeostasis in patients with HDLD depending on A/C *DIO1* gene polymorphism.

Material and methods. The study involved 50 patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis.

A/C *DIO1* gene polymorphism were studied by means of extraction of genomic DNA from peripheral blood leukocytes with subsequent amplification polymorphic sites by PCR with the programmable amplificator «Amply-4L» («Biocom», Moscow) with individual temperature program for each gene primers.

DNA extraction was carried out using reagents «DNA – sorbets – B» option 100 (Russia) according to instructions. Samples were prepared for PCR using a set of «АмплиСенс – 200 – 1» (Russia). For discrimination of alleles of the *DIO1* gene endonuclease restriction *Bcl I* was used («СибЭнзим», Russia).

Depending on the distribution of A / C *DIO1* gene polymorphism patients were divided into three groups: AA-genotype carriers (17 patients), AC-genotype carriers (24 patients) and AS-genotype carriers (9 patients).

Features of thyroid homeostasis were studied by determination of serum free thyroxine (T4), free triiodothyronine (T3) and thyroid stimulating hormone (TSH), calculating the coefficient of the peripheral conversion of free thyroid hormones (T3/T4), antibodies to thyroglobulin (TgAb) and antibodies to thyroid peroxidase (TPOAb).

The results and discussion. The level of TSH in serum of patients with HDLD was not significantly changed depending on the *DIO1* gene polymorphism.

Probably higher level of T3 was found in carriers of the CC-genotype: in 46.6 % ($P < 0.001$) comparing with AA-genotype and 31.6 % ($P < 0.01$) comparing with AC-genotype.

Content of serum T4 in patients with homozygous A-allele carrier *DIO1* gene significantly exceeded the corresponding parameters in patients with CC-genotype (31.3 %, $P < 0.05$).

T3/T4 coefficient was also significantly changed depending on the *DIO1* gene polymorphism. In the group of patients with CC-genotype it was 1.5 times higher ($P < 0.05$) than in patients with AA-genotype and 1.3 ($P < 0.05$) times than in patients with AC-genotype.

The study of the titre TgAb determined probable growth rate in all groups of patients in reference with control values: for patients with CC – genotype – by 19.0 % ($P < 0.001$), for AC – genotype and AA – genotype – by 22,1 % and 18.4 % ($P < 0.001$) respectively, without any probable inter-group differences. For AA-genotype carriers probable growth of TPOAb level in 2.9 times ($P < 0.001$) was observed in comparison with the control group's rate, for AC-heterozygotes in 2.8 times ($P < 0.001$) and CC-homozygotes in 2.5 times ($P < 0.001$).

Conclusion. Carriage of the C-allele of *DIO1* gene is associated with increasing of *DIO1* function, which shows growth of T3/T4 coefficient and T3 level, reduction of T4 level. A-allele of the *DIO1* gene is associated with a decrease in T3/T4 coefficient, T3 level, an increase in T4 level in blood of patients with HDLD.

A/C polymorphism of the *DIO1* gene does not affect the antibodies' titers of the thyroid tissue of patients with chronic diffuse liver disease.

Perspectives for further research. The obtained results indicate the need for creation of a differentiated approach concerning the diagnosis and treatment of thyroid homeostasis during chronic diffuse liver diseases depending on the expression of A / C polymorphism of the *DIO1* gene.

Key words: chronic diffuse liver diseases, polymorphism, thyroid homeostasis, antibodies to tissue of a thyroid gland.

Рецензент – проф. Рибаків С. Й.

Стаття надійшла 16.08.2013 р.