

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «БАШКИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

САГДАТОВА АЛИЯ АЛЬФРИДОВНА

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ, КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ЖЕЛЧНОКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН

14.01.04 – внутренние болезни

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Ш. З. ЗАГИДУЛЛИН

Уфа - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Этиология и патогенез желчнокаменной болезни, современные теории литогенеза.....	10
1.2. Строение и состав желчных камней.....	15
1.3. Метаболизм липидов крови при желчнокаменной болезни.....	20
1.4. Генетические аспекты развития желчнокаменной болезни.....	25
1.4.1. Генетические изменения липопротеиновых рецепторов и протеинов, участвующих в гомеостазе холестерина.....	26
1.4.2. Генетические нарушения аполипопротеинов. Гены, участвующие в клеточном поглощении холестерина.....	27
1.4.3. Гены, участвующие в кишечной абсорбции холестерина.....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	34
2.1. Материалы исследования.....	34
2.2. Методы исследования.....	37
2.2.1. Методы изучения структуры и свойств желчных камней.....	37
2.2.2. Исследование липидов сыворотки крови.....	39
2.2.3. Молекулярно-генетические методы исследования.....	40
2.3. Статистическая обработка полученных результатов.....	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	48
3.1. Распространенность желчнокаменной болезни в Республике Башкортостан.....	48
3.2. Химический анализ и структура желчных камней, извлеченных после холецистэктомии.....	53
3.3. Клиническая характеристика хронического и острого калькулезного холецистита.....	64
3.4. Особенности ассоциации полиморфных вариантов генов	

аполипопротеина В-100, белка липопротеинового рецептора, транспортеров холестерина с желчнокаменной болезнью.....	71
3.4.1. Анализ ассоциации XbaI-полиморфизма (<i>rs693</i>) гена <i>APOB-100</i> у больных желчнокаменной болезнью.....	72
3.4.2. Анализ ассоциации инсерционно-делеционного полиморфизма (<i>rs11267919</i>) гена <i>LRPAP1</i> у больных желчнокаменной болезнью.....	75
3.4.3. Анализ ассоциации полиморфного варианта <i>i7892 T>C</i> (<i>rs4131229</i>) гена <i>ABCG5</i> с желчнокаменной болезнью.....	77
3.4.4. Анализ ассоциации полиморфного варианта <i>rs11887534</i> гена <i>ABCG8</i> с желчнокаменной болезнью.....	80
3.5. Анализ взаимосвязи наиболее значимых клинических признаков и полиморфных вариантов генов аполипопротеина В-100 <i>APOB-100</i> (<i>rs693</i>), АТФ-связанного кассетного (ABC) трансмембранного белка - транспортера холестерина <i>ABCG5</i> (<i>rs4131229</i>), контролирующих липидный обмен, и их фенотипической реализации у больных с желчнокаменной болезнью.....	82
3.6. Анализ взаимосвязи наиболее значимых клинических признаков, а также полиморфных вариантов генов <i>APOB-100</i> (<i>7673C>T rs693</i>) и <i>ABCG5</i> (<i>i7892 T>C rs4131229</i>), контролирующих липидный обмен, и их фенотипическая реализация у больных с хроническим и острым калькулезным холециститом.....	86
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	91
ВЫВОДЫ.....	102
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	104
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Желчнокаменная болезнь (ЖКБ) или холелитиаз характеризуется нарушением обмена холестерина (ХС) и билирубина, развивается в результате воздействия различных факторов с образованием камней в желчном пузыре или желчных протоках [6]. ЖКБ является широко распространенным заболеванием во всем мире, выявляется, как правило, на стадии сформировавшихся камней [26] и чаще всего встречается у женщин [21]. Около 10% населения Земли страдает ЖКБ [22, 27, 183]. В России частота этого заболевания составляет от 5 до 20 % [54].

Клинически ЖКБ протекает в виде хронического (ХКХ) и острого (ОКХ) калькулезного холецистита. Число больных ХКХ в Российской Федерации составляет около 12-20% [38]. Острый холецистит по частоте занимает второе место после аппендицита, составляя 10% всех ургентных заболеваний. В 85-90% случаев острого холецистита в желчном пузыре обнаруживаются камни, а сам приступ желчной колики примерно в 2/3 случаев является рецидивирующим проявлением ЖКБ [28].

Холелитиаз развивается задолго до появления первых клинических симптомов, что затрудняет постановку диагноза на ранних стадиях, требует использования дорогостоящих методов исследования. Это диктует необходимость поиска новых факторов, предрасполагающих к развитию данной патологии и ее осложнений, выявлению патогенетически значимых отклонений.

В связи с тем, что удаление желчного пузыря является общепризнанным эффективным методом лечения ЖКБ, имеется высокая хирургическая активность, которая не решает всех проблем, и у 20-51% больных в различные сроки после операции дает осложнения и формирование постхолецистэктомического синдрома, хронического панкреатита [3].

В настоящее время, несмотря на изученность данной проблемы, остается много неясных моментов в этиологии и патогенезе холелитиаза. Из-за широкой

распространенности заболевания остается актуальным исследование данной патологии с целью разработки новых путей диагностики и лечения ЖКБ. Решение этой задачи основывается на знании состава и структуры камней, механизма их образования, влияния генетических факторов риска на формирование заболевания, изменений в обмене липидов сыворотки крови, поскольку именно они определяют результаты эффективности медикаментозного и хирургического лечения [521].

Изучение влияния различных факторов на формирование ЖКБ является важной задачей для исследователей. Среди таких факторов значимую роль играют генетические, которые участвуют в регуляции метаболизма ХС – основного компонента конкрементов [190].

Все вышесказанное обосновывает актуальность выбранного направления и целесообразность проведения дальнейших исследований, направленных на выявление нарушений в спектре липидов крови, полиморфных вариантов генов, кодирующих белки, которые участвуют в процессе формирования ЖКБ.

Цель исследования – оценка распространенности, выявление факторов риска желчнокаменной болезни и ее фенотипов на основе изучения физико-химических параметров желчных камней, клинических особенностей и генов предрасположенности к данному заболеванию в Республике Башкортостан.

Задачи исследования

1. Изучить уровень, структуру и динамику распространенности желчнокаменной болезни в Республике Башкортостан за 2005-2016 гг. по данным Медицинского информационно-аналитического центра Министерства здравоохранения Республики Башкортостан
2. Провести физико-химический анализ смешанных желчных камней и разработать модель кристаллообразования и роста холелитов.
3. Провести анализ клинико-лабораторных данных желчнокаменной болезни по материалам терапевтического и хирургического отделений Городской клинической больницы № 21 г. Уфа.

4. Провести анализ ассоциаций полиморфных локусов генов аполипопротеина В-100 (*rs693*), белка липопротеинового рецептора *LRPAP1* (*rs11267919*), АТФ-связанных кассетных (ABC) трансмембранных белков - транспортеров холестерина *ABCG5* (*rs4131229*) и *ABCG8* (*rs11887534*) с риском развития желчнокаменной болезни у этнических групп русских и татар в республике Башкортостан.
5. Провести анализ взаимосвязи наиболее значимых клинических признаков, а также полиморфных вариантов генов аполипопротеина В-100 *APOB-100* (*rs693*), АТФ-связанного кассетного (ABC) трансмембранного белка - транспортера холестерина *ABCG5* (*rs4131229*), контролирующих липидный обмен, и их фенотипической реализации у больных с желчнокаменной болезнью.

Научная новизна исследования

Впервые представлены уровень и динамика распространенности желчнокаменной болезни в Республике Башкортостан за период с 2005 по 2016 год, свидетельствующие о сохраняющейся высокой частоте данной патологии.

Предложена модель образования смешанного желчного камня, которая постулирует формирование центров кристаллизации из арагонита и рост арагонитных кристаллов в радиальном направлении благодаря диффузии атомов кальция.

Выявлены маркеры риска развития хронического и острого калькулезного холецистита по полиморфным вариантам генов аполипопротеина В-100, АТФ-связанных кассетных (ABC) трансмембранных белков-транспортеров холестерина *ABCG5*.

Впервые созданы клинико-генетические модели для диагностики желчнокаменной болезни и ее фенотипов, которые позволяют представить количественную оценку формирования холелитиаза и выявить пациентов с факторами риска развития заболевания.

Научно-практическая значимость

Полученные данные о высокой распространенности желчнокаменной болезни в Республике Башкортостан и выявленные факторы риска развития заболевания являются основой для комплексной оценки состояния здоровья населения, обоснования медико-социальных мероприятий, воздействующих на факторы риска холелитиаза, в Республике Башкортостан.

Предложенная модель формирования смешанного желчного камня позволяет разработать пути оптимизации медикаментозных методов лечения.

Обнаруженные маркеры риска развития желчнокаменной болезни по полиморфным вариантам представленных генов с учетом этнической принадлежности дают основание формировать группы пациентов для проведения профилактических мероприятий.

Созданные клинико-генетические модели позволяют представить количественную оценку формирования холелитиаза и вероятность развития определенных фенотипов желчнокаменной болезни, а также выявить пациентов с факторами риска развития заболевания. Полученные данные, по мере развития доступности технологий генотипирования, могут быть использованы в организации диспансерной работы с больными гепатобилиарной патологией.

Положения, выносимые на защиту

1. Заболеваемость желчнокаменной болезнью в Республике Башкортостан характеризуется высокой распространенностью с тенденцией к росту.
2. Разработана модель формирования смешанных холелитов, центр кристаллизации которых формируется из арагонита с последующим ростом арагонитных кристаллов в радиальном направлении.
3. Аллель *X* полиморфного варианта *rs693* гена *АРОВ-100* и аллель *С* однонуклеотидной замены *rs4131229* в гене *ABCG5* определяют риск формирования желчнокаменной болезни у этнической группы татар в Республике Башкортостан.

4. Установлены фено-генетические факторы риска развития холелитиаза и его фенотипов: наличие генотипа X^+X^- гена *APOB-100*, повышение массы тела более 56 кг, уровень лейкоцитов, связанного билирубина, липидные изменения – для желчнокаменной болезни; для хронического калькулезного холецистита - наличие генотипа $X+X-$ полиморфного варианта *rs693* гена *APOB-100*, изменения липидного обмена; для острого калькулезного холецистита - наличие аллеля *C* полиморфного варианта *rs4131229* гена *ABCG5*, уровень связанного билирубина сыворотки крови, возраст старше 60 лет, изменения липидного обмена.

Апробация работы

Основные результаты диссертации обсуждены на 78-ой Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2013), научно-практических конференциях «Казанская школа терапевтов», посвященной 140-летию великого Российского терапевта С. С. Зимницкого (Казань, 2013), «Казанская школа терапевтов», посвященной 185-летию Российского терапевта Г.А. Захарьина (Казань, 2014), 80-ой научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2015), VII съезде Российского общества медицинских генетиков (Санкт-Петербург, 2015), XXXVI Международной научно-практической конференции «Научная дискуссия: инновации в современном мире» (Москва, 2015).

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на заседании проблемной комиссии «Внутренние болезни» ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 7 - в журналах, включенных в перечень российских рецензируемых научных

журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, их обсуждение, а также выводы, практические рекомендации и список литературы.

Материалы диссертации изложены на 128 страницах и иллюстрированы 20 таблицами, 22 рисунками. Библиографический указатель содержит 212 наименований, из которых 139 - зарубежных.

Благодарность

Автор настоящего исследования выражает глубокую благодарность зав. кафедрой генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», д.б.н., академику АН РБ, профессору Э.К. Хуснутдиновой, доц. А.Х. Нургалиевой и зав. кафедрой материаловедения и физики металлов ФГБОУ ВО «Уфимский государственный авиационный технический университет», д.ф.-м.н., профессору Н.Г. Зарипову и аспиранту Э. Р. Шаяхметовой за совместную деятельность по выполнению отдельных фрагментов данной работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Этиология и патогенез желчнокаменной болезни, современные теории литогенеза

Образование желчи и ее выведение - важная функция печени. Известно, что у здорового человека за сутки выделяется около 500 – 1200 мл желчи [5]. Пузырная желчь состоит из множества компонентов, основными из которых являются: вода (>80%), соли желчных кислот (12%), фосфолипиды (4%), холестерин (0,7 – 1,6%), плазменные белки (0,8 – 1%), билирубин (0,1 – 0,6%), неорганические электролиты [17].

Липиды крови транспортируются с помощью специальных везикул, которые состоят из холестерина и фосфолипидов и формируются на наружной мембране клеток печени [67].

Выделяют простые и смешанные мицеллы, которые различаются по строению, переносят апопротеины C3, E, A1, A2, из них два последних препятствуют выпадению холестерина в осадок. Простые мицеллы имеют размер менее 3 нм, состоят из фосфолипидов и холестерина; смешанные – размер 3-6 нм, содержат желчные кислоты; и везикулы – размер 25-75 нм, состоят также из желчных кислот [20, 67, 70].

Желчные кислоты всасываются в слизистой терминального отдела толстого кишечника и по воротной вене попадают в печень. В желчные протоки проходят только гидрофильные желчные кислоты. В 12 - перстной кишке образуется секретин, стимулирующий образование жидкости с бикарбонатами и хлоридами, и под действием которого образуется желчь [20, 67].

Первичные желчные кислоты (холевая и хенодезоксихолевая) образуются из холестерина в клетках печени, связываются с таурином или глицином и

попадают в связанном состоянии в желчь. В толстой кишке бактериями кишечника осуществляется расщепление желчных кислот с образованием вторичных дезоксихолевой и 7-кетолитохолевой кислот, которые обратно всасываются в кровь и участвуют в кишечно-печёночном транспорте желчных кислот. После обратного всасывания печенью 7-кетолитохолевой кислоты последняя превращается в урсодезоксихолевую кислоту (третичную желчную кислоту). Желчные кислоты способствуют образованию и выделению фосфолипидов.

Нарушение микрофлоры кишечника с преобладанием анаэробов вызывает дисметаболизм желчных кислот. В результате увеличивается количество токсичных литохолевой и дезоксихолевой кислот, которые повреждают слизистую оболочку кишечника, что вызывает нарушение его моторно-эвакуаторной функции и образование холелитов в патогенной желчи. Также нарушается функция печени, деятельность купферовских клеток и системы мононуклеарных макрофагов, что приводит к формированию и прогрессированию дислипидопроteinемии [14, 29].

Везикулы могут менять свою структуру от кристаллической до жидкокристаллической и превращаться в смешанные мицеллы и обратно. В процессе пищеварения при стазе желчи мицеллы накапливаются в желчном пузыре [37, 39, 67, 70, 132].

Являясь широко изученным заболеванием, ЖКБ в своем патогенезе до сих пор имеет немало спорных и до конца неясных моментов.

Различают холестериновый, пигментный, смешанный виды холелитиаза. Также выделяют сложный вид желчных камней, который встречается в 10 % случаев и является комбинацией всех видов конкрементов. Установлено, что в состав ядра конкремента входит холестерин, оболочка состоит из кальция, билирубина и холестерина. Конкременты возникают в желчном пузыре и желчных путях в результате воспалительных изменений в них [45].

Выделяют три стадии формирования холелитов: насыщение, кристаллизацию и рост [19].

Известно, что холестериновые конкременты выявляются в 70-80% ЖКБ. Холестериновые холелиты образуются в результате избыточного содержания холестерина в составе желчи, выпадения в осадок и кристаллизации холестерина с нарушением моторной функции желчного пузыря, что приводит к стазу желчи [70]. Смешанные мицеллы образуются из везикул желчи, состоящей из достаточного количества желчных кислот и холестерина. Мицеллы растут, когда в их стенку включаются фосфолипиды. В желчи смешанные мицеллы удерживают холестерин в растворенном состоянии. При избытке холестерина и снижении количества желчных кислот в желчи транспорт холестерина в составе смешанных мицелл затрудняется [67].

В мицеллярной теории W.H. Admirand et D.M. Small (1968) выделяют: преобладание содержания в желчи холестерина над желчными кислотами и фосфолипидами; перенасыщение холестерином желчи и ее сгущение с образованием микролитов и осадка; скопление микролитов холестерина, образование камней и их рост [38, 39].

В дальнейшем, по мере изучения проблемы, выяснилось, что в густом осадке желчи содержится не только холестерин, но и билирубинат, карбонат кальция и гликопротеины. Сгусток желчи может рассасываться при улучшении моторно-эвакуаторной функции желчного пузыря, и лишь в 14-20% из него образуются камни [67].

Существует везикулярная теория образования холелитов, согласно которой холестериновые конкременты формируются в результате нарушения состава везикул желчи, в частности фосфолипидов [185].

Стабильный состав желчи поддерживается смешанными мицеллами, состоящими из холестерина, фосфолипидов и желчных кислот. В литогенной желчи преобладают холестерин-фосфолипидные везикулы, что ведет к образованию холестериновых кристаллов [70].

Выделяют ряд факторов, которые приводят к образованию конкрементов в желчном пузыре: муциновые гликопротеины, альбумины, бактериальная инфекция желчного пузыря, иммуноглобулины G и M, ионы кальция, связанный

билирубин, неорганические микроэлементы, продукты свободнорадикального окисления липидов; и факторы, которые тормозят холелитогенез: желчные кислоты, холелицитин, апопротеины A1 и A2, низкомолекулярные белки с молекулярной массой 120 кДа. В патогенной желчи возрастает содержание муциновых гликопротеинов, N-аминопептидазы, кислого альфа1-гликопротеина, иммуноглобулинов, фосфолипазы-С [67] и убывает количество желчных кислот и фосфолипидов [37, 38, 39, 53, 73].

Стаз желчи обязателен для образования камней. В 70-90% случаев хронического калькулезного холецистита (ХКХ) выявляется дискинезия желчного пузыря по гипотоническому типу [67].

К факторам риска формирования ЖКБ относят употребление оральных контрацептивов; парентеральный прием пищи, сахарный диабет, у женщин - возраст после 40 лет, ожирение, метеоризм, а также много рожавшие женщины.

Кроме холестериновых и смешанных холелитов, выделяют коричневые и черные пигментные камни.

Коричневые пигментные конкременты мягкие по текстуре, встречаются примерно в 10% случаев, чаще обнаруживаются во внепеченочных желчных путях. На 70% состоят из билирубината, пальмитата и стеарата кальция, на 30% - из холестерина.

Коричневые камни образуются в результате застоя желчи и сопутствующей бактериальной инфекции [67].

В 10-12% случаев ЖКБ обнаруживаются твердые черные пигментные конкременты, образующиеся в результате инфекции, чаще в желчном пузыре. Черный цвет у этого вида камней - за счет наличия в их составе полимера черного пигмента, карбоната и фосфата кальция без холестерина. В состав черных пигментных желчных камней входит несвязанный билирубин, мукополисахариды, муцин, гликопротеины и соли кальция [24, 32, 68, 70].

Нужно признать, что ряд различных обстоятельств предшествует появлению конкрементов в желчном пузыре. К ним можно отнести образ жизни, питание, беременность, изменения метаболизма в сочетании с некоторыми

генетическими факторами, которые являются предпосылками возникновения холелитиаза. Период функциональных и органических нарушений желчных путей (дискинезия желчных путей, гастрит, холецистит) можно назвать предболезнью, ведущей к расцвету ЖКБ. Начальный период клинических проявлений заболевания бывает латентным (носительство конкрементов), который далее переходит к развитию различных последствий и осложнений. Разработано множество классификаций данной патологии. D.M. Small в 1974 году выделял 5 стадий: I стадия – генетических, биохимических и метаболических нарушений, приводящих к перенасыщению холестерина желчи; II стадия – химическая: при биохимическом исследовании желчи определяются признаки литогенной желчи; III стадия – физическая: образование кристаллов холестерина; IV стадия – рост кристаллов и формирование холестериновых камней; V стадия – появление клинических симптомов холелитиаза. X.X. Мансуров в 1982 году начальный период формирования холелитиаза называл физико-химической стадией, затем отмечал развитие клинического периода с образованием желчных камней и возможной обтурацией протоков. В классификации ЖКБ Ю.М. Дедерера (1983) и С.А. Дадвани (2000) выделяли латентную (камненосительство) форму; первично хронический холецистит; печеночная (желчная) колика; хронический рецидивирующий калькулезный холецистит; хронический резидуальный холецистит; прочие формы (стенокардитическая, синдром Сейнта) [13,23,35]. С внедрением неинвазивного ультразвукового исследования (УЗИ) органов брюшной полости стали появляться классификации с подробным описанием содержимого желчного пузыря и желчевыводящих путей. В 2002 году Съездом научного общества гастроэнтерологов России была принята новая классификация ЖКБ, в которой выделены 4 стадии заболевания (1 стадия – начальная или предкаменная (взвесь, сладж), 2 стадия – формирование желчных камней, 3 стадия – хронический рецидивирующий калькулезный холецистит, 4 стадия – осложнения) [25], оговаривая, что развитие ЖКБ не всегда проходит последовательно все стадии. Осложнения данной патологии могут появляться на любом этапе. В приведенной классификации ХКХ является одной из стадий

развития ЖКБ. Но долгое время патологию рассматривали как самостоятельное заболевание, вне связи с холелитиазом. Существовало два взгляда на последовательность формирования ХКХ. Первый отмечает формирование желчных камней как следствие хронического воспалительного процесса в желчном пузыре. Второй, наоборот,- воспаление стенки желчного пузыря возникает из-за холелитиаза. Последний вариант зафиксирован в Международной классификации болезней 10 пересмотра (МКБ-10). Клинические классификации лежат в основе разработки стандартов оказания медицинской помощи населению, являясь определенным инструментом для принятия врачебных решений. Важным требованием является их соответствие МКБ-10, поскольку в повседневной работе лечебно-профилактических учреждений МКБ-10 выступает универсальной классификацией для учетно-отчетной, финансовой и других видов деятельности [70]. В 2016 году Российская гастроэнтерологическая ассоциация выпустила рекомендации по диагностике и лечению холелитиаза, согласно которым по клинической картине выделяются ЖКБ с бессимптомным течением и ЖКБ с клиническими проявлениями в виде приступов желчной колики и острого калькулезного холецистита (ОКХ). Если приступы желчной колики имеют стертый характер и повторяются достаточно часто, то диагноз иногда формулируют как «обострение хронического калькулезного холецистита» [55]. В Клинических рекомендациях EASL по профилактике, диагностике и лечению ЖКБ выделяются также бессимптомное течение данной патологии (в 80%) и с клиническими проявлениями (в 1-4% в год) в виде желчной колики, боли с иррадиацией, приема анальгетиков, тошноты и рвоты и др. ОКХ рассматривается как осложнение ЖКБ, возникающее у 10 % пациентов с холелитиазом при наличии клинических проявлений [18].

1.2. Строение и состав желчных камней

В строении большинства холелитов выделяют ядро, строму - тело камня и корковый слой – мантию [16]. Некоторые камни имеют чисто кристаллическую структуру, где от ядра радиально определяется рост кристаллов. А. Наунин и

соавт. в качестве зачатка камня понимают ядро, состоящее из билирубиновой извести. Обнаруживаются в составе ядра билирубиновая известь и слизь [16].

Многие авторы (Наунин А., Ашоф Л., Романцева Н.И.) известь и слизь считают признаком воспаления. М. А. Галеев и соавт. (2001) считают, что таким образом образуется лишь часть холелитов. Известь или соли кальция в виде кристаллов арагонита CaCO_3 , по мнению авторов, не связаны с воспалением, а являются результатом кристаллизации из пересыщенного коллоидного раствора желчи. И чем медленнее происходит процесс кристаллизации, тем более грубые кристаллы образуются в камнях. Соли кальция в качестве арагонита присутствуют и в чистых холестериновых камнях в виде кристаллических лучей. В состав ядра камня могут входить образования холестерина в виде игл, табличек или капель сферолитов. Некоторые камни могут иметь несколько зачатков (ядер), вокруг которых формируется будущий холелит. Причиной формирования холелитов являются игольчатые и сферолитовые образования холестерина. Ядра состоят из сферолитов, билирубината кальция, солей металлов вместе с белком, остатки распавшегося камня, паразиты (аскариды, лямблии и др.), инородные тела [16].

Некоторые авторы также выделяют в составе холелитов концентры, радиально-лучистые срастания, однородные аморфные массы, полости и т.д. [64].

В.В. Поляков и др. (2010) выделяют ядро или несколько ядер, под которым понимают часть камня, состоящую из сгустка органического вещества или скопления кристаллов, слой (концентрически окружающая ядро центральная часть), однородный по составу и имеющий четкие границы, и внешнюю граничную область. Слои формируются на поверхности ядра из-за отложения минеральных или органических веществ. В состав ядра входят белок, фосфат, карбонат, билирубинат кальция, черный пигмент и другие соединения. Для ядра характерна постоянная концентрация химических элементов (натрия, магния, серы и хлора), затем от ядра до граничного слоя было характерно хаотичное увеличение концентрации кислорода, азота, уменьшение кальция. В области

границы камня доли кальция и кислорода в ядре были примерно равны, значение азота падало, а фосфора – возрастало [27].

В состав холелитов в основном входят моногидрат холестерина, билирубинат и другие соли кальция, жирные кислоты, фосфолипиды, соли желчных кислот [67].

Основной вклад в элементный состав камней, согласно исследованиям электронной микроскопии, вносят углерод, кальций, кислород, меньший – фосфор, азот, натрий, магний, сера, хлор [27].

В зависимости от содержания неорганических микроэлементов в желчных камнях больше всего обнаружено: железо, хром, марганец, медь, титан, никель, свинец [16]. В пигментных камнях выявлены высокие концентрации железа, меди, марганца. Чистые пигментные камни черного цвета, иногда бурого, имеют вид мелких кусочков угля с металлическим блеском, мелкие, множественные, неправильной формы с шиповидными отростками. Они образуются при нарушениях пигментного и минерального обмена веществ в организме, а не воспаления. Землистые пигментные камни - коричневой окраски, мягкие, имеют овальную форму, аморфную структуру со слоистым строением типа коллоида в различных фазах его старения. Они могут образовываться при нарушении пигментного, холестеринаового и минерального обмена веществ, наличии застоя и воспаления в желчном пузыре и желчных путях. В холестериновых камнях повышено содержание марганца, меди, железа, хрома. Они являются чаще одиночными, обнаруживаются в желчном пузыре, имеют желтовато-восковой цвет, в форме мелких ягод малины, мягкой консистенции, легкие, плавают в воде, при высыхании становятся хрупкими. На шлифе холестериновые камни имеют радиальную исчерченность, которая отходит от центра камня. В смешанных камнях больше содержится медь, затем железо, марганец, хром и др. Выделяют холестерино-пигментно-минеральные конкременты; пигментно-холестериново-минеральные камни; паразитарные пигментно-холестериново-минеральные камни.

Смешанные камни, как правило, - множественные, имеют кубическую, призматическую, многогранную неправильную форму с окраской от желто-серо-

зеленого до коричневого и черного цвета. Образовываются эти холелиты при нарушении обмена веществ и наличии инфекции в желчных путях. На шлифе они имеют выраженную слоистую структуру. При этом выдвигается гипотеза о том, что при наличии воспаления в желчных путях, накапливаются большие концентрации хрома в тканях и крови больных ЖКБ.

Установлено, что в состав одиночных смешанных холелитов входят белково-холестериновое ядро, а множественных – белково-билирубиновое. При этом билирубин, муциновые гликопротеины и соли кальция выполняют роль внутреннего каркаса. Билирубин обнаруживается чаще вокруг ядра желчного камня в виде плотных колец, на периферии же он не встречался. Холестерин в виде моногидрата или в безводной форме находится в окружности ядра, и в краевой зоне или по всей поверхности. В множественных камнях холестерин концентрируется вокруг ядра, билирубин и муциновые гликопротеиды диффузно распределены по всем слоям камня [45].

Состав камней различен в зависимости от возраста: в 40-50 лет больше кальция, магния и фосфора, в 50-60 лет – железа, в 60-70 лет – натрия [71].

В состав пигментных конкрементов входит большое количество кальция и его солей (до 43%) и 5-15% белка, мало фосфолипидов (около 0,5%), а также магний, фосфор, железо, натрий, алюминий, кремний, хром, титан, медь, реже – кобальт, висмут, молибден, никель и др. [71].

Существует мнение, что холестериновые конкременты на 60% состоят из холестерина, муцина, билирубината, фосфата, карбоната и пальмитата кальция и др. Образуются они в результате избыточного содержания в желчи холестерина, повышения концентрации муцина, ионов кальция, снижения антинуклеаров, а также застоя желчи. В начальной стадии развития холестеринового холелита происходит образование кристаллов холестерина из билиарных холестерино-фосфолипидных пузырьков с формированием ядра конкремента за счет слияния солей кальция, пигмента и муцина. Пигментные конкременты содержат в основном билирубин и кальциевые соли [8].

Кроме безводного холестерина $C_{27}H_{46}O$ в холелитах также найдены: карбонаты кальция $CaCO_3$ (фатерит, арагонит и кальцит), фосфат кальция витлокит $Ca_3(PO_4)_2$ и ряд органических веществ – билирубин ($C_{33}H_{36}O_6N_4$), натриевая соль желчной кислоты ($C_{21}H_{37}=CONHCH_2COONa$) [8]. В черных пигментных конкрементах холестерин практически не выявлен. Они состоят из билирубина и пальмитата кальция $C_{15}H_{31}COO)_2Ca$. Для желчных камней характерно зонально-слоистое строение. В составе желчных камней выявлено более 36 неорганических элементов: Ca, K, Mn, Fe, Cu, Pb, Ti, Zn, V, Ni, Bi, Cr, Hg и др.

Установлено, что рост концентрации кальция в литогенной желчи благоприятствует формированию конкрементов, состоящих из карбоната и билирубината кальция, которые являются основной фазой пигментных камней [9].

При изучении особенностей 40 желчных камней выделены холестериновые и билирубинат - холестериновые камни. Для холестериновых камней характерна радиально-лучистая структура, которая делится на веероподобную и пластинчатую. Они содержат около 5 % билирубината кальция. Билирубинат – холестериновые камни содержат 10-25% билирубината кальция и отличаются более сложной радиально-слоистой и слоистой (оолитовой) структурой [1].

Выделяют также редкий белый известковый вид желчных камней, который формируется при очень высоком содержании кальция в желчи, напоминающей мел. В составе этих конкрементов содержится 85-92% кальция карбоната, фосфата, оксалата, пальмината и 1-3% желчных кислот, билирубина, холестерина. Данный вид камней встречается при нарушении фосфорно-кальциевого обмена, гиперпаратиреозе, гипервитаминозе Д, когда возрастает содержание уровня кальция в крови и желчи [12].

Большинство авторов подчеркивает роль инфекции в литогенезе. С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) определена дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) кишечной палочки и псевдомонад у 88% больных, имеющих холестериновые холелиты [70, 97]. Бактериальная ДНК

выявлена в 57% холестериновых конкрементов, где встречаются грамположительные кокки, и 67% смешанных конкрементов, в которых обнаружены грамотрицательные палочки и анаэробы [128].

1.3. Метаболизм липидов крови при желчнокаменной болезни

Липиды (холестерин (ХС), фосфолипиды (ФЛ), триглицериды (ТГ)) и липопротеины метаболизируются в печени. Липиды в воде не растворяются, а липопротеины имеют гидрофобную и гидрофильную поверхность, за счет которой они могут переходить в плазму крови.

Из ХС образуются желчные кислоты, стероидные гормоны и витамин Д. Обнаруживается данный липид во всех тканях организма человека, синтезируется в печени, тонкой кишке и других органах.

Различают эндогенный ХС, который образуется в организме, чаще в печени, и составляет 2/3 от общего состава холестерина, и экзогенный ХС, который поступает с пищей и составляет 1/3 [55]. Экзогенный - всасывается в кишечнике в составе жировых мицелл, образующихся в результате эмульгирования жира желчными кислотами желчи и гидролиза эфирных связей жиров панкреатической липазой. Мицеллы всасываются клетками эпителия тонкого кишечника. Затем ХС в составе хиломикронов достигает гепатоцитов, где подвергается эстерификации или выводится с желчью [56].

ХС образуется из ацетил-КоА в клетках печени и слизистой оболочке кишечника. Из клеток печени он выделяется в виде эфиров ХС, желчных кислот и свободного ХС. Нарушение равновесия в процессах образования и выделения данного липида ведет к образованию ЖКБ [32].

Желчные кислоты возвращаются в печень при энтерогепатической циркуляции, действуют как ингибиторы ферментов печени, которые принимают участие в окислении ХС. Следовательно, выраженное выведение желчных кислот с фекалиями приводит к окислению ХС и уменьшению его содержания в организме [99].

ФЛ – являются компонентом клеточных мембран, как и ХС, обнаруживаются во всех тканях организма человека.

ФЛ плазмы и клеточных мембран большей частью представлены фосфатидилхолином (лецитином), который может играть определенную роль в воспалительных процессах в желчном пузыре. ФЛ выделяются в желчь вместе с ХС в виде фосфолипидно-холестериновых вначале простых, затем при перенасыщении ХС – смешанных мицелл и одноламеллярных пузырьков, из которых после слияния образуются многоламеллярные пузырьки, а затем кристаллы [32].

ТГ – средство переноса энергии от кишечника и печени к тканям. Основной составной частью их молекулы является глицерин, гидроксильные группы которого эстерифицированы жирными кислотами [70].

Перенос ХС осуществляется липопroteинами. Липопroteины – это белки, которые транспортируют ХС, ТГ и другие молекулы. Все липопroteины состоят из гидрофобной внутренней части (ядра), в которой находятся ХС, ТГ и жирорастворимые витамины, и гидрофильной наружной части, которая состоит из ФЛ, свободного ХС и белков-аполипопротеинов [23, 62, 70].

Аполипопротеины участвуют в обмене и переносе липидов к местам их утилизации, растворении холестерина и триглицеридов. Например, апопротеины В и Е, являются составной частью липопroteинов низкой (ЛПНП) и очень низкой (ЛПОНП) плотности, распознаются рецепторами клеток печени, захватывающими и поглощающими эти липидные частицы. Апопротеины А-I и С-II содержатся в липопroteинах высокой плотности (ЛПВП), ЛПОНП и хиломикронах и активируют ферменты липопroteинлипазу, гидролизующую ТГ хиломикронов, ЛПОНП, а также лецитин-холестерин-ацилтрансферазу (ЛХАТ), липопroteидлипазу, печеночную липазу и т.д. [55, 98, 101].

Аполипопротеин А-1 образуется в тонком кишечнике и печени, участвует во всасывании ХС из клеток, переносят его в печень [102].

Аполипопротеин В (АРОВ) – основное составляющее ЛПНП, ЛПОНП и липопroteинов промежуточной плотности (ЛППП), хиломикронов, используется

при синтезе липопротеинов, богатых ТГ. С помощью АРОВ ЛПНП могут транспортировать ХС к тканям организма. Белку характерно многообразие генетических форм. Известна форма аполипопротеина В-100 (АРОВ-100), которую имеют в своем составе ЛПОНП и ЛПНП. Она содержит 4 536 аминокислот, входит в липидную сердцевину, а аполипопротеин В-48 – с хиломикронами. Липопротеины имеют в своем составе лишь 1 молекулу Апо В.

Аполипопротеин С входит в состав ЛПВП, образуется в печени, взаимодействуют с ТГ.

Аполипопротеин Е (АРОЕ) переносит ХС в организме в составе хиломикронов и ЛПОНП. Образуется в печени и головном мозге. Имеет в своем составе 299 аминокислот и два домена, один из которых взаимодействует с липидом, а второй - с АРОЕ-рецепторами на гепатоцитах и клетках тканей. Таким образом, ликвидируется излишек ЛПНП и хиломикронов из крови [56].

Различают липопротеины по плотности и размерам частиц на следующие классы:

1. Хиломикроны – крупные по размеру, но малые по плотности частицы, которые синтезируются в слизистой кишечника из липидов во время пищеварения. Имеют в своем составе ТГ, которых они транспортируют из тонкого кишечника в мышцы, сердце и жировую ткань. Состоят из аполипопротеинов А-I, А-II, А-IV и В-48. В стенке кровеносных сосудов хиломикроны разделяются на мелкие частицы, высокое содержание которых в крови является фактором риска развития патологии сердечно-сосудистой системы при нормальных уровнях ХС [56].

2. Липопротеины очень низкой плотности состоят на 55% из ТГ, на 19% - из ХС и на 8% из АРОВ-100, Е, С-I и С-II. Синтезируются в печени, транспортируют ТГ. В крови происходит под действием липопротеинлипазы липопротеины данного класса разделяются, уменьшаются в размерах и превращаются в ЛППП, часть которых выводится из крови печенью, а другая часть преобразуется в ЛПНП.

3. Липопротеины низкой плотности – меньшие по размеру частицы, которые переносят ХС, содержат около 6% ТГ, 50% хиломикронов и 22% белка. На своей поверхности они транспортируют всего одну молекулу белка АРОВ-100 и ХС из печени в другие ткани.

Метаболизм ЛПНП осуществляется несколькими путями. Первый путь заключается в захвате рецепторами гепатоцитов ЛПНП, связывании с АРОВ и Е на поверхности липопротеинов, и их гидролизе в гепатоците с образованием свободного ХС, белка и жирных кислот.

Согласно второму пути данный класс липопротеинов проходит свободнорадикальное перекисное окисление. Свободные радикалы окисляют ЛПНП так, что они плохо распознаются В- и Е-рецепторами гепатоцитов и не принимают участие в дальнейшем распаде липопротеинов. Данные недоокисленные частицы захватываются макрофагами, преобразуются в пенистые клетки и входят в состав атеросклеротических бляшек, разрушая стенки сосудов. Данный класс липопротеинов является самой атерогенной разновидностью липидов [56].

4. Липопротеин (α) образуется также в печени, содержит много нейраминовой кислоты, за счет чего он растворяется в воде, в отличие от АРОВ-100. Содержит в оболочке апопротеин α , который обладает свойствами плазминогена и может быть связан с тромболизисом и атерогенезом [197].

Высокий уровень липопротеина (α) в крови связан с формированием атеросклероза, атеротромбоза, ишемической болезнью сердца [56].

5. Липопротеины высокой плотности – имеют самый маленький размер, образуются в кишечнике, печени, содержат 5% ТГ, 22% - ХС и 40% - апопротеинов А-I, А-II и С. Принадлежат к классу антиатерогенных частиц, участвуют в распаде и обратном захвате остальных форм липопротеинов в печень [56].

Одними из факторов, сопровождающих литогенез, считаются расстройство обмена липидов в крови. Однако до сих пор нет единого мнения об их взаимосвязи в крови и желчи у больных холелитиазом. Исследователи Attili A.F.,

Carulli N., Roda E. et al. (1995) не находят ассоциации между липидами крови и формированием ЖКБ [117], а Portincasa P., Moschetta A., Palasciano G, Chauffard A. (2002) рассматривают гиперлипидемию как риск развития холелитиаза [169].

Такую взаимосвязь находят у жителей Италии, Индии, Швеции, США, Великобритании [111]. Установлено, что у американских индейцев, чаще страдающих холелитиазом, показатели липидемии были ближе к референтным значениям, чем у американцев белой расы [116].

Метаболический синдром и сахарный диабет являются предрасполагающими к формированию холелитиаза заболеваниями [118]. Инсулинорезистентность вызывает изменение в обмене ХС и желчных кислот, нарушение двигательной функции желчного пузыря, и способствует формированию холестериновых конкрементов [114, 127, 1294, 174, 200].

Установлено, что после холецистэктомии по поводу ЖКБ уровень липидов в крови падает, а при обострении калькулезного холецистита, наоборот, достоверно увеличивается [24].

Обнаружен высокий уровень липидов у больных холелитиазом вне зависимости от факторов риска развития данной патологии [10].

Среди жителей Новосибирска ЖКБ чаще зарегистрирована у мужчин и женщин с дислипидемией, а также обнаружена прямая взаимосвязь между холелитиазом и ишемической болезнью сердца [11]. Установлена зависимость между холелитиазом и атеросклерозом брюшной аорты и сонных артерий, а также содержанием липидов в крови [40].

Исследованы аполипопротеины в стенке желчного пузыря, свидетельствующие об их поглощении и накоплении в стенке пузыря при холелитиазе [19]. Из-за дислипидемии и дисфункции желчного пузыря ХС способен откладываться в полости пузыря [69].

Установлено, что у коренных жителей Сибири и Севера России с умеренной гиперлипидемией ЖКБ встречается реже, чем среди пришлых жителей с повышенным содержанием липидов в сыворотке крови [35, 47, 42]. Увеличение уровня общего ХС и ТГ в крови пришлого населения Якутии и Эвенкии является

неблагоприятным признаком в отношении холелитиаза, так как у них замедлены процессы окисления ХС до желчных кислот, что приводит к понижению растворения данного липида в желчи в отличие от монголоидов северных широт, у которых липидный обмен стабилен из-за эффективного механизма обратного переноса ХС, активного синтеза желчных кислот и транспорта жиров в желчь [42].

В некоторых работах выявлены высокое содержание общего ХС, ТГ, ХС ЛПНП, ЛПОНП [50, 7] и низкие концентрации ХС ЛПВП у больных атеросклерозом и у больных холелитиазом [194]. Повышенное выделение ХС может быть связана с высоким содержанием АРОВ, Е - или апо Е-рецепторов как наследственного фактора, высокой активностью ГМГ-КоА-редуктазы, характерной для ожирения и гипертриглицеридемии, низкой активностью 7 α -гидроксилазы и АХАТ как наследственного фактора [13, 100, 103].

Существует предположение, что апопротеины (апопротеин А-1, апопротеин А-II, АРОВ) как в сыворотке крови, так и в желчи, участвуют в растворении и переносе липидов. Например, АРОВ имеют значение в определении количества ХС и ФЛ, секретируемых из крови в желчь [167]. Апопротеин А, продлевая время нуклеации, участвуют в растворении ХС.

Накоплено много доказательств за и против участия липидов сыворотки крови в патогенезе ЖКБ, поэтому единого мнения по этому вопросу пока не существует. Но, учитывая, что 75 – 80 % холелитов являются холестериновыми, можно предположить, что у больных ЖКБ наблюдаются дислипидемии [11].

1.4. Генетические аспекты развития желчнокаменной болезни

По мнению Ю.П. Лисицына (2002) на здоровье человека влияют генетические факторы в 15–20%, условия и образ жизни – 50–55%, работа учреждений здравоохранения – до 10–15%, окружающая среда – 20–25% [37].

Большинство ученых утверждают, что генетические особенности являются важными факторами в формировании холелитов [117]. Исследования показывают, что родственники больных ЖКБ в 5 раз чаще подвержены формированию

холелитиаза, причем риск у монозиготных близнецов повышен на 12%, а дизиготных близнецов - на 6% [78, 98].

Stinton LM et al. утверждают, что образование камней в желчном пузыре является результатом сложного взаимодействия нескольких генов и факторов окружающей среды [187].

Несколько лет назад учеными выявлены около 55 генов, объединенных в несколько классов, кодирующих белки, участвующие в процессе развития холелитиаза [144, 148, 201]: печеночные липид-регуляторные ферменты; нарушения липопротеиновых рецепторов холестерина; печеночные и кишечные мембранные транспортные белки; печеночные и кишечные внутриклеточные транспортировщики холестерина, желчных солей или фосфатидилхолина; факторы, регулирующие транскрипцию липидов и желчных солей; холецистокинин и его рецепторы, влияющие на двигательную активность желчного пузыря [11].

Среди выявленных генов необходимо отметить ген APOE и APOB [143], ген эфира ХС транспортирующего белка (CETP), ХС 7- α -гидроксилазы [171], рецепторов холецистокинина (CCKAR) [146], рецепторов ЛПНП (LDLR) [161] и CETP [160]. Предполагается, что гены, связанные с развитием ЖКБ расположены в основном на хромосомах 3, 4, 9 и 11 [153].

1.4.1 Генетические изменения липопротеиновых рецепторов и протеинов, участвующих в гомеостазе холестерина

LRPAP1 – рецептор-ассоциированный белок (RAP); представляет собой внутриклеточный белок с молекулярной массой 39 кДа, который является субъединицей ЛПНП рецептор – связанного белка (LRP) [206]. RAP взаимодействует с LRP и предотвращает преждевременное взаимодействие лиганда с поддерживающими рецепторами в функционально неактивном состоянии во время передвижения [193]. Ген LRPAP1 локализован на хромосоме 4p16.3 [107], имеет 22 различных полиморфизма [206].

В литературе практически не встречаются исследования об ассоциации полиморфизма гена LRPAP1 с ЖКБ.

Полиморфизм инсерция/делеция (I/D) гена LRPAP1 в 5 интроне не влияет на структуру белка напрямую. Было обнаружено, что D аллель LRPAP1 увеличивает уровень ЛПВП и апопротеина A1 в сыворотке крови [172] Gonzalez et al. выявили, что полиморфизм инсерция/делеция фрагмента 21 п.о. в 1 интроне гена LRPAP1 тесно связан с высоким уровнем липидов крови и риском раннего инфаркта миокарда [207].

Установлена выраженная связь I аллеля в 5 интроне данного гена с болезнью Альцгеймера [208]. Недавние исследования показали, что ген LRPAP1 имеет множественное действие на различные метаболические процессы [156]. Показана защитная функция D аллеля при развитии холелитиаза у мышей [149].

При исследовании полиморфизма инсерция/делеция в 5 интроне гена LRPAP1 выявлена связь данной изоформы гена с ЖКБ на севере Индии [91]. Juzyszyn Z. et al. (2008), изучая ассоциацию 37 п.о. полиморфизма insertion/deletion в 5 интроне гена LRPAP1 (rs11267919), пришли к выводу, что данный полиморфный вариант не связан с холелитиазом среди польского населения [154]. У больных с ЖКБ полиморфизм гена LRPAP1 мало изучен.

1.4.2 Генетические нарушения аполипопротеинов. Гены, участвующие в клеточном поглощении холестерина

1) Дефект гена АРОЕ. Полиморфизм данного гена является наиболее изученным. АРОЕ имеет молекулярную массу 34000, входит в состав ЛПОН, ЛППП и ЛПВП, ремнантов хиломикронов. АРОЕ участвует в перераспределении ХС между клетками органов и тканей [58]. Полиморфизм гена АРОЕ влияет на уровень липидов в крови [89, 115].

АРОЕ образуется в печени и поступает в кровь в составе ЛПВП [87].

Ген, который кодирует синтез АРОЕ, расположен на 19 хромосоме [155, 86], состоит из 4 экзонов, 3 интронов, 3597 пар нуклеотидов и характеризуется полиморфизмом. Две замены аминокислот в гене АРОЕ, влияющие на его

структуру и стабильность, образуют 3 основных аллеля АРОЕ (Е-2, Е-3 и Е-4) [138].

Лицам с аллелем АРОЕ4 характерен повышенный захват ХС в кишечнике, рост концентрации ХС в гепатоцитах и выделение его в желчь; увеличивается риск формирования сахарного диабета, ишемической болезни сердца, дислиппротеинемии, гипертонической болезни, которые ассоциированы с развитием холелитиаза [85, 145]; отмечается семейная предрасположенность к ЖКБ [131].

Аллель АРОЕ-4 часто встречается у больных ЖКБ, которые живут в Испании, Германии, Голландии; у них имеют место высокие уровни ХС в холелитах, повышение процессов кристаллизации ХС в желчи, нуклеации, а также возникновения конкрементов после нехирургического лечения холелитиаза [85].

Индивидам с аллелем АРОЕ-2 характерен низкий уровень захвата ремнантов печенью и семейная дисбеталипопротеидемия, которая вызвана нарушением катаболизма хиломикрон и ЛПОНП [110, 121, 205].

2) Дефект гена АРОВ.

Различают 3 категории нарушения синтеза АРОВ: 1) недостаточная продукция АРОВ в печени, которая сопровождается низким уровнем ХС в сыворотке крови, проявляется в виде гипобеталипопротеинемии; 2) избыточная продукция АРОВ, которая сопровождается повышенной секрецией ЛПНП печенью; проявляется семейной комбинированной гиперлипидемией; 3) секреция мутантного АРОВ, которая обусловлена структурным дефектом гена; проявляется в виде семейной гиперхолестеринемии. Vega G.L. et al. (1990) выявили у некоторых пациентов с высоким ХС ЛПНП нормальное функционирование АРОВ, Е- рецепторов, но медленное выведение из крови собственных ЛПНП [80]. Повреждение в структуре АРОВ связано с заменой глутамина аргинином в положении 3500. Данный дефект встречается у лиц с гиперхолестеринемией во многих странах мира [123].

Ген АРОВ имеет размер 43 кб [168], включает в себя 29 экзонов, находится на 2 хромосоме (2p24-p23) и состоит из нескольких полиморфных сайтов, которые отвечают за вставку или за делецию 9 пар нуклеотидов, кодирующих различные варианты пептидных участков, состоящих из 3-х аминокислот «сигнального пептида» [88]. Была изучена связь *Xba* I полиморфизма в 26 экзоне гена АРОВ [191] с ишемической болезнью сердца [211], инсулиннезависимым сахарным диабетом [140] и холестерозом [167]. Показано, что эти заболевания характеризуются высокими показателями общего ХС, ЛПОНП, АРОВ [143] и низким уровнем ЛПВП [211]. Несколько лет назад был обнаружен полиморфизм insertion/deletion (I/D) гена сигнального пептида АРОВ. В нем присутствует или отсутствует фрагмент из 9 пар нуклеотидов. Выделяют три генетических варианта полиморфизма: гомозиготный – INS/INS, DEL/DEL и гетерозиготный - INS/DEL. Ряд исследователей утверждают, что DEL-аллель и DEL/DEL-генотип связаны с высоким содержанием общего ХС, ЛПНП, АРОВ в крови, а также с риском сердечно-сосудистых заболеваний, а INS-аллель и INS/INS-генотип характеризуются защитными факторами [82, 163]. В Китае у пациентов с холелитиазом чаще выявлялся генотип $X^{+/-}$ и аллель X^{+} *Xba* I полиморфизма гена АРОВ [84].

Семейная гипобеталипопротеинемия, связанная с мутациями гена АРОВ, также может быть связана с возникновением холестериновых камней как компенсаторная реакция выведения ХС, не встроенного в АРОВ-содержащий транспортный комплекс [199].

В 2010 г. в Мексике исследования Sánchez-Cuén J, Aguilar-Medina M. et al. не подтвердили существования статистически значимой связи полиморфного варианта *C-7673T* гена АРОВ-100 с развитием холелитиаза [208].

В России выявлено отсутствие строгого сцепления между полиморфным вариантом INS/DEL гена АРОВ и данной патологией [71].

Установлено, что для пациентов с холелитиазом из Китая X^{+} аллель *Xba* I полиморфизма гена АРОВ является фактором риска развития конкрементов в желчном пузыре после радикальной гастрэктомии [152].

Проведенный мета-анализ 16 исследований из Китая, Чили, Мексики, Индии, Польши, Великобритании установил, что X^+ аллель полиморфизма *XbaI* (-2488C>T) гена АРОВ-100 может быть ассоциирован с высоким риском холелитиаза среди населения Китая, а $X^+ X^+$ генотип гена АРОВ-100 – с низким риском рака желчного пузыря. При изучении полиморфизма *EcoRI* (-4154G>A) и insertion/deletion (I/D) гена АРОВ-100 взаимосвязи данных участков генов с риском формирования ЖКБ не выявлено [178].

1.4.3 Гены, участвующие в кишечной абсорбции холестерина

Семейство АТФ-связанных кассетных (ABC) транспортеров – это белки, участвующие в транспорте липидов и ХС, а отдельные гены этого семейства влияют на процессы метаболизма ХС в организме.

Аденозинтрифосфат-связанный кассетный транспортер типа А1 (ABCA1) является одним из белков (их более 10 видов), которые участвуют в продвижении ХС через двухслойные мембраны. Любые изменения в структуре этих белков могут быть причиной нарушения обратного транспорта ХС [132].

Существуют также белки-транспортеры ABCG5 и ABCG8.

Белки-транспортеры ABCG5 и ABCG8 находятся в печени, кишечнике [153, 204] и эпителиальных клетках желчного пузыря [173]. Одни гены, контролирующие работу этих белков, ограничивают всасывание ХС в кишке, другие - способствуют его выведению с желчью [78].

ABCG5 и ABCG8 регулируют транспорт липидов на различных уровнях. В энтероцитах эти белки тормозят захват ХС, в гепатоцитах - принимают участие в распаде ХС и регулируют его выведение с желчью.

Различные изменения в структуре этих генов приводят к скапливанию липидов в тканях и атеросклерозу, а также к увеличению выведения ХС с желчью [137, 163]. Из 7 форм гена с холелитиазом связана изоформа ABCG5/G8 [109]. Чаще всего изучались полиморфизмы D19H, T400K и Y54C гена ABCG8. Геномное исследование в большой выборке пациентов с ЖКБ в Германии и у чилийских латиноамериканцев выявило самый распространенный вариант

(rs11887534) D19N гепатоканаликулярного транспортера ХС ABCG8, который кодирует печеночную секрецию холестерина, и ABCB4, как генетический фактор риска образования желчных камней [73]. Обнаружено, что только мужчины Китая - носители мутантного аллеля T400K гена ABCG8 - имели повышенный риск развития желчных камней по сравнению с мужчинами с общим генотипом. У женщин же никакой ассоциации не было найдено [210]. Исследуя население Дании, учеными выявлено, что генотип D19N ABCG8 ассоциирован с риском формирования ЖКБ и билиарного рака [187]. Среди населения о. Тайвань обнаружена взаимосвязь формирования холелитиаза у пожилых носителей полиморфизма 604Q гена ABCG5 и у лиц моложе 50 лет с вариантом D19N гена ABCG8 [184].

Выявлено, что наличие конкрементов в желчном пузыре было взаимосвязано с D19N мутантным аллелем гена ABCG8 [130]. А носители мутантного варианта Q604E гена ABCG5, в сравнении с носителями аллеля дикого типа, имели более высокий уровень общего ХС в плазме крови [95].

У носителей аллеля Q604E гена ABCG5 при переходе от диеты с низким содержанием жиров к диете с высоким содержанием жиров в крови установлено повышение показателей ЛПНП по сравнению с гетерозиготами или лицами с аллелем дикого типа [195].

У лиц с аллелем Q604E гена ABCG5 и D19N гена ABCG8 показатели общего ХС и ТГ были выше, чем у носителей мутантного аллеля. Исследователи пришли к выводу, что однонуклеотидные полиморфизмы генов ABCG5 и G8 могут влиять на изменение концентрации липидов в сыворотке крови и насыщение желчи ХС [90].

В результате исследования полиморфизма D19 N гена ABCG8 обнаружено, что как наличие камней в желчном пузыре, так и носительство данного полиморфизма гена были связаны с уменьшением абсорбции ХС в подвздошной кишке [171].

Результаты мета-анализа, объединившего 10 исследований из Дании, Германии, Швеции, Румынии, Чили, Индии и Китая, посвященного поиску

ассоциаций между полиморфными вариантами D19H, T400K, Y54C гена ABCG8 и ЖКБ, показали, что носительство *H* аллеля полиморфизма D19H гена ABCG8 было связано с повышенным риском развития холелитиаза. *K* аллель полиморфизма T400K и *Y* аллель полиморфизма Y54C гена, хотя и в меньшей степени, но также могут быть ассоциированы с ЖКБ [143].

В популяции китайцев показано, что мужчины, носители аллеля *rs4131229*T* гена ABCG5 характеризуются снижением концентрации общего ХС, ЛПВП, ТГ и отношения АРОВА1/АРОВ [96].

Ген, кодирующий печеночную секрецию ХС (ABCG8 19H и ABCB4), представляет собой фактор восприимчивости человека к ЖКБ [73, 135].

В человеческом организме присутствует несколько генов, ответственных за механизмы синтеза и регуляции транспорта ХС, желчных кислот, липопротеинов и солей желчных кислот, в частности это: АРОВ, АРОЕ, ABCB-11, ABCB-4, CCKAR, CETP, CFTR. Моногенный холелитиаз связывают с генами, кодирующими синтез фосфатидилхолина или солей желчных кислот (ABCB-4, ABCB-11 соответственно), холестерин-7 α -гидроксилазы (CYP7A1), холецистокининового рецептора (CCKAR), а также с влиянием гена кистозного фиброза (CFTR) [150].

Подводя итог, можно сделать следующее заключение. Патогенез ЖКБ до конца не ясен. Функциональные нарушения желчного пузыря при ЖКБ характеризуются снижением сократительной функции пузыря. При этом заболевании наблюдается литогенность желчи (перенасыщение желчи ХС).

Изменения в спектре липидов крови при ЖКБ связаны с увеличением общего ХС за счет ХС ЛПНП и апобелкового компонента (АРОВ), ответственного за транспорт ХС в клетку. Следствием нарушения обмена липидов, по мнению исследователей, занимающихся данной проблемой, является накопление ХС либо в стенке, либо в полости желчного пузыря [69].

С конца 1980-х гг. проведены исследования ряда авторов для выявления ассоциации различных генов с ЖКБ в различных группах населения. Учитывая патофизиологию формирования камней в желчном пузыре, ЖКБ является

полигенетическим заболеванием, так как большое количество генов участвуют в гомеостазе ХС - основного компонента конкрементов [188].

Все вышесказанное обосновывает актуальность выбранного направления и целесообразность проведения дальнейших исследований для выявления роли генетических факторов в развитии ЖКБ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

При изучении распространенности ЖКБ в Республике Башкортостан использовались данные Комитета государственной статистики по Республике Башкортостан, Медицинского информационно-аналитического центра Минздрава Республики Башкортостан за период с 2005 по 2016 гг.

В основе клинико-генетического анализа положены результаты исследования 367 человек. 195 пациентов с ЖКБ (К 80) с клиническими проявлениями в стадии обострения в возрасте от 21 до 87 лет (средний возраст $56,1 \pm 0,9$ года) были разделены на 2 группы. 1 группу составили 115 больных, которым был выставлен диагноз (К 80.1) Хронический калькулезный холецистит в стадии обострения (ХКХ) (возраст от 23 до 84 лет, средний возраст $54,1 \pm 1,2$ года, из них мужчин – 21 (18%), женщин – 94 (82%). 2 группу - 80 пациентов с диагнозом (К 80.0) Острый калькулезный холецистит в стадии обострения (ОКХ) (возраст от 21 до 87 лет, средний возраст $58,9 \pm 1,6$ лет, из них мужчин – 26 (33%, женщин – 54 (67%). Больные, входившие в исследование, имели различную этническую принадлежность (96 русских, 86 татар и 13 метисов) и были госпитализированы в гастроэнтерологическое и хирургическое отделения ГKB № 21 г. Уфа. Соотношение мужчин и женщин в общей группе больных ЖКБ составило 1:3, в 1-ой - 1:4 во 2-ой – 1:2. Популяционную контрольную группу составили 172 человека в возрасте $67,2 \pm 0,88$ лет, из них мужчин – 51 (30%), женщин – 121 (70%) человек различной этнической принадлежности (82 русских, 85 татар и 5 метисов).

Диагноз ЖКБ, ХКХ и ОКХ устанавливался в соответствии с МКБ-10:

К 80 Желчнокаменная болезнь (холелитиаз)

К 80.0 Камни желчного пузыря с острым холециститом

К 80.1 Камни желчного пузыря с другим (хроническим) холециститом.

Согласно последним рекомендациям Российской гастроэнтерологической ассоциации и Европейской ассоциации по изучению болезней печени от 2016 года

в исследование были включены пациенты с ЖКБ с клиническими проявлениями, разделенные на 1 группу без осложнений (с ХКХ) и 2 группу с осложнением (с ОКХ).

В клинической картине у пациентов с ХКХ отмечались приступы желчной колики, имеющие стертый характер и повторяющиеся достаточно часто с диспепсическими явлениями, запорами, а у больных с ОКХ - приступ интенсивной нарастающей билиарной колики продолжался более 5-6 часов, становился более разлитой, захватывая правое подреберье, с повышением температуры до 38–39 °С, тошнотой, рвотой, болью и болезненностью при пальпации правого верхнего квадранта живота (симптом Мерфи). В общем анализе крови при ХКХ отмечался умеренный лейкоцитоз, без выраженных изменений биохимических показателей, при ОКХ выявляли лейкоцитоз (обычно в пределах $10\text{--}25 \times 10^9/\text{л}$ со сдвигом лейкоцитарной формулы влево), в биохимическом анализе - умеренная гипербилирубинемия (общий билирубин менее 25,5 мкмоль/л, прямой — менее 5 мг/дл) и повышение уровня трансаминаз. По данным УЗИ ХКХ характеризовался утолщением стенки желчного пузыря больше 3-4 мм, уплотнением и наличием четких контуров стенки пузыря, снижением эхогенности и наличием конкрементов с акустической тенью. ОКХ подтверждался, прежде всего, острым нарушением желчеоттока, быстрым развитием воспаления в стенке желчного пузыря: увеличением толщины и удвоением контура стенки желчного пузыря более 4-5 мм, «ультразвуковым симптомом Мерфи», скоплением жидкости около него, пристеночной негетогенностью, наличием в полости гноя (при эмпиеме желчного пузыря).

Основным критерием включения больных в исследование было наличие камней в желчном пузыре с хроническим (К 80.1) и острым холециститом (К 80.0).

Критериями исключения были: холецистолитиаз без холецистита (К 80.2), камни желчного протока (К 80.3-80.5), другие формы холелитиаза (К 80.8), другие болезни желчевыводящих путей и его подрубрики (К83), холецистит без камней и его подрубрики (К 81), другие болезни желчного пузыря и его подрубрики (К 82),

острый панкреатит, функциональная диспепсия, синдром раздраженного кишечника.

Более 78% пациентов с ХКХ отмечали длительность течения ЖКБ до $5 \pm 1,7$ лет, а 80% больных из 2 группы – более $5 \pm 4,3$ лет.

Отягощенная наследственность по ЖКБ среди обследованных нами лиц отмечалась в 43% случаев, при этом у женщин – в 8,3 раз чаще, чем у мужчин (89,1% и 10,4%, соответственно). Холелитиаз прослежен в родословных по линии матери в 82,7% семей в 1 группе и в 78,3% во 2 группе, по линии отца - в 9,5% в 1 группе и в 2,3% во 2 группе, по линии отца и матери - в 6,3% в 1 группе и в 5,9% во 2 группе. Собственные данные демонстрируют преобладание множественного холецистолитиаза (76,8%), особенно среди женщин (90,7% в 1 группе больных и 89,1% во 2 группе). Билиарный сладж с единичными конкрементами чаще выявлен у мужчин (6,3% с ХКХ и 43% с ОКХ), чем у женщин (2% с ХКХ и 6,5% с ОКХ). Средний диаметр единичных камней составил $3,4 \pm 1,9$ мм с ЖКБ (у женщин $-4,9 \pm 0,1$ мм, у мужчин – $1,7 \pm 1,3$ мм).

Из 115 пациентов с ХКХ 98 была проведена лапароскопическая холецистэктомия в плановом порядке, 17 больным - консервативная терапия. В группе пациентов с ОКХ 74 обследуемым была сделана лапароскопическая холецистэктомия, а 6 - м проводилась консервативная терапия.

Группу пациентов для оценки нарушения метаболизма липидов при ЖКБ составили 68 человек с данной патологией, из них 1 - составили 27 больных (24 женщины и 3 мужчин) с ХКХ, средний возраст $45,4 \pm 2,4$ лет; 2 группу - 41 пациент (26 женщин и 15 мужчин) с ОКХ, средний возраст $45,5 \pm 2,5$ лет и 22 – популяционный контроль.

Была изучена структура 25 желчных камней (7 конкрементов больных 1 группы и 18 – 2 группы), удаленных хирургическим путем по медицинским показаниям больных холелитиазом. Размер камней достигал от 2 до 5 мм. Внешний вид исследованных камней приведен на рисунке 1.



Рисунок 1 - Внешний вид желчных камней

2.2. Методы исследования

Диагностику ЖКБ проводили на основании жалоб, анамнеза, объективного осмотра, общеклинического обследования (общий анализ крови - гемоглобин, лейкоциты, ультразвуковое исследование желчного пузыря, также был проанализирован липидный (общий ХС, ЛПНП, ЛПВП, ТГ), биохимический (билирубин общий и связанный, печеночные ферменты, щелочная фосфатаза) профили сыворотки крови пациентов).

При ультразвуковом исследовании желчного пузыря оценивались: толщина стенки, объём жёлчного пузыря, средний диаметр желчных камней.

2.2.1 Методы изучения структуры и свойств желчных камней

Методика приготовления шлифов

Для того, чтобы провести исследование структуры камней, образцы предварительно закрепляли в эпоксидной электропроводной смоле с помощью горячего прессования. Затем конкременты подвергали шлифованию на кругах различной зернистости с постепенным уменьшением размера абразивного зерна шлифовального круга. После этого образцы подвергали химическому травлению в соляной кислоте HCl на 5-10 секунд, тщательно промывали в дистиллированной воде и высушивали на воздухе.

Методика приготовления порошка

Порошки получали, постепенно перетирая слои желчных камней с каждой области. Отмечалось четкое различие областей конкрементов по цвету:

центральная - черного цвета, промежуточная - коричневого и периферическая желто-коричневого цвета. С центральной области из-за малого объема и неправильной формы центра камня порошок получить не удалось. В итоге доза порошка с центральной и промежуточной областей и порошок с периферической области составил около 0,5 г.

Методика микроскопического анализа

Микроструктура камней изучалась с помощью оптического микроскопа Axiovert 100A и растрового электронного микроскопа JSM-6400 при напряжении 20 кВ в режиме вторичных электронов. Предварительно для придания электропроводности образцам желчных камней на поверхность шлифа было нанесено платиновое напыление.

Методика рентгеноструктурного анализа

Рентгеноструктурный анализ образцов желчных камней проводили для выявления фазового состава на дифрактометре ДРОН-4-07, при этом использовали медное Cu K_α излучение. Размеры щелей: $2/1$ мм, $2/1$ мм, $2/1$ мм; щели Соллера с расходимостью $2^\circ 30'$. Съемку производили в диапазоне брэговских углов $5-50^\circ$. Режим съемки: напряжение 40 кВ, сила тока 30 мА, время экспозиции 4 сек, шаг съемки 0,05 град. Расшифровку дифрактограмм проводили с использованием данных из базы ASTM.

Методика химического анализа

Химический состав отдельных областей образцов желчных камней определяли с помощью микрорентгеноспектральной приставки к растровому электронному микроскопу JSM-6400.

Методика измерения микротвердости

Измерение микротвердости образцов желчных камней проводили на твердомере по методу Виккерса с помощью вдавливания в поверхность шлифа алмазной пирамидки под нагрузкой 10 г. Величину твердости, МПа, определяли

по формуле:
$$HV = \frac{2P \sin \frac{\alpha}{2}}{c^2},$$
 где P – нагрузка, Н; α – угол между

противоположными гранями алмазной пирамиды при вершине, °; c – среднее арифметическое значение длин обеих диагоналей отпечатка, мм.

Методика определения объемной доли фаз

Объемную долю фаз определяли при помощи точечного метода (метод Глаголева), который основан на подсчете числа узловых точек, попавших на фазу, при наложении квадратной сетки.

Объемное соотношение фаз, %, рассчитывали в соответствии с формулой

$$\sum V_{\alpha} = Z_{\alpha} / Z,$$

где Z_{α} – число точек попавших на участки α -фазы; Z – общее число точек.

2.2.2. Исследование липидов сыворотки крови

У всех больных определяли концентрацию липидов в крови: общего ХС, ТГ, ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП и индекса атерогенности с помощью коммерческих наборов Bioson (Германия) на автоанализаторе Labsystem (Финляндия) в клинко-диагностической лаборатории № 1 ГБУЗ УР «Республиканском клинко-диагностическом центре Министерства здравоохранения Удмуртской Республики» (заведующая лабораторией Коваленко Надежда Ивановна, 426009, г. Ижевск, ул. Ленина, д.87б). Референтные значения липидных фракций практически здоровых людей взяты из национальных клинических рекомендаций ВНОК (2011): уровень общего ХС < 5 ммоль/л, ЛПНП < 3 ммоль/л, ЛПВП > 1 ммоль/л (у мужчин) и > 1,2 ммоль/л (у женщин), ТГ < 1,7 ммоль/л, индекса атерогенности < 4. Для определения липидных параметров сыворотки крови забирали утром после 12-часового голодания, центрифугировали и хранили в низкотемпературной камере (–70 °С) в течение 1—3 мес. (до проведения анализов). Индекса атерогенности рассчитывали по формуле Индекс атерогенности = (Общий ХС – ХС ЛПВП)/ХС ЛПВП. Индекс атерогенности в пределах 3,0-4,0 ассоциировался с умеренным, а больше 4,0 – с высоким риском атерогенности [54]. Определение биохимических показателей сыворотки крови проводили в клинко-диагностической лаборатории ГКБ № 21 г. Уфа.

2.2.3 Молекулярно-генетические методы исследования

Молекулярно-генетический анализ ДНК маркеров был проведен в лаборатории кафедры генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВПО «Башкирского государственного университета» (зав. кафедрой - д.б.н., профессор Хуснутдинова Э.К.). На исследования было получено одобрение этического комитета ФГБОУ ВО «Башкирского государственного медицинского университета» Минздрава РФ. От всех пациентов получено письменное информированное согласие на участие в настоящем исследовании.

Учитывая неоднородность населения Республики Башкортостан в этническом отношении, в исследуемые выборки были включены индивиды этнических групп Башкортостана: русских и татар. С целью выявления маркеров повышенного и пониженного риска развития изучаемого заболевания было проведено сравнение частот встречаемости аллелей и генотипов полиморфных ДНК-локусов между больными ЖКБ и здоровыми индивидами соответствующей этнической принадлежности.

Выделение геномной ДНК

Для выделения геномной ДНК из лимфоцитов периферической крови использовали метод фенольно-хлороформной экстракции [151]. 5 мл венозной крови человека отбирали в пробирку, содержащую 0,5 мл 0,5 М раствора ЭДТА (рН 8,0). В таком виде кровь может храниться до 3 суток при температуре 4°C. Для выделения ДНК к 5 мл крови добавляли 30 мл лизирующего буфера (320мМ сахарозы, 1% тритон X-100, 5мМ MgCl₂, 10мМ трис-HCl, рН 7,6), центрифугировали при 4°C и 4000 об/мин. в течение 20 минут. Затем надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли 20 мл лизирующего буфера и центрифугировали при тех же условиях в течение 10 минут. К полученному осадку добавляли 800 мкл буфера Soline ЭДТА (25 мМ ЭДТА, рН 8,0, 75 мМ NaCl). Затем ресуспензировали полученный раствор и переносили его в двухмиллилитровые стерильные пластиковые пробирки, добавляли 80 мкл 10% SDS, 20 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 16

часов. Экстракцию ДНК проводили в три этапа. Сначала раствором забуференного фенола (200 мкл меркаптоэтанола на 50 мл фенола – Трис-HCl, pH 7,8), смесью фенола – хлороформа (1:1) и хлороформом (2 мл изоамилового спирта на 48 мл хлороформа) в равных объемах (1000 мкл) с плавным перемешиванием на ротаторе в течение 10 мин, центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 минут и отбором водной фазы после каждого этапа. ДНК осаждали из раствора раствором охлажденного этанола в соотношении 1:3. Сформированную ДНК промывали 70% раствором этилового спирта, подсушивали на воздухе, растворяли в деионизированной воде и хранили при -20⁰С. Выделенную ДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК. Результатом полимеразной цепной реакции является получение большого количества копий исследуемого фрагмента ДНК (амплификатов). Амплификаты подвергали рестрикции, в результате чего получали нуклеотидные фрагменты различной длины. В зависимости от длины и молекулярной массы нуклеотидные цепочки перемещались на разное расстояние при электрофорезе в полиакриламидном или агарозном геле определенной концентрации.

Постановка ПЦР

При исследовании локусов ДНК использовали ПЦР синтеза ДНК на амплификаторе «GeneAmp PCR System 2720» производства компании «Applied Biosystems» (США). Нуклеотидные замены определяли с помощью метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ). Перечень генов, их полиморфных вариантов, последовательности праймеров, рестриктаз и показатели температуры отжига для каждого из исследованных фрагментов представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Полиморфные варианты, последовательности праймеров, номенклатура аллелей анализируемых ДНК-локусов и условия их анализа

Ген	Полиморф- ный вариант, dbSNP	Последовательность праймеров, 5' – 3' (ссылка)	Рестриктаза, аллели (размер фрагментов п.н.)	Тем- пера- тура отжи- га, °C
<i>APOB-100</i>	7673C>T rs693	GGAGACTATTCAGAAGCT AA GAAGAGCCTGAAGACTGA CT (Jaime S.-C. et al., 2010)	<i>XbaI</i> X-(C) – 710 X+ (T) – 433+277	63
<i>LRPAP 1</i>	I/D rs11267919	GGTGTCTTCTGGACACAAA GGA AGTGTGCGTGGAGCCTAT G (Pandey S.N. et al., 2006)	I – 222 D – 185	61
<i>ABCG5</i>	i7892 T>C rs4131229	ACTTCTGTCTGTGGCTTGC ATT GAAAGAGATTGGAACCTA GAAG (Li Q., et al., 2012)	<i>Hha I</i> T– 203 C – 126+77	60
<i>ABCG8</i>	Asp19His rs11887534	ATGGCCGGGAAGGCGGCA GAGGAGAG ACTTCCCATTGCTCACTCA CCGAGGGAT (Hubacek J.A., 2004)	<i>BamH I</i> C (His) – 83 G (Asp) – 56+27	60

В реакционную смесь для проведения амплификации входили 2,5 мкл 10xTaq-буфера (67 mM трис-HCl (pH 8,8), 16,6 mM (NH₄)₂ SO₄, 2,5mM MgCl₂, 0,01% Tween-20), 0,1 мкг геномной ДНК, смесь dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP по 200 мкМ каждого), 1 ед. ДНК-полимеразы *Termus aquaticus* (производства фирмы «Силекс», г.Москва) и 5-10 пМ локуспецифичных олигонуклеотидных праймеров. Режим амплификации был следующим: предварительная денатурация (94°C, 4 мин), 27-30 циклов амплификации: денатурация – 94°C, 45 сек; отжиг – t°C, 45 сек; синтез – 72°C, 45 сек, завершающий синтез (72°C, 7-10 мин).

Рестрикционный анализ

Нуклеотидные замены определяли с помощью гидролиза амплифицированных фрагментов методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов соответствующей рестриктазой. Данные о рестрикционных участках, названия рестриктаз и длины продуктов расщепления представлены в таблице 1. Рестрикцию полиморфного локуса *7673C>T rs693* гена *APOB-100* проводили с помощью эндонуклеазы рестрикции *XbaI* при температуре 63 °С. ПДРФ-анализ полиморфных вариантов *i7892 T>C rs4131229* гена *ABCG5* и *Asp19His rs11887534* гена *ABCG8* проводили с помощью рестриктаз *Hha I* и *BamH I* соответственно при температуре отжига 60 °С.

Метод электрофореза

После амплификации и рестрикции фрагменты ДНК размером менее 600 п.о. разделяли с помощью электрофореза в 7% полиакриламидном геле (ПААГ) (исходное соотношение акриламида и метиленбисакриламида – 29:1). Электрофорез проводили в 1×ТБЕ буфере (0,089 М трис-НСl; 0,089 М борная кислота; 0,002 М ЭДТА, рН=8,0) при напряжении 300В. Перед тем как нанести на гель пробы смешивали в соотношении 5:1 с краской, содержащей 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксиленцианола и 15% фикола. Фрагменты размером более 500 п.о. разделяли в 2% агарозном геле. Затем окрашивали бромистым этидием и проводили визуализацию в проходящем ультрафиолетовом свете. Результаты электрофореза документировали при помощи видеосистемы «Geldokulant» (Франция).

2.3. Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программного обеспечения MS Office Excel, программы SPSS (версия 16.0). Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$. У всех пациентов перед проведением исследования брали письменное согласие на участие в нем.

При проведении статистической обработки результатов изучения желчных камней рассчитывали погрешности при определении размеров зерен, измеряли микротвердость по следующим формулам:

1. Основным показателем, характеризующим величину или количество параметра структуры, среднюю арифметическую вычисляли по формуле:

$$\bar{a} = \frac{1}{x}(a_1 + a_2 + \dots + a_x),$$

где $a_1, a_2, \dots, a_x$ – значения параметра, x – объем набора измеренных элементов (выборки);

2. Среднее квадратичное отклонение, характеризующее однородность измеряемого параметра по величине или количеству рассчитывали по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^x (a_i - \bar{a})^2}{x - 1}},$$

3. Оценка среднеквадратичного отклонения составляет: $S_{\bar{a}} = \frac{S}{\sqrt{x}}$,

4. Абсолютную погрешность вычисляли по формуле: $\Delta a = t_{x,P} \cdot S_{\bar{a}}$,

где $t_{x,P}$ – коэффициент Стьюдента при доверительной вероятности P (табличное значение);

5. Относительную погрешность определяли по следующей формуле: $\delta = \frac{\Delta a}{\bar{a}} \cdot 100$.

Расчет показал, что относительная погрешность при определении размеров зерен, измерении микротвердости составляет не более 10 %.

При статистической обработке генетических данных нормальность распределения проверялась по критерию Пирсона (χ^2). Различия среднеарифметических величин считали достоверными при $p < 0,05$.

Оценку частоты аллелей рассчитывали по формуле: $p = (2N_1 + N_2)/2N$, $q = (2N_3 + N_2)/2N$, где p – частота аллеля A , q – частота аллеля a , N – общий объем выборки $N = N_1 + N_2 + N_3$, где N_1, N_2, N_3 – численности особей с генотипами AA, Aa и aa , соответственно. Статистическую ошибку оценки частот генотипов

рассчитывали по формуле [6]: $s_p = \sqrt{p(1-p)/N}$, где p – частота генотипа, N – объем выборки.

Для вычисления статистической ошибки частот аллелей использовали формулу: $s_p = \sqrt{p(1-p)/2N}$.

При попарном сравнении частот аллелей и генотипов, полового признака в группах больных и контроля применялся критерий χ^2 для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йейтса на непрерывность.

В случае выявления статистически значимых различий ($p < 0,05$) между исследуемыми группами оценивались показатели отношения шансов (odds ratio, OR) и границы его 95% доверительного интервала (CI 95%) по формуле: $OR = (a \times d) / (b \times c)$, где a – частота аллеля (генотипа) в выборке больных, b – частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке, c – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных, d – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке. Доверительный интервал для показателя соотношения шансов рассчитывали по следующей формуле:

$$OR' = \exp\left(\ln OR - 1.96 \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}\right) \quad \text{и} \quad OR'' = \exp\left(\ln OR + 1.96 \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}\right).$$

Если один из показателей был равен 0, OR вычислялся по формуле: $[(2a+1) \times (2d+1)] / [(2b+1) \times (2c+1)]$ (Schlesselman J., 1982).

Значение $OR=1$ показывало отсутствие ассоциации, значение $OR>1$ рассматривали как положительную ассоциацию заболевания с признаком фактор повышенного риска), $OR<1$ – как отрицательную ассоциацию (фактор пониженного риска).

При проведении мета-анализа результатов по двум группам русских и татар использовали программу WinPepi v.11.32 (Schlesselman J., 1982).

Для того, чтобы рассчитать среднее значение OR и уровень статистической значимости, использовали модели с фиксированным (метод Мантеля-Хензеля) и случайным эффектами (метод Дерсимоняна-Лэйрда). При определении статистической гетерогенности исследуемых групп применяли критерий I^2 (доля изменчивости, обусловленная неоднородностью выборок) (Lou X.Y. et al., 2007).

При значении I^2 менее 30% гетерогенность оценивали как легкую, при I^2 в пределах 30–50 % – как умеренную, а при $I^2 > 50\%$ – как гетерогенную.

Анализ межгенных взаимодействий проводился с помощью программы GMDR (Generalized Multifactor-Dimensionality Reduction). Суть программы заключается в многократном перекрестном пересчете вводимых первичных данных, затем выбирается оптимальная модель ген-генного или ген-средового взаимодействия, которая позволяет с наиболее высокой точностью предсказать человеку наличие или отсутствие предрасположенности к определенному заболеванию. Для каждой из этих моделей определяется сбалансированная точность, которая зависит от чувствительности и специфичности модели, определенными по доле верно и неверно классифицированных моделью случаев при многократных перекрестных проверках.

При оценке количественных клинических показателей применяли средние величины и их стандартные ошибки ($M \pm m$). Сравнивали группы с помощью Т-критерия Стьюдента для независимых выборок и U-теста Манна-Уитни для распределения, отличного от нормального. Затем, для перевода непрерывных значений в дихотомические 0 и 1, итоговые данные подвергали ROC-анализу, чтобы получить оптимальные пороговые значения разделения. С целью вычисления бинарной логистической регрессионной зависимости между полученными значениями использовали полипараметрический анализ, чтобы определить вероятность развития ЖКБ.

Применялась регрессионная модель для оценки взаимосвязи между факторами риска и развитием ЖКБ. В результате корреляционного анализа (таблица 2) получены факторы риска и рассчитаны уравнения линейной регрессии, коэффициенты к показателям основных факторов риска, между которыми установлена достоверная корреляционная связь. Анализ факторов риска проводили с помощью уравнения линейной регрессии.

Таблица 2 - Схема оценки корреляционных связей

Сила связи	Направление связи	
	Прямая(+)	Обратная (-)
Сильная	От +1 до +0,7	От -1 до -0,7
Средняя	От +0,699 до + 0,3	От -0,699 до - 0,3
Слабая	От +0,299 до 0	От -0,299 до 0

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Распространенность желчнокаменной болезни в Республике Башкортостан

По данным Комитета государственной статистики по Республике Башкортостан численность постоянного населения на 1 января 2017 года в Российской Федерации составила 146804,4 тыс. человек, в Республике Башкортостан - 4066972 человек (в 2005 г. – 4081349 человек), среди них 1905144 (46,8 %) мужчин и 2161828 женщин (53,2%). В городе Уфа численность населения составила 1126098 человек (<http://bashstat.gks>).

Согласно данным Министерства здравоохранения Российской Федерации, основными причинами смертности трудоспособного населения в 2016 году являются сердечно-сосудистые заболевания (вклад в смертность – около 47,7 %), новообразования (вклад в смертность – 15,6 %), внешние причины: травмы, отравления, самоубийства (вклад в смертность – 8,1 %), болезни органов пищеварения (вклад в смертность – 5,1 %) (<http://rosminzdrav.ru>). Среди причин смерти в 2016 году наиболее распространенными в Республике Башкортостан также остаются болезни системы кровообращения – 41,4%, новообразования – 13,2%, несчастные случаи (10,1%), далее следуют болезни органов дыхания (5,7%), пищеварения (4,9%) (<http://miac-rb.ru>).

Смертность от болезней пищеварительной системы в Российской Федерации увеличилась с 66,1 в 2014 году до 66,3 в 2016 году на 100 000 человек населения, в Республике Башкортостан с 62,1 в 2014 году до 63,3 на 100 000 человек населения в 2016 году (<http://www.gks.ru>, <http://bashstat.gks.ru>).

При анализе заболеваемости по болезням органов пищеварения на территории Республики Башкортостан за период 2005-2016 гг. отмечено снижение роста общей заболеваемости болезнями органов пищеварения среди детей 0-14 лет в 2016 году на 28,6 %, среди юношей - на 10%. В то же время регистрируется повышение общей заболеваемости по болезням органов

пищеварения среди подростков в 2016 году на 6 %, среди девушек - на 17,3 %, среди взрослого населения - на 14,8 % по сравнению с 2005 годом (рисунок 2).

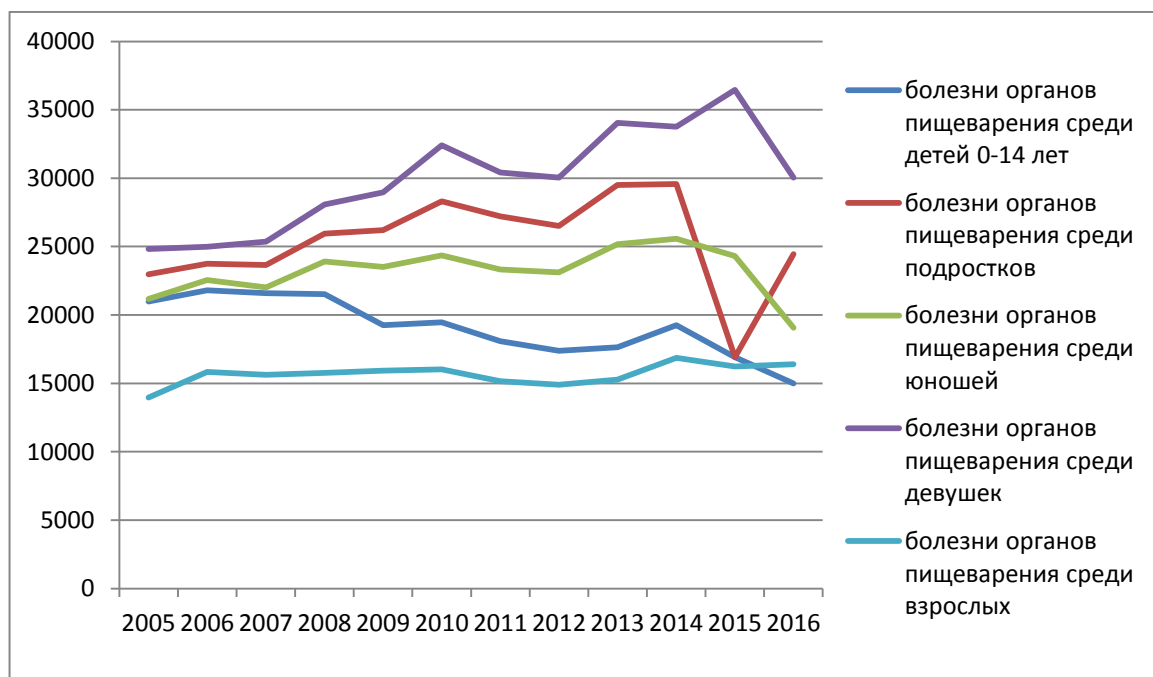


Рисунок 2 - Показатели общей заболеваемости по болезням органов пищеварения по РБ за 2005-2016 гг.

Динамика заболеваемости на территории Республики Башкортостан за период 2005-2016 гг. свидетельствует о повышении показателей общей заболеваемости болезнями желчного пузыря и желчевыводящих путей - среди детей - на 25 %, среди юношей – на 10,8% и по сравнению с 2005 годом. Заболеваемость ЖКБ за отчетный период у детей 0-14 лет выросла – на 7,6%, у девушек - на 5,9%, у взрослых – на 18,6%; хроническим некалькулезным холециститом выросла у девушек – на 2,9%, у взрослых – на 10,4%.

В то же время отмечается снижение роста болезнями желчного пузыря и желчевыводящих путей среди подростков в 2016 году на 8,2 %, среди девушек - на 6,2%, а среди взрослого населения - на 14 % по сравнению с 2005 годом. Также регистрируется снижение общей заболеваемости функциональными болезнями желчевыводящих путей у подростков на 4,3%, юношей - на 8,6% и девушек - на 17,6%, взрослых – на 47,3%; хроническим некалькулезным

холециститом снизилась у детей – на 1,9%, подростков – на 8,2%, юношей – на 20,9 % (рисунок 3).

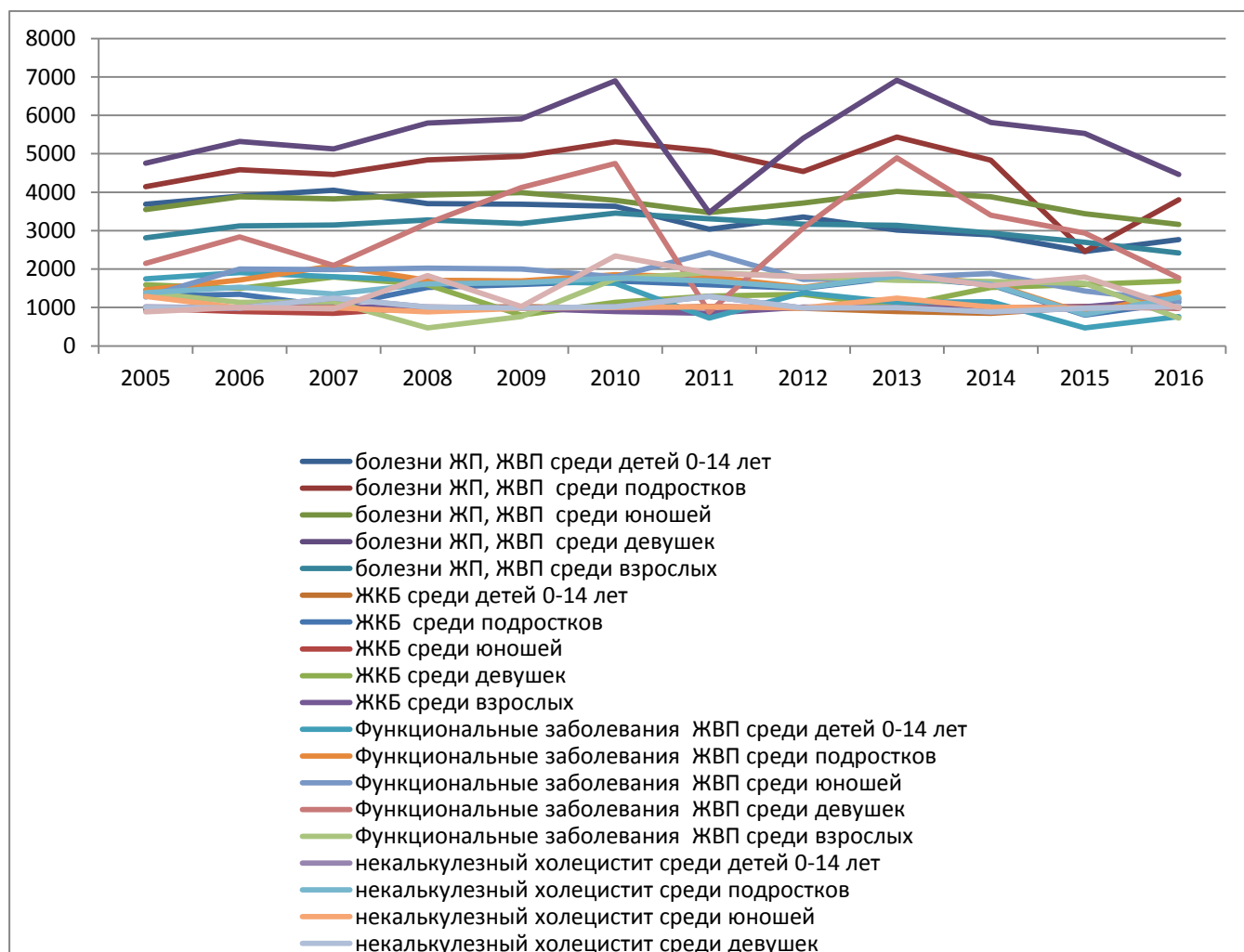


Рисунок 3 - Показатели общей заболеваемости по болезням желчного пузыря и желчевыводящих путей по РБ за 2005-2016 гг.

Анализируя данные о первичной заболеваемости, наблюдалось снижение первичной заболеваемости детей болезнями желчного пузыря и желчевыводящих путей с 1131,7 до 905,5, и юношей - с 976,4 до 759,6 на 100000 населения.

Первичная заболеваемость болезнями желчного пузыря и желчевыводящих путей среди подростков возросла с 1028,5 до 1065,1, среди девушек – в 1,3 раза за период с 2005 по 2016 гг., а среди взрослого населения уменьшилась с 464, 4 чел. на 100 тыс. населения в 2005 году до 303,7 чел. на 100 тыс. населения РБ в 2016 г. Отмечается снижение впервые выявленной заболеваемости ЖКБ среди детей 0-14 лет – на 8,6%, среди подростков - на 29,7%, функциональными болезнями

желчевыводящих путей среди детей – на 35%, среди юношей – на 38,3%, и некалькулезным холециститом среди юношей – на 31,8%. Регистрируется рост первичной заболеваемости ЖКБ среди юношей – на 23,2%, среди девушек – на 29%, среди взрослых – на 29,7%, функциональными болезнями желчевыводящих путей среди подростков – на 24,6%, среди девушек – на 49,7% и среди взрослых – на 33,8%, некалькулезным холециститом – среди детей – на 24,2%, среди подростков – на 11,9%, среди девушек – на 65,9%, среди взрослых – на 44% (рисунок 4).

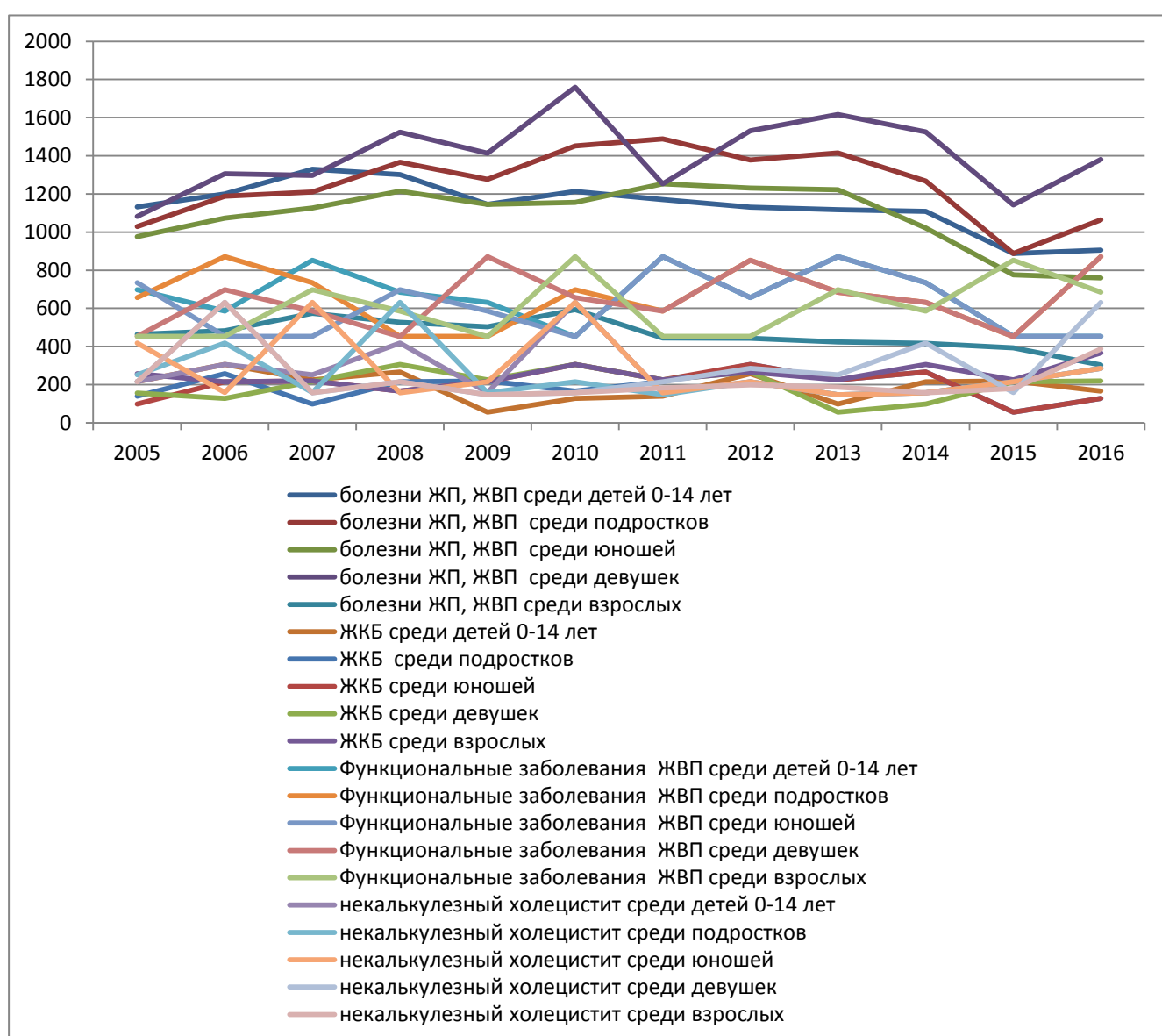


Рисунок 4 - Показатели первичной заболеваемости по болезням желчного пузыря и желчевыводящих путей по РБ за 2005-2016 гг.

Анализ динамики хирургической работы в стационарах РБ за 2005-2016 гг. показывает, что за 12 лет общее количество операций на органах брюшной полости увеличилось на 21,4 %, количество холецистэктомий при калькулезном холецистите возросло в 1,1 раз, при этом летальность уменьшилась на 0,1 % (рисунок 5).

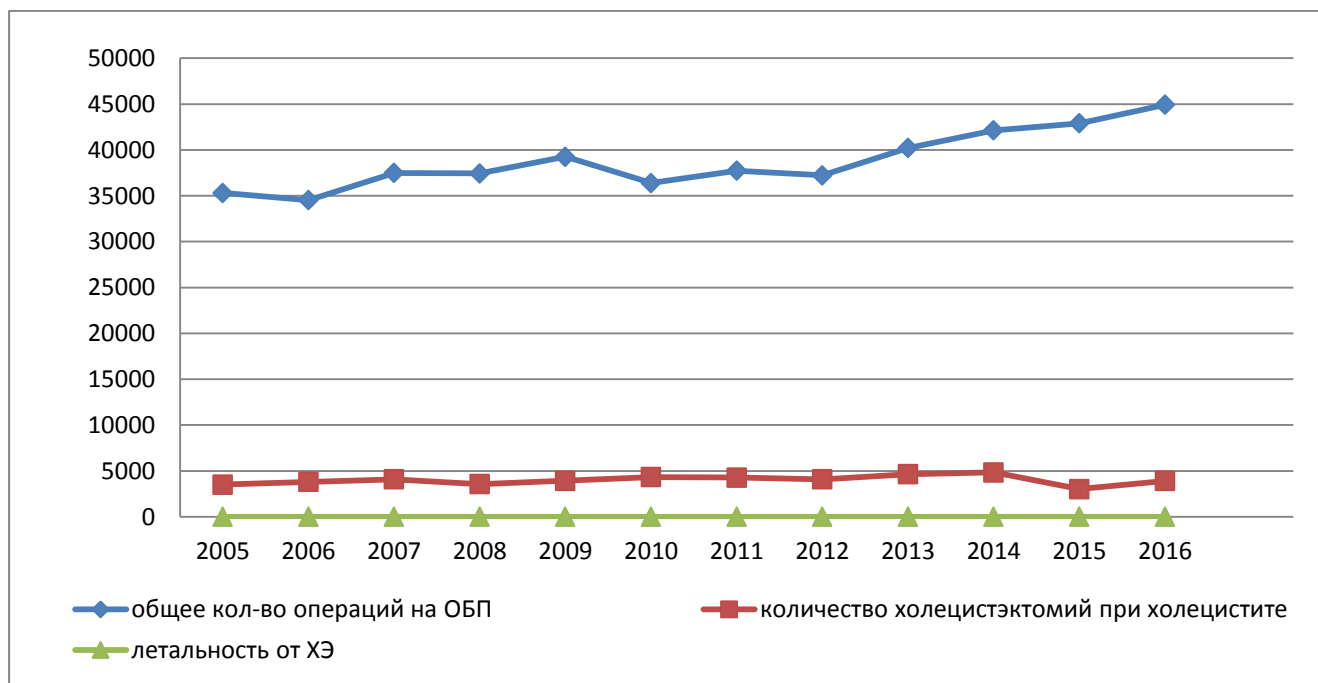


Рисунок 5 - Динамика операций на органах брюшной полости по РБ за 2005-2016 гг.

Таким образом, заболеваемость населения Республики Башкортостан ЖКБ характеризуется высокой распространенностью и постоянно растёт. За двенадцатилетний период выявлен неуклонный рост общей и первичной заболеваемости среди взрослого населения, девушек и подростков болезнями органов пищеварения и ЖКБ. Отмечается рост первичной заболеваемости хроническим некалькулезным холециститом, функциональными заболеваниями ЖВП и ЖКБ среди девушек и взрослых в регионе. Наблюдается рост числа холецистэктомий и снижение летальности за отчетный период. В связи с этим, представляет интерес поиска диагностических аспектов ЖКБ для возможности раннего выявления данной патологии.

3.2 Химический анализ и структура желчных камней, извлеченных после холецистэктомии

По морфологии изучаемые камни относились к граненым, при этом количество граней составляло от 6 до 10. Микроструктура желчного камня приведена на рисунке 7. Как видно, в микроструктуре желчных камней отчетливо выделяются три области: центральная, промежуточная и периферическая, отличающиеся как по цвету, так и по площади (рисунок 6).

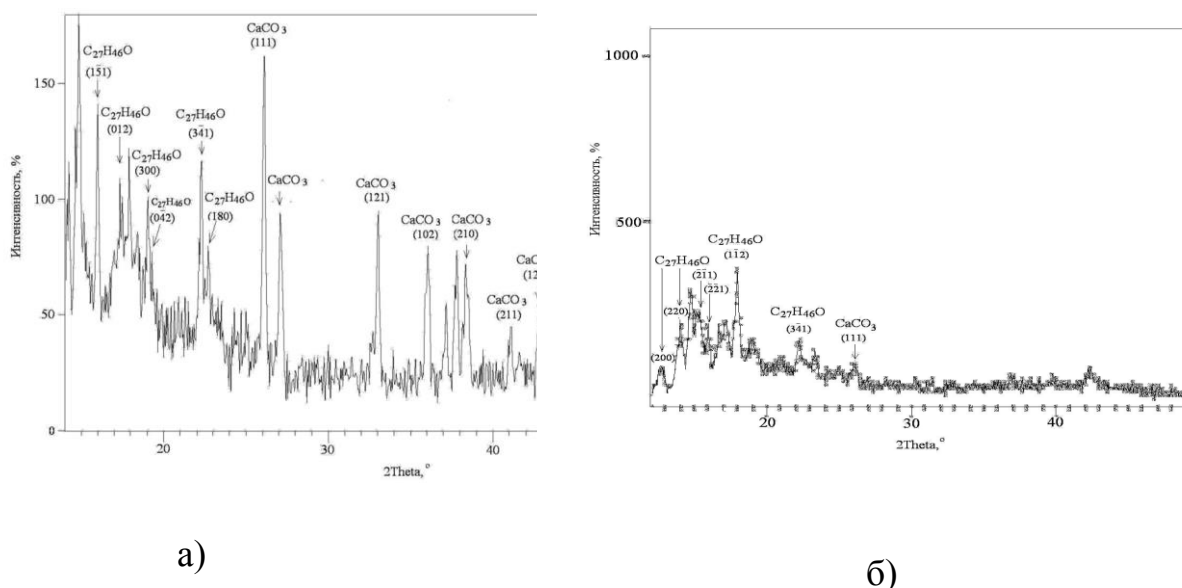


Рисунок 6- Шлиф желчного камня

Центральная область представлена площадью, составляющей около 3-5 % от общей площади сечения камня, и окрашена в черный цвет. Далее за центром следует промежуточная область коричневого цвета, которая охватывает около 70 % площади. Периферическая область желто-коричневого оттенка является наружной оболочкой конкремента и занимает около 25-27 % сечения. Согласно литературным данным, окраска областей зависит от содержания присутствующего в составе желчных камней билирубината кальция, являющегося пигментом, обмена веществ и периодической выработки желчи [8].

1. Фазовый анализ

В результате рентгеноструктурного анализа были получены следующие дифрактограммы: дифрактограмма центральной и промежуточной областей камня (рисунок 7 а) и дифрактограмма периферической области конкремента (рисунок 7 б).



а – центральная и промежуточная области, б – периферическая область

Рисунок 7 - Дифрактограммы от различных областей желчных камней

Имеющиеся на дифрактограммах остроконечные пики свидетельствуют о наличии в составе кристаллических фаз. В результате идентификации было обнаружено, что в состав всех областей желчного камня входят хорошо окристаллизованный безводный холестерин $C_{27}H_{46}O$ и карбонат кальция $CaCO_3$, в частности, арагонит. Но количественное соотношение этих фаз различно. На дифрактограмме периферической области имеется лишь один ярко выраженный пик, соответствующий арагониту. Таким образом, в периферической области по сравнению с другими присутствует незначительное количество $CaCO_3$.

Данные индирования дифрактограмм с желчного камня представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 - Межплоскостные расстояния

Центральная и промежуточная области											
Арагонит $CaCO_3$					Холестерин $C_{27}H_{46}O$						
№	$2\theta, ^\circ$	$d/n, \text{\AA}$	hkl	I, %	№	$2\theta, ^\circ$	$d/n, \text{\AA}$	h	k	l	I, %
1	26,17	3,41	111	100,0	1	14,19	6,22	2	2	0	65,0
2	27,17	3,29		58,0	2	15,46	5,71	-2	-1	1	40,7

Продолжение таблицы 3

Центральная и промежуточная области											
Арагонит CaCO_3					Холестерин $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$						
№	$2\theta, ^\circ$	$d/n, \text{\AA}$	hkl	I, %	№	$2\theta, ^\circ$	$d/n, \text{\AA}$	h	k	l	I, %
3	33,08	2,71	121	58,6	3	16,0	5,55	1	-5	1	78,3
4	36,04	2,50	102	48,1	4	16,91	5,28	-1	5	1	42,9
5	38,33	2,35	210	44,4	5	17,41	5,11	0	1	2	60,6
6	41,17	2,19	211	27,8	6	18,77	4,73	1	1	2	39,4
7	43,01	2,10	122	33,3	7	18,93	4,70	3	0	0	41,6
8	45,83	1,98	040	63,6	8	19,33	4,59	0	-4	2	42,5
9	48,25	1,89	202	44,4	9	22,30	3,99	3	-4	1	64,2
					10	22,70	3,93	1	8	0	43,8

Таблица 4 - Межплоскостные расстояния для периферической области

Периферическая область													
Арагонит CaCO_3							Холестерин $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$						
№	$2\theta, ^\circ$	$d/n, \text{\AA}$	h	k	l	I, %	№	$2\theta, ^\circ$	$d/n, \text{\AA}$	h	k	l	I, %
1	26,15	3,14	1	1	1	11,4	1	12,60	7,07	2	0	0	10,5
2	27,0	3,31				8,0	2	14,10	6,32	2	2	0	22,7
							3	15,38	5,91	-2	-1	1	24,4
							4	16,09	5,55	-2	-2	1	21,6
							5	16,77	5,32	-1	-5	1	21,6
							6	18,10	4,91	1	-1	2	35,8
							7	19,27	4,62	0	-4	2	18,2
							8	21,10	4,21	0	8	0	13,1
							9	22,2	4,02	3	-4	1	17,6

Кристаллографические параметры холестерина и арагонита приведены в таблице 5.

Таблица 5 - Кристаллографические параметры арагонита и холестерина

Фаза	Сингония	$a, \text{\AA}$	$b, \text{\AA}$	$c, \text{\AA}$	$\alpha, ^\circ$	$\beta, ^\circ$	$\gamma, ^\circ$
CaCO_3	ромбическая	4,9614	7,9671	5,7404	90	90	90
$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$	триклинная	14,10	33,75	10,46	94,6	90	95,72

2.Микроскопический анализ

На рисунке 8 а представлена микроструктура, полученная на растровом электронном микроскопе. На различия в плотности структурных элементов указывает контраст, благодаря которому видно, что камень разделен на области. Однако четкая граница центральной и промежуточной областей отсутствует (рисунок 8 б). Как видно, центр камня представляет собой не единое целое, а скопление частиц, которые объединены структурным элементом, не отличающимся по плотности от структурного элемента промежуточной области.

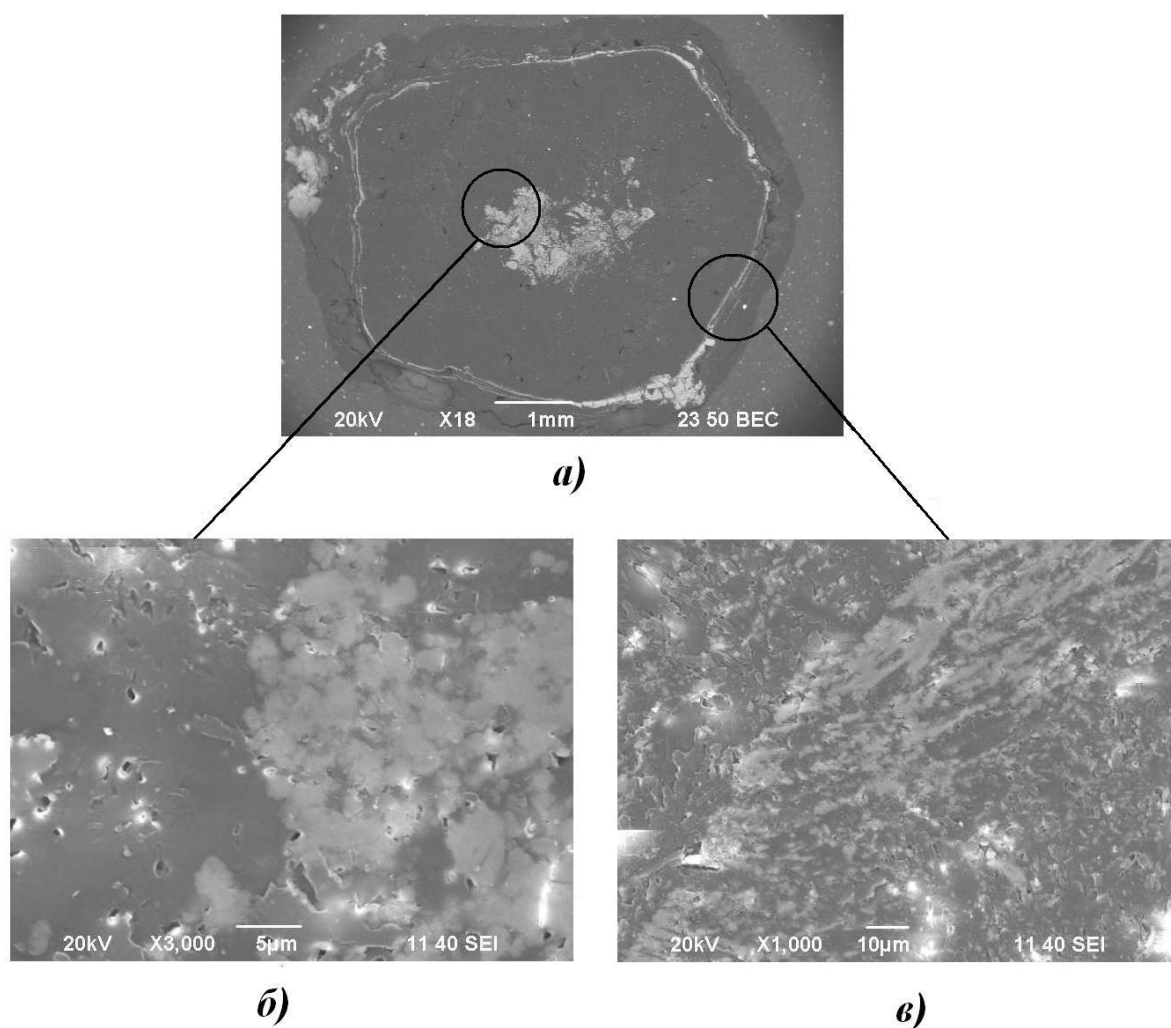
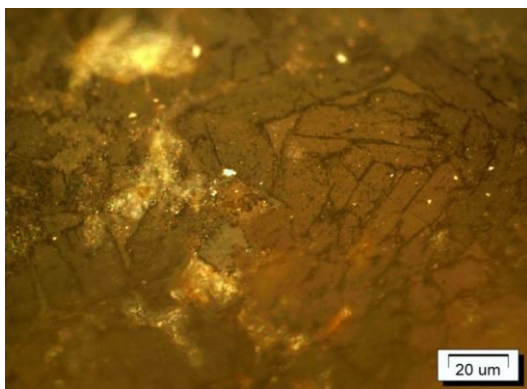
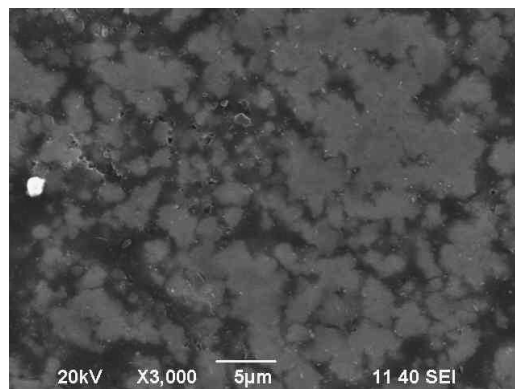


Рисунок 8 - Микроструктура желчного камня (РЭМ)

Микроструктура (рисунок 9 *a*), полученная на оптическом микроскопе, показывает, что центр образца является поликристаллическим и состоит преимущественно из зерен арагонита пластинчатой формы. Длина этих пластин составляет 30-55 мкм, ширина 8-20 мкм. Зерна органической составляющей, в частности, ХС, и, возможно, других органических соединений, имеют неправильную форму, границы являются размытыми.



а)

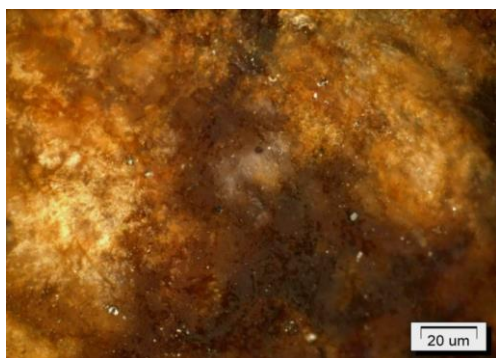


б)

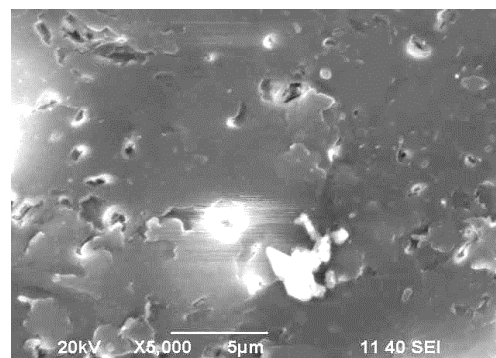
a – структура центра (оптическая микроскопия), *б* – микроструктура центра (РЭМ)

Рисунок 9 - Микроструктура центральной области желчного камня

На микрофотографии (рисунок 9 б), полученной на растровом микроскопе, показана поликристаллическая микроструктура, в которой присутствуют отдельные зерна «хлопьевидной» формы, а также их скопления, являющиеся, возможно, центрами кристаллизации арагонита. Расчет объемной доли показал, что количество данной фазы составляет около 67 %. Размер отдельных зерен достигает 1-2 мкм.



а)

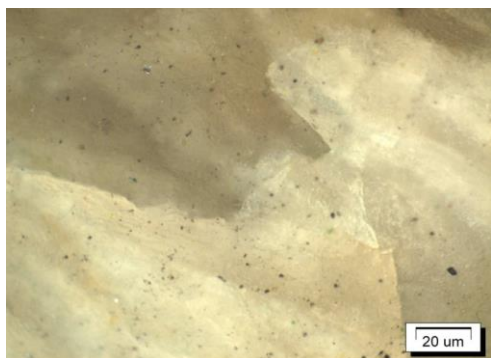


б)

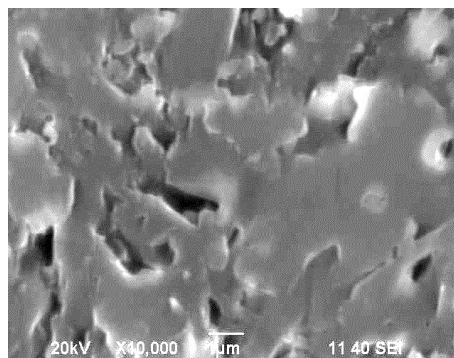
a – структура центра (оптическая микроскопия), *б* – микроструктура центра (РЭМ)

Рисунок 10 - Микроструктура промежуточной области желчного камня

Промежуточная область (рисунок 10) также имеет поликристаллическую структуру, состоящую из зерен ХС и арагонита. Граница зерен нечеткая.



а)



б)

а – структура центра (оптическая микроскопия), б – микроструктура центра (РЭМ)

Рисунок 11 - Микроструктура периферической области желчного камня

Периферическая область (рисунок 11) имеет однородную структуру, в состав которой, согласно результатам рентгеноструктурного анализа, входят преимущественно ХС и незначительное количество арагонита. В структуре также присутствуют мелкие включения и поры.

Результаты микроскопического анализа показали, что исследуемые желчные камни имеют радиально-слоистую структуру с несколькими сросшимися в процессе формирования центрами кристаллизации.

3.Ультразвуковая очистка

Известно, что холестерин растворяется в жирах и органических растворителях, в частности, в ацетоне, бензоле, хлороформе, этаноле, метаноле и др. Для устранения органической составляющей из состава желчного камня был применен метод ультразвуковой очистки. В качестве растворителя был использован этанол. Растворение ХС и, возможно, других присутствующих органических соединений привело к образованию пор, размер которых пор достигает 60 мкм (рисунок 12). Также после очистки более отчетливо проявляются кристаллы арагонита пластинчатой и игольчатой форм. Длина кристаллитов составила 13-19 мкм, ширина 3-9 мкм.

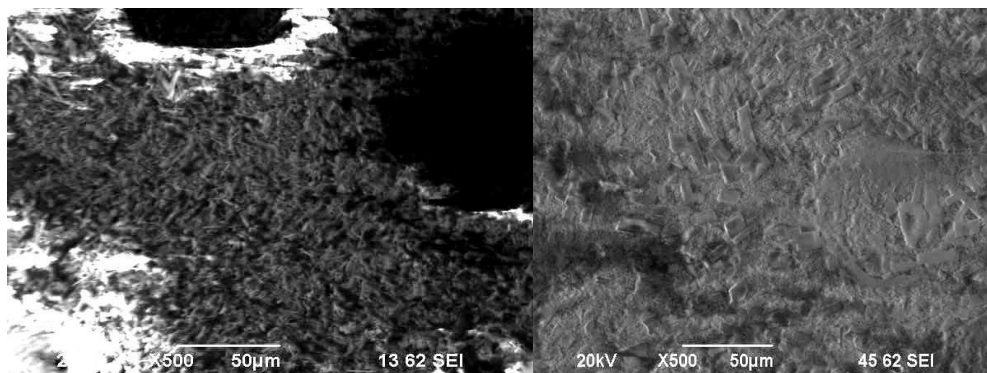


Рисунок 12 - Структура желчного камня после ультразвуковой очистки

4.Химический анализ

В качестве образца для анализа химического состава был использован порошок желчного камня с соответствующих областей конкремента. Результаты анализа показали, что в состав входят такие металлические элементы, как Na, Mg, Si, K, Fe, Zr, Al. Из неметаллических элементов в составе присутствуют C, O, Cl, S, P. Однако при определении углерода и кислорода с помощью приставки к растровому электронному микроскопу имеется возможность лишь качественной оценки содержания данных элементов. Химический состав соответствующих областей желчных камней приведен в таблице 6.

Как видно, центральная область обогащена не только Ca, являющимся одним из основных элементов в составе камней, но и P, что подтверждают данные, представленные в работе [32]. Промежуточная область по сравнению с центральной характеризуется повышенным количеством кальция, резко возрастающим от 25,8 до 83,13 ат.%. В периферийной области наблюдалось уменьшение содержания кальция до 4,63 ат.%. Значения количества Al, Na и Cl в указанной области достигают 16,76; 25,25; 12,46 ат.% соответственно. Атомы Fe могут замещать атомы Ca в решетке арагонита.

Таблица 6 - Химический состав желчных камней в различных областях

№ спектра	Количество элемента (в ат. %)										
	Na	Mg	Si	P	S	Cl	K	Ca	Fe	Zr	Al
1	15.45	2.19	6.84	38.65	1.1	0.62	-	25.8	1.82	2.92	3.13
2	3.47	0.79	2.20	0.96	1.42	0.76	0.76	83.13	0.37	1.09	5.06
3	25.25	-	8.72	8.56	6.59	12.46	13.26	4.63	-	-	16.76

5. Механические свойства

Изучение изменения микротвердости было проведено вдоль наиболее информативных секущих линий (рисунок 13).

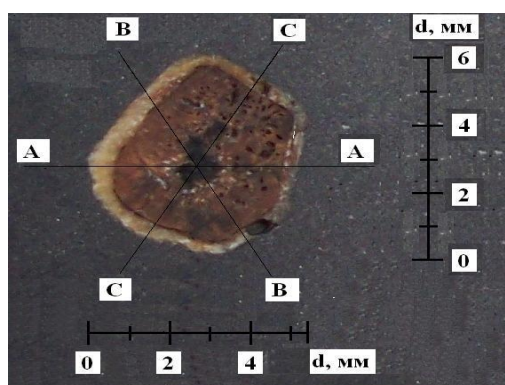


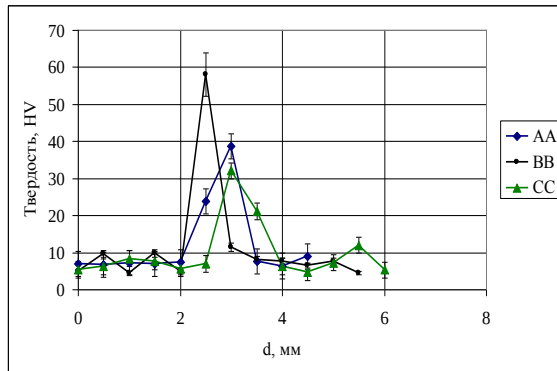
Рисунок 13 - Схема секущих AA, BB и CC

Результаты показали, что высокие значения микротвердости приходились на центральную область: вдоль секущих AA и CC микротвердость была равна 35 HV и 32 HV, соответственно, вдоль BB достигала 58 HV (рисунок 14 а). При удалении от центра образцов их значения уменьшались, причем особой разницы в микротвердости между периферийными и промежуточными областями не наблюдалось.

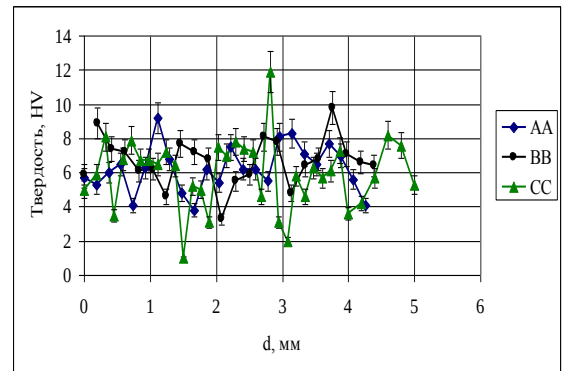
Далее, для удаления центральной области было произведено снятие с шлифа слоя толщиной 1 мм по направлению к краю камня. Полученные значения твердости промежуточной и периферической областей,

представленные на рисунке 14 б, не имели особых отличий и не превышали 12 HV.

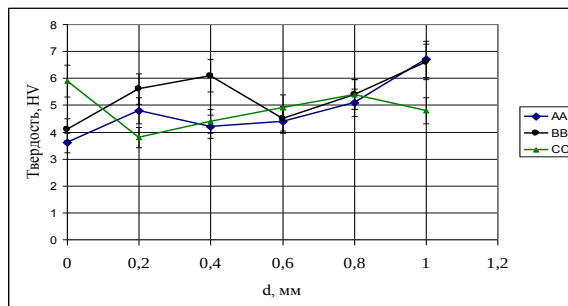
Для проведения измерений твердости только в периферической области со шлифа был снят следующий слой аналогичной толщины. Значения твердости представлены на графике зависимости твердости от расстояния d вдоль секущих (рисунок 14 в) и находятся в интервале 3,6-6,7 HV.



а)



б)



в)

а – зависимость микротвердости камня от расстояния вдоль сечения,

б – микротвердость промежуточной и периферической областей,

в – микротвердость периферической области.

Рисунок 14 - Микротвердость вдоль секущих AA, BB и CC

Результаты проведенной методики твердомерии показали, что твердость желчного камня в центре имеет высокие значения. Это обусловлено тем, что центральная область состоит из кристаллов арагонита с повышенным содержанием металлических элементов. Уменьшение микротвердости в промежуточной области связано с наличием арагонита и ХС. По направлению к периферии камня, состоящей преимущественно из ХС, микротвердость уменьшается.

6. Модель механизма формирования желчного камня

На основе полученных данных была построена модель возможного механизма формирования желчного камня в организме человека, которая представлена на рисунке 15.

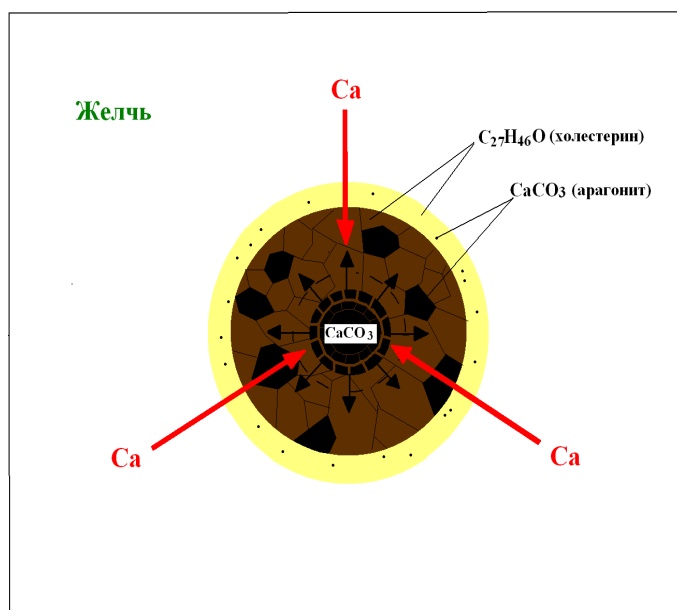


Рисунок 15 - Модель механизма формирования желчного камня

Согласно литературным данным [38], образование желчных камней начинается вследствие взаимодействия несвязанного билирубина $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$, муциновых гликопротеинов в желчи с солями кальция. Это приводит к образованию карбоната кальция, в частности, арагонита, который служит центром кристаллизации. Мы полагаем, что повышенное содержание

металлических элементов в центральной области, вероятно, обусловлено осаждением атомов на готовый центр кристаллизации. Формирование промежуточной области происходит в результате адсорбции ХС на поверхность арагонитного центра. Рост кристаллов арагонита осуществляется благодаря диффузии атомов кальция из желчи через ХС. Таким образом, желчь, окружающая ядро, обедняется кальцием. На конечной стадии формирования вокруг конкремента образуется периферическая область, которая состоит преимущественно из ХС. Структура промежуточной и периферической областей характеризуется наличием пор, благодаря которым осуществляется диффузия атомов как металлических, так и неметаллических элементов, из желчи в формирующийся конкремент.

Таким образом, структура исследованных желчных камней пациентов 1 и 2 группы смешанного типа - радиально-слоистая, разделена на три области (центральную, промежуточную и периферическую). Центральная и промежуточная области образованы скоплением отдельных микросферолитов арагонита и органических веществ. Периферическая - состоит из безводного ХС и незначительного количества арагонита. В процессе формирования желчного камня, вероятно, образуются центры кристаллизации из арагонита и происходит рост арагонитных кристаллов в радиальном направлении.

3.3 Клинические особенности хронического и острого калькулезного холецистита

Полученные в нашем исследовании данные свидетельствуют, что различные факторы влияют на возникновение и развитие ЖКБ. Анализ состава групп больных по постоянным факторам (таблица 7) свидетельствует, что холелитиаз чаще встречался у женщин (75,9%), причем с ХКХ - в 82% случаях, а с ОКХ – в 67,5%. Соотношение мужчин и женщин в группе больных ЖКБ составило 1:3, в 1 группе - 1:4, во 2 группе – 1:2.

Увеличилась частота встречаемости ЖКБ с возрастом в обеих группах пациентов, причем у лиц старше 60 лет достоверно ($p<0,05$) чаще регистрировался ОКХ - в 53 %.

Полученные результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Характеристика влияния постоянных факторов на развитие ЖКБ, n (%)

Признаки	Заболевание			Контроль
	ЖКБ	ХКХ	ОКХ	
Пол				
Мужской	47 (24)	21 (18)	26 (33)	51 (30)
Женский	148 (76)	94 (82)*	54 (67)	121 (70)
Возраст				
20-29 лет	6 (3)	4 (3)	3 (4)	6 (3)
30-39 лет	25 (13)	15 (13)	10 (12)	32 (19)
40-49 лет	25 (13)	17 (15)	8 (10)	25 (14)
50-59 лет	55 (28)	38 (33)	17 (21)	53 (31)
>60 лет	84 (43)	41 (36)	42 (53)*	56 (33)

* различия между группами по сравнению с контролем с уровнем значимости $p<0,05$

При анализе частоты изменчивых факторов (таблица 8) выявлено, что в анамнезе 3 и более беременности, как фактор риска развития заболевания, наблюдались у 73 женщин (49%) с ЖКБ, у 54 (57%) пациенток - с ХКХ, а у 35 (65%) пациенток с ОКХ - до 3 беременностей. В исследовании выявлено, что у больных холелитиазом в 4,6 раз чаще встречалась многократная беременность, чем в контроле ($p<0,05$). У больных в 1 группе в 2,48 раз чаще встречалась многократная беременность, чем у пациентов во 2 группе ($p<0,05$). В 1 группе число женщин в периоде менопаузы составило 77 человек (67%), во 2 группе – 40 человек (74%).

Достаточно часто ЖКБ протекала на фоне сопутствующей сердечно-сосудистой патологии (гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения): 38 (33%) случаев - в 1 группе, 8 (10%) случаев - во 2. У лиц с ХКХ сердечно-сосудистые заболевания встречались в 4,44 раза чаще, чем у больных ОКХ ($p<0,05$). Сопутствующий хронический паренхиматозный панкреатит чаще встречался у больных с ОКХ ($p<0,05$), чем у индивидов с ХКХ. Сахарный диабет был зарегистрирован у 13% пациентов в 1 группе и у 22,5% больных во 2 группе ($p<0,05$).

Таблица 8 - Характеристика влияния изменчивых факторов на развитие ЖКБ, n (%)

Признаки		Заболевание			Контроль
		ЖКБ	ХКХ	ОКХ	
Данные анамнеза заболевания	Количество беременностей:				
	0-2	43 (29)	40 (43)	35 (65)	109(83)
	3 и более	73 (49)*	54 (57)*	19 (35)	23(17)
	Менопауза	132(89)	77 (67)	40(74)	34 (20)
Сопутствующие заболевания	Хронический панкреатит	142(73)	64 (56)	78 (97)*	0
	Сахарный диабет	33 (17)	15 (13)	18(22,5)*	5 (3)
	Патология сердечно-сосудистой системы (гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения)	46 (24)*	38 (33)*	8 (10)	0
Клиническое	Боли в животе	187(96)	107(93)	80 (100)	0
	Горечь во рту	83 (43)	60 (52)	23 (29)	0
	Метеоризм	87 (45)	77 (67)*	10(12,5)	0

Продолжение таблицы 8

Признаки		Заболевание			Контроль
		ЖКБ	ХКХ	ОКХ	
Клинические признаки	Запоры	96 (49)	85 (74)*	11(14)	0
	Тошнота, рвота	112(57)	36 (31)	76 (95)*	0
	Нормальная масса тела, ИМТ=18,5-24,9 кг/м ²	84 (43)	42 (36)	42 (52)	120 (69,8)
Индекс массы тела	Избыточная масса тела, ИМТ=25-29,9 кг/м ²	66 (34)	35 (30)	31 (39)	48 (27,9)
	Ожирение 1 ст., ИМТ= 30-34,9 кг/м ²	31(16)	25 (22)	6 (8)	3 (1,7)
	Ожирение 2 ст., ИМТ=35-39,9 кг/м ²	11(6)	10 (9)	1 (1)	1 (0,6)
	Ожирение 3 ст., ИМТ=40 и более кг/м ²	3 (1)	3 (3)	0	0
	Всего больных с ИМТ > 25 кг/м ²	111(57)*	73 (63)*	38(47,5)	52 (30)

* различия между группами по сравнению с контролем с уровнем значимости $p < 0,05$

В клинической картине преобладали боли в животе среди больных ЖКБ в 186 (95%) случаев (у 106 (92%) больных в 1 группе и у 80 (100%) – во 2-й).

Среди больных 1 группы 11 (9%) пациентов отмечали нечастые (1–3 раза в год), непродолжительные (не более 30–40 мин), легко купируемые болевые приступы, 40 (35%) больных - умеренные боли и диспепсические явления (горечь во рту, метеоризм и запоры) в межприступном периоде, 20 (17%) больных - частые (1–2 раза в месяц), быстро купирующиеся приступы, 17(15%) больных - продолжительные, трудно купирующиеся приступы, которые сопровождались вегетативными реакциями, 18(16%) больных - частые, продолжительные, длящиеся часами болевые приступы, с короткими периодами ремиссии, сопровождающимися ознобом, лихорадкой, желтухой.

У всех больных 2 группы наблюдались продолжительные (более 6 ч) боли, достигающие максимума в течение 20–30 мин, острые, интенсивные, нетерпимые, жгучие, распирающие, сжимающие, схваткообразные боли в эпигастрии и правом подреберье, с появлением локальной болезненности, защитного напряжения мышц, лихорадки и лейкоцитоза с тошнотой и рвотой.

Ожирение является широко распространенным неблагоприятным фактором риска холелитиаза. Среди обследованных нами больных масса тела, превышающая нормальные показатели, выявлена у 57% индивидов с ЖКБ ($p < 0,05$), причем у больных с ХКХ чаще, чем с ОКХ ($p < 0,05$). Ожирение 1 ст. ($30-34,9 \text{ кг/м}^2$) было у 25, ожирение 2 ст. ($35-39,9 \text{ кг/м}^2$) - у 10, ожирение 3 ст. - у 3 (40 и более кг/м^2) человек в 1 группе пациентов. Для больных 2 группы эти цифры составили: ожирение 1 ст. - у 6 больных, ожирение 2 ст. - у 1 пациента.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что дифференциальными клиническими характеристиками пациентов с ХКХ являются: из постоянных факторов - женский пол, а из изменчивых - 3 и более беременности, наличие среди сопутствующей патологии сердечно-сосудистых заболеваний и избыточная масса тела.

ОКХ клинически выражался у лиц в возрасте старше 60 лет (постоянные факторы), с наличием сопутствующего хронического панкреатита, сахарного диабета, отмечающих тошноту, рвоту.

Липиды сыворотки крови принимают участие в развитии заболевания. Нами проведен анализ содержания общего ХС, ЛПВП, ЛПНП, ТГ, индекса атерогенности при ЖКБ (таблица 9).

Таблица 9 - Показатели липидов крови ($M \pm m$) больных ЖКБ

Показатели (ммоль/л)	Больные ХКХ (n=27) (1 группа)	Больные ОКХ (n=41) (2 группа)	Контроль (n=22)
Общий ХС	$5,73 \pm 0,25^*$	$5,47 \pm 0,16^*$	$4,17 \pm 0,20$

Продолжение таблицы 9

Показатели (ммоль/л)	Больные ХКХ (n=27) (1 группа)	Больные ОКХ (n=41) (2 группа)	Контроль (n=22)
ЛПВП	1,13 ± 0,04*	1,11 ± 0,05*	1,38±0,12
ЛПНП	3,65 ± 0,18	2,88 ± 0,14*	2,35±0,14
ТГ	1,74 ± 0,14	1,23 ± 0,07	0,84±0,07
Индекс атерогенности	4,11 ± 0,19	4,22 ± 0,21	2,18±0,15

Примечание: по сравнению с контролем * $p < 0,05$

Оценивая уровень ХС в крови пациентов, выявлено, что пациенты с ХКХ достоверно имели более высокие показатели, чем больные с ОКХ (ХС при ХКХ колебался от 3,24 до 8,68 ммоль/л и составил $5,73 \pm 0,25$ ммоль/л ($p < 0,05$)). У больных во 2 группе больных уровень ХС колебался от 3,06 до 9,75 ммоль/л и составил $5,47 \pm 0,16$ ммоль/л ($p < 0,05$)).

При анализе уровня ЛПВП выявлено, что у пациентов с ХКХ (от 0,73 до 1,48 ммоль/л и составил в среднем $1,13 \pm 0,04$ ммоль/л ($p < 0,05$)) и ОКХ (от 0,49 до 2,10 ммоль/л и составил $1,11 \pm 0,05$ ммоль/л ($p < 0,05$)) был статистически значимо зарегистрирован ниже оптимального уровня.

Уровень ЛПНП у больных в 1 группе был выше референтных величин: колебался от 1,72 до 5,15 ммоль/л и составил в среднем $3,65 \pm 0,18$ ммоль/л. У больных во 2 группе уровень ЛПНП колебался от 1,22 до 4,79 ммоль/л, в среднем $2,88 \pm 0,14$ ммоль/л ($p < 0,05$) и статистически значимо не превышал показателей нормы.

Проводя анализ содержания ТГ в сыворотке крови, у пациентов с ХКХ он был зарегистрирован выше оптимальных значений, колебался от 0,74 до 3,54 ммоль/л и составил в среднем $1,74 \pm 0,14$ ммоль/л, у больных с ОКХ - от 0,41 до 2,25 ммоль/л и составил в среднем $1,23 \pm 0,07$ ммоль/л, и не превышал референтных значений.

При определении индекса атерогенности у пациентов в 1 группе его показатель составил в среднем $4,11 \pm 0,19$, умеренный риск атеросклероза установлен в 11 % случаев (3 больных). ИА у больных с ОКХ был выше по

сравнению с 1 группой, колебался от 1,8 до 6,84 и составил $4,22 \pm 0,21$, в 27 % (11 пациентов) определялся высокий риск и в 15 % (6 пациентов) – умеренный риск атеросклероза.

Анализируя содержание ХС, ТГ, липопротеинов, установлено, что среди пациентов 1 группы чаще выявлялись 2 А и 2 Б типы гиперлипидемий - в 30% (8 человек) и 22% (6 человек) случаев соответственно, 4 тип установлен в 15 % (4 пациента), 3 тип – в 11 % (3 пациента) случаев. Во 2 группе у пациентов чаще встречались 2 А, 4 типы в 27 % (11 человек) и 15% (6 человек) случаев, соответственно, и 2 Б тип - в 7,3 % (3 пациента) случаев.

На основании корреляционного анализа были выбраны факторы риска развития заболевания, между которыми установлена достоверная корреляционная связь. В целом при ЖКБ выявлена средняя положительная корреляция между ТГ и индексом массы тела ($r=0,38$, $p=0,003$), ТГ и многократной беременностью ($r=0,31$, $p=0,048$), индексом атерогенности и ХС ($r=0,36$, $p=0,005$), а также средняя обратная ассоциация между ЛПВП и ХС ($r=-0,44$, $p=0,0006$). Установлена в 1 группе средняя положительная корреляция между билирубином и многократной беременностью ($r=0,31$, $p=0,002$), ТГ и индексом массы тела ($r=0,43$, $p=0,033$) и средняя обратная корреляция между ЛПВП и ХС ($r=0,48$, $p=0,015$). Во 2 группе больных обнаружена средняя положительная корреляция между ЛПНП и ХС ($r=0,62$, $p=0,0003$), средняя обратная взаимосвязь между ЛПВП и ХС ($r=-0,45$, $p=0,008$), слабая положительная корреляция между билирубином и ХС ($r=0,37$, $p=0,0005$) (таблица 10).

Таблица 10 - Корреляция между факторами риска желчнокаменной болезни и лабораторными показателями

Факторы риска	1 группа	2 группа	ЖКБ
Билирубин и многократная беременность	0,31 ($p=0,002$)	0,16 ($p=0,47$)	0,261 ($p=0,015$)

Продолжение таблицы 10

Факторы риска	1 группа	2 группа	ЖКБ
ТГ и индекс массы тела	0,43 (p=0,033)	0,13 (0,47)	0,38 (p=0,003)
ЛПВП и ХС	-0,48 (p=0,015)	-0,45 (p=0,008)	-0,44 (p=0,0006)
Билирубин и ХС	0,17 (p=0,100)	0,37 (p=0,0005)	0,07 (p=0,57)
ЛПНП и ХС	0,10 (p=0,23)	0,62 (p=0,0003)	0,36 (p=0,10)
ТГ и многократная беременность	0,23 (p=0,29)	0,12 (p=0,62)	0,31 (p=0,048)
Возраст и билирубин	0,20 (p=0,37)	0,14 (p=0,19)	0,15 (p=0,027)
Индекс атерогенности и ХС	0,33 (p=0,11)	0,15 (p=0,31)	0,36 (p=0,005)

Другие многочисленные эпидемиологические исследования также выявляли взаимосвязь между нарушением обмена липидов в плазме крови и ЖКБ, особенно со снижением уровня ЛПВП и повышением уровня ЛПНП и ТГ [43].

Таким образом, у многорожавших женщин с избыточной массой тела, имеющих сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания, ЖКБ чаще протекает в виде ХКХ с гиперхолестеринемией, метеоризмом и запорами.

У лиц в возрасте старше 60 лет с сопутствующими хроническим панкреатитом, сахарным диабетом, ЖКБ протекает в виде ОКХ с нормотриглицеридемией, тошнотой, рвотой.

3.4. Особенности ассоциации полиморфных вариантов генов аполипопротеина В-100, белка липопротеинового рецептора, транспортеров холестерина с желчнокаменной болезнью

В развитии ЖКБ играют роль различные факторы. В обмене ХС, который является основной составной частью конкрементов, участвует большое количество генов [37]. Главное значение для понимания молекулярных основ формирования холелитиаза имеет изучение

полиморфных вариантов генов, которые кодируют белки, участвующие в процессе формирования ЖКБ.

Нами проведено изучение распределения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов аполипопротеина В-100 *APOB-100* (*rs693*), белка липопротеинового рецептора *LRPAP1* (*rs11267919*), АТФ-связанных кассетных (ABC) трансмембранных белков - транспортеров холестерина *ABCG5* (*rs4131229*) и *ABCG8* (*rs11887534*) у больных ЖКБ и индивидов контрольной группы, проживающих в г. Уфа.

3.4.1. Анализ ассоциации *Xba*I-полиморфизма (*rs693*) гена *APOB-100* у больных желчнокаменной болезнью

APOB-100 участвует в обмене и транспорте ХС в крови. Он синтезируется в печени, входит в состав ЛПОНП, ЛППП и ЛПНП. На хромосоме 2 гена *APOB*, в экзоне 26, найдена однонуклеотидная замена *7673C>T* (*rs693*), которая в литературе описывается как *Xba*I-полиморфизм [191]. Исследована взаимосвязь этого полиморфного варианта с риском формирования ишемической болезни сердца, инсулиннезависимого сахарного диабета и холестерина. Описаны высокие уровни в сыворотке крови общего ХС, ЛПНП, *APOB* и низкие концентрации ЛПВП при этих заболеваниях [84].

На рисунке 16 показана электрофореграмма амплифицированных фрагментов исследованного полиморфного локуса *rs693* гена *APOB-100*. На дорожках 1,2,3,5,7,9,14,17,19,20,22,23,26,28,30,34 показан генотип *rs693**X+X-; 4,8,12,13,15,16,21,25,27,33 – генотип *rs693**X+X+; 6,10,11,18,24,31,35,36 – генотип *rs693**X-X-.

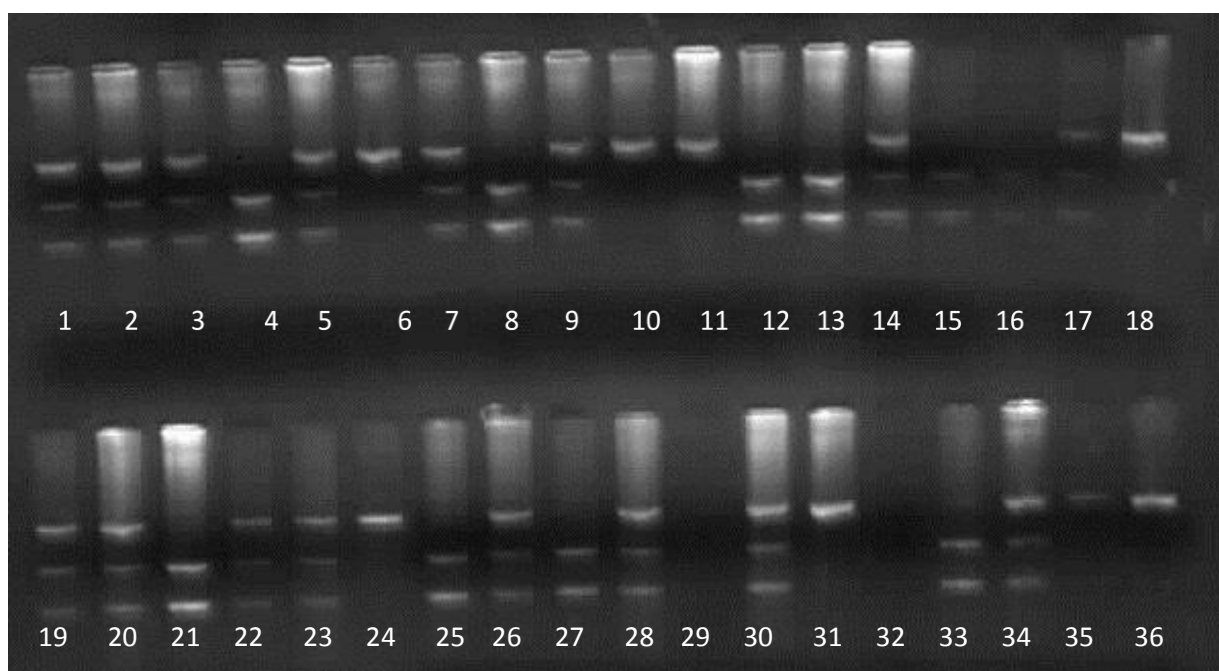


Рисунок 16 - Электрофореграмма, демонстрирующая генотипирование полиморфного локуса *rs693* гена *APOB-100*

В таблице 11 представлены частоты встречаемости аллелей и генотипов *XbaI*-полиморфизма (*rs693*) гена *APOB-100* у больных ЖКБ и контрольной группы (таблица 17).

Таблица 11 - Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs693* гена *APOB-100* у больных ЖКБ и здоровых доноров

Группы больных		Генотипы			Аллели		N
		X+X+	X+X-	X-X-	X+	X-	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Больные ЖКБ	В целом	31(18,90)	93(56,71)	40(24,39)	155(47,26)	173(52,74)	164
	ХКХ	18(19,15)	58(61,70)	18(19,15)	94(50,00)	94(50,00)	94
	ОКХ	13(18,57)	35(50,00)	22(31,43)	61(43,57)	79(56,43)	70
	Русские	16(18,39)	52(59,77)	19(21,84)	84(48,27)	90(51,72)	87
	Татары	14(19,72)	37(52,11)	20(28,17)	65(45,77)	77(54,23)	71
Конт- роль	В целом	36(26,09)	64(46,38)	38(27,54)	136(40,48)	200(59,52)	138
	Русские	18(29,03)	26(41,94)	18(29,03)	62(41,33)	88(58,67)	62
	Татары	18(25,35)	33(46,48)	20(28,17)	121(62,37)	73(37,63)	71

Примечание: n – численность групп; N – объем выборки

В исследовании во всех группах в 52,11-59,77% случаев среди больных ЖКБ и 41,94-46,48% - среди лиц контрольной группы встречался

гетерозиготный генотип $X+X-$, гомозиготные генотипы $X+X+$ и $X-X-$ выявлялись в равной частотой.

Все исследуемые больные были разделены на две группы: 1 - с ХКХ и 2 – с диагнозом ОКХ. Нами установлено, что маркерами повышенного риска развития ХКХ являются аллель $X+$ полиморфизма *rs693* гена *АРОВ-100*, который определялся в 50 % случаев у больных, и в 40,48% случаев – в контрольной группе ($\chi^2=4,44$, $p=0,04$; $OR=1,47$; 95%CI 1,02-2,11), и генотип $X+X-$ (у пациентов – в 61,70%, а в контроле – 46,38% ($\chi^2=4,67$, $p=0,03$; $OR=1,86$; 95%CI 1,09-3,18) (рисунок 17).

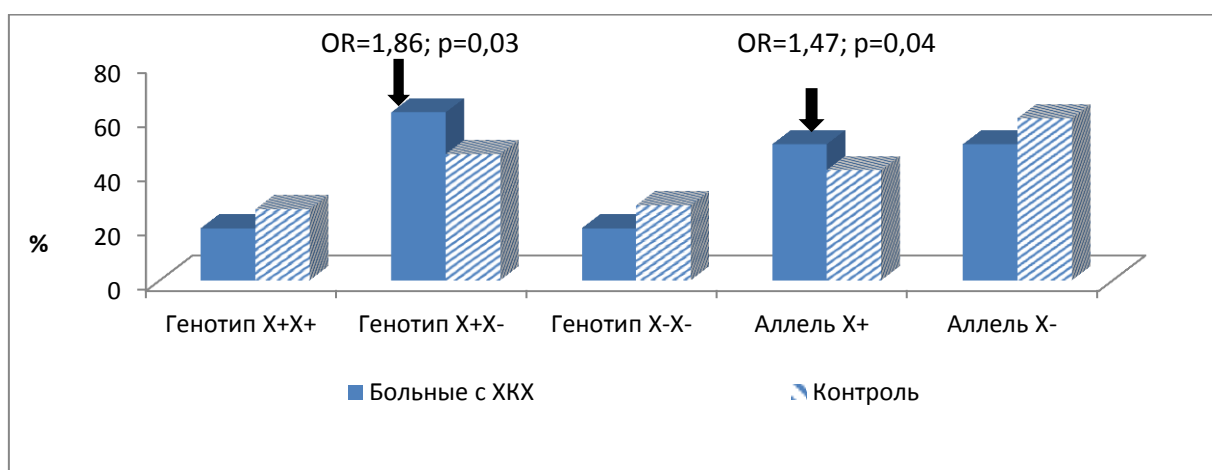


Рисунок 17 – Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs693* гена *АРОВ-100* в выборках больных ХКХ и контрольной группы

У индивидов контрольной группы аллель *rs693* $X-$ (59,52%) выявлялся чаще, чем в описываемой группе больных (50,00%) – $\chi^2=4,44$, $p=0,04$; $OR=0,68$; 95%CI 0,48-0,97.

После разделения выборки исследуемых групп на подгруппы по этнической принадлежности выявлено, что аллель $X+$ встречался в 62,37% случаев у здоровых лиц этнической группы татар, а у русских – в 41,33% случаев ($\chi^2=15,04$, $p=0,0001$).

При сравнении распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма *rs693* гена *АРОВ-100* между больными ЖКБ и контрольной группой, учитывая их этническую принадлежность, установлена у татар

ассоциация аллеля X^- у пациентов на 54,23% хромосом и на 37,63% хромосом в контроле с риском развития холелитиаза ($\chi^2=9,13$, $p=0,003$; $OR=2,0$; 95%CI 1,26-3,05). Аллель X^+ , маркирует устойчивость к развитию ЖКБ ($\chi^2=9,13$, $p=0,003$; $OR=0,5$; 95%CI 0,33-0,79). В выборке русских с ЖКБ характерна тенденция к увеличению частоты встречаемости гетерозиготного генотипа *rs693* X^+X^- по сравнению с представителями релевантной контрольной группы – 59,77% и 41,94%, соответственно ($\chi^2=3,93$, $p=0,05$). В группе с ХКХ выявлено: татар – 33, русских – 56 и метисов – 5. При сравнении больных с ХКХ и здоровых доноров согласно этнической принадлежности в исследовании не выявлено значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов описываемого полиморфизма гена *APOB-100*.

Таким образом, выявлено, что аллель X^+ и генотип X^+X^- полиморфизма *rs693* гена *APOB-100* ассоциированы с развитием ХКХ, а аллель X^- полиморфного варианта *rs693* гена *APOB-100* - с развитием ЖКБ у татар.

3.4.2. Анализ ассоциации инсерционно-делеционного полиморфизма (*rs11267919*) гена *LRPAP1* у больных желчнокаменной болезнью

Результаты изучения распределения частот аллелей и генотипов инсерционно-делеционного полиморфизма (*rs11267919*) в интроне 5 гена *LRPAP1* представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs11267919* гена *LRPAP1* у больных ЖКБ

Группы больных		Генотипы			Аллели		N
		<i>II</i>	<i>ID</i>	<i>DD</i>	<i>I</i>	<i>D</i>	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Больные ЖКБ	<i>В целом</i>	18(9,52)	81(42,86)	90(47,62)	132(33,58)	261(66,42)	189
	ХКХ	13(11,71)	39(35,14)	59(53,15)	65(29,28)	157(70,72)	111
	ОКХ	5(6,41)	42(53,85)	31(39,74)	52(33,33)	104(66,67)	78
	Русские	8(8,42)	43(45,26)	44(46,32)	59(31,05)	131(68,95)	95
	Татары	10(11,63)	34(39,53)	42(48,84)	54(31,40)	118(68,60)	86
Конт- роль	<i>В целом</i>	16(11,19)	60(41,96)	67(46,85)	92(32,17)	194(67,83)	143
	Русские	5(7,14)	33(47,14)	32(45,71)	43(30,71)	97(69,29)	70
	Татары	11(15,07)	27(36,99)	35(47,95)	49(33,56)	97(66,43)	73

Примечание: n – численность групп; N – объем выборки

На рисунке 18 показана электрофореграмма амплифицированных фрагментов исследованного полиморфного локуса *I/D* rs11267919 гена *LRPAP1*. На дорожках 2, 8 показан *rs11267919*I/I*; на 3, 5, 9 – генотип *rs11267919*I/D*; на 1, 4, 6, 7, 10 – *rs11267919*D/D*.

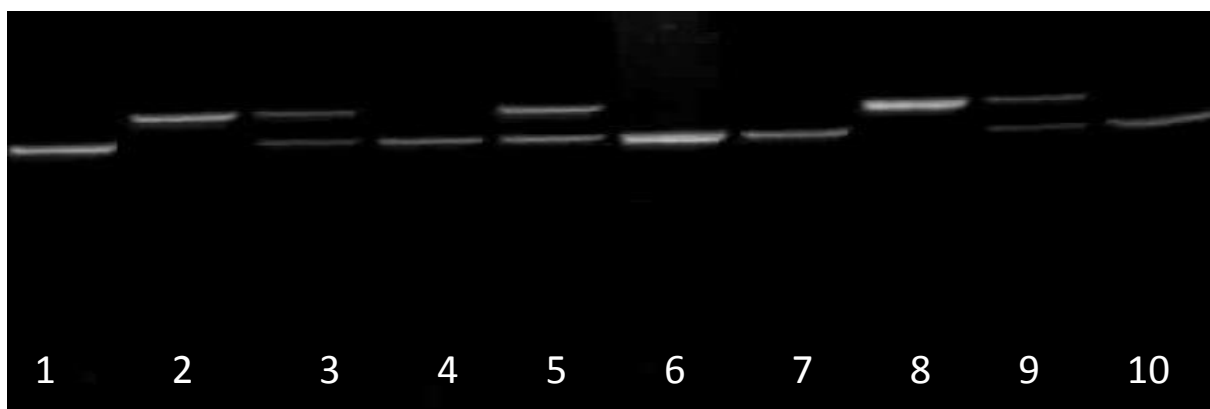


Рисунок 18 - Электрофореграмма, демонстрирующая генотипирование полиморфного локуса *I/D* rs11267919 гена *LRPAP1*

LRPAP1 представляет собой внутриклеточный белок, связанный с рецептором (RAP), который является субъединицей ЛПНП (LRP) [91]. Установлено, что аллель, содержащий делецию 37 п.о. в интроне 5 гена *LRPAP1*, увеличивает уровень ЛПВП и АРРА1 в сыворотке крови [172]. В исследовании на мышах было показано, что аллель *rs11267919*D* выполняет протективную функцию при развитии холелитиаза [149]. Исследуя распределение частот аллелей и генотипов данного ДНК-локуса у больных ЖКБ из Индии, установлена ассоциация аллеля *rs11267919 I* с риском развития заболевания [92].

Во всех исследованных группах с более высокой частотой встречался аллель *rs11267919 D* (на 66,42% хромосом в объединенной выборке больных и на 67,83% хромосом – в контрольной группе). Среди генотипов реже встречался гомозиготный генотип *rs11267919 I/I* (в 9,52% случаев у пациентов с ЖКБ и 11,19% - контрольной группы). При исследовании инсерционно-делеционного полиморфизма в интроне 5 гена *LRPAP1* у больных ЖКБ и

ОКХ и сравнении их с группой контроля также не было обнаружено статистически значимых различий ($p > 0,05$). Разделение выборок на подгруппы в зависимости от этнической принадлежности не показало ассоциаций описываемого ДНК-локуса с риском развития ЖКБ. Наши результаты согласуются с данными Juzyszyn Z. С соавторами, которые не выявили ассоциацию данного полиморфного варианта с развитием ЖКБ у больных из Польши [23].

Таким образом, ДНК-локус rs11267919 гена *LRPAP1* не ассоциирован с риском развития ЖКБ в Республике Башкортостан.

3.4.3. Анализ ассоциации полиморфного варианта *i7892 T>C (rs4131229)* гена *ABCG5* с желчнокаменной болезнью

ЛПВП захватывается печенью и выводится с желчью. Так осуществляется транспорт ХС, существенную роль в котором выполняют белки семейства АТФ-связанных кассетных (АВС) транспортеров. Эти белки-транспортеры *ABCG5* и *ABCG8* находятся в печени, кишечнике [153, 204] и эпителии желчного пузыря [194], регулируют транспорт липидов, затрудняют избыточный захват ХС в кишечнике, принимают участие в распаде ХС и выведении его с желчью.

Различные изменения в структуре генов, кодирующих данные белки, могут приводить к накоплению липидов в тканях и развитию атеросклероза, к повышенной экспрессии белков-транспортеров в гепатоцитах, и, как следствие, увеличению секреции ХС в желчь [114, 185].

Результаты исследования распределения частот полиморфного варианта *i7892 T>C (rs4131229)* гена *ABCG5* представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs4131229 гена *ABCG5* у больных ЖКБ

Группы больных		Генотипы			Аллели		N
		CC	CT	TT	C	T	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Больные ЖКБ	<i>В целом</i>	38(21,11)	80(44,44)	62(34,45)	156(43,33)	204(56,67)	180
	ХКХ	21(20,00)	42(40,00)	42(40,00)	84(40,00)	126(60,00)	105
	ОКХ	17(22,67)	38(50,67)	20(26,66)	72(48,00)	78(52,00)	75
	Русские	18(19,78)	35(38,46)	38(41,76)	71(39,01)	111(60,99)	91
	Татары	18(22,50)	39(48,75)	23(28,75)	75(46,88)	85(53,12)	80
Контроль	<i>В целом</i>	25(14,97)	73(43,71)	69(41,32)	123(36,83)	211(63,17)	167
	Русские	12(14,63)	40(48,77)	30(36,60)	64(39,02)	100(60,98)	82
	Татары	13(15,29)	33(38,82)	39(45,88)	59(34,71)	111(65,29)	85

Примечание: n – численность групп; N – объем выборки

На электрофореграммы амплифицированных фрагментов исследованных полиморфных ДНК-локусов показаны на рисунке 19.

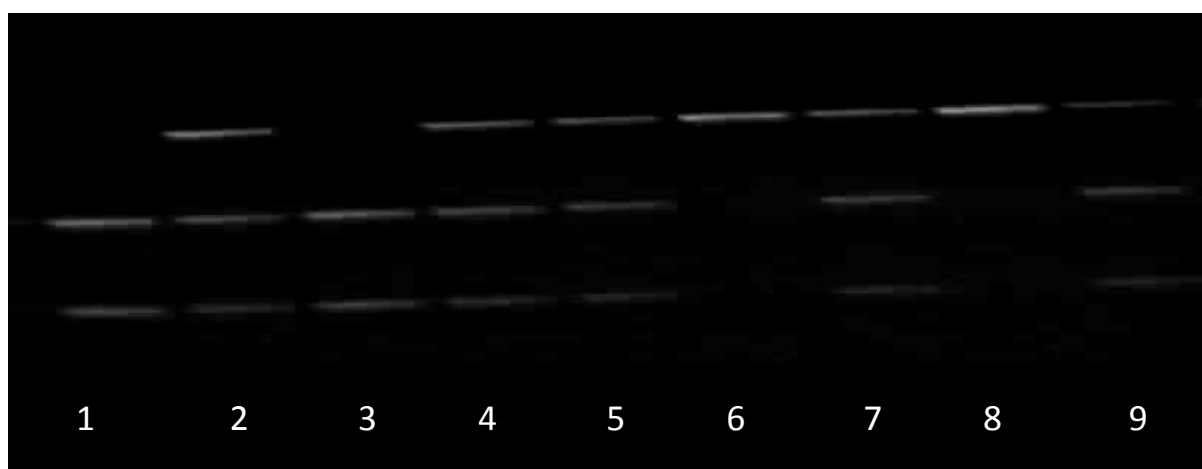


Рисунок 19 - Электрофореграмма, демонстрирующая генотипирование полиморфного локуса *i7892 T>C rs4131229* гена *ABCG5*. Дорожки 2, 4, 5, 7, 9 – *rs4131229*C/T*; 6, 8 – генотип *rs4131229*T/T*; 1, 3 – *rs4131229*C/C*

Обнаружены статистически значимые различия в распределении частот аллелей между больными с ОКХ и индивидами контрольной группы: у больных достоверно чаще по сравнению со здоровыми индивидами, в 48,00% и 36,83% случаев, соответственно, выявлен аллель *rs4131229 C* ($\chi^2=5,37$,

$p=0,02$; $OR=1,6$; $95\%CI$ 1,07-2,34). Частота аллеля *rs4131229* T, как и образованного им гомозиготного генотипа *rs4131229* T/T, была выше в контрольной группе, чем в группе больных с ОКХ ($\chi^2=5,37$, $p=0,02$; $OR=0,6$; $95\%CI$ 0,42-0,93 и $\chi^2=4,18$, $p=0,04$; $OR=0,5$; $95\%CI$ 0,28-0,94) (рисунок 20).

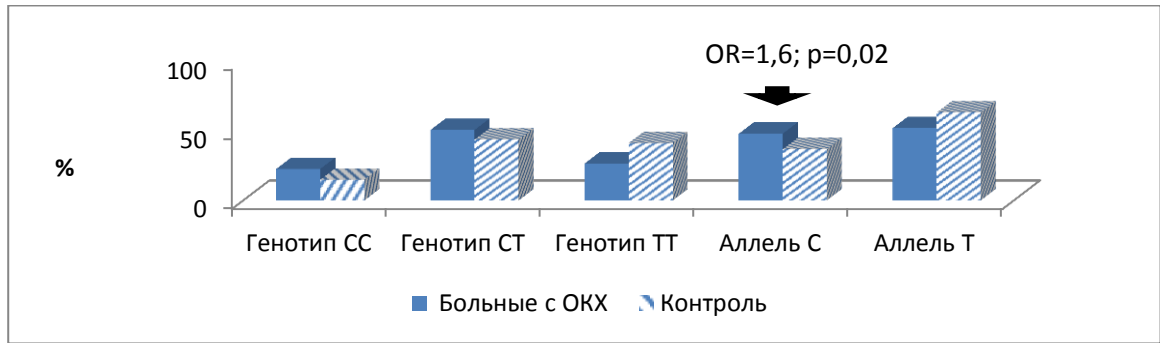


Рисунок 20 - Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs4131229* гена *ABCG5* в выборках больных острым калькулезным холециститом и контрольной группы

При сравнении групп больных и контроля согласно их этнической принадлежности обнаружено, что у татар аллель C однонуклеотидной замены *rs4131229* в гене *ABCG5*, выявленный на 46,88% хромосом у больных и 34,71% хромосом в контроле, является маркером повышенного риска развития ЖКБ ($\chi^2=5,06$, $p=0,02$; $OR=1,66$; $95\%CI$ 1,07-2,58), а аллель *rs4131229* T (больные – 53,11%, контроль – 65,29%) и генотип *rs4131229* T/T (больные – 28,75%, контроль – 45,88%) являются маркерами пониженного риска развития ЖКБ ($\chi^2=5,06$, $p=0,02$; $OR=0,6$; $95\%CI$ 0,39-0,94 и $\chi^2=4,45$, $p=0,03$; $OR=0,48$; $95\%CI$ 0,25-0,91, соответственно).

Таким образом, выявлено, что для татар маркерами повышенного риска развития холелитиаза является аллель C однонуклеотидной замены *rs4131229* в гене *ABCG5*. Показано, что для развития ОКХ маркером повышенного риска является аллель C полиморфного локуса *rs4131229* гена *ABCG5*.

3.4.4. Анализ ассоциации полиморфного варианта rs11887534 гена *ABCG8* с желчнокаменной болезнью

В многочисленных работах, посвященных изучению ЖКБ, проводятся исследования замены *Asp19His* гена *ABCG8*. У носителей полиморфизма rs11887534 гена *ABCG8* в крови выявлен высокий уровень общего ХС и ТГ [90].

Результаты исследования распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта 55G>C (rs11887534) гена *ABCG8*, приводящего к замене аминокислот *Asp19His* в структуре соответствующего белка, представлены в таблице 14.

Таблица 14 - Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs11887534 гена *ABCG8* у больных ЖКБ и практически здоровых лиц

Группы больных		Генотипы			Аллели		N
		CC	CG	GG	C	G	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Больные ЖКБ	В целом	1(0,53)	22(11,58)	167(87,89)	24(6,32)	356(93,68)	190
	ХКХ	0	14(12,50)	98(87,50)	14(6,25)	210(93,75)	112
	ОКХ	1(1,28)	8(10,26)	69(88,46)	10(6,41)	146(93,59)	78
	Русские	1(1,04)	9(9,38)	86(89,58)	11(5,73)	181(94,27)	96
	Татары	0	13(15,12)	73(84,88)	13(7,56)	159(92,44)	86
Конт-роль	В целом	2(1,34)	16(10,74)	131(87,92)	20(6,71)	278(93,29)	149
	Русские	0	6(8,33)	66(91,67)	6(4,17)	138(95,83)	72
	Татары	2(2,60)	10(12,98)	65(84,42)	14(9,09)	140(90,91)	77

Примечание: n – численность групп; N – объем выборки

На рисунке 21 показана электрофореграмма амплифицированных фрагментов исследованного полиморфного локуса *Asp19His* rs11887534 гена *ABCG8*. На дорожках 5, 7 показан rs11887534*C/G; на дорожках 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 – генотип rs11887534*G/G; ан 13– rs11887534*C/C.

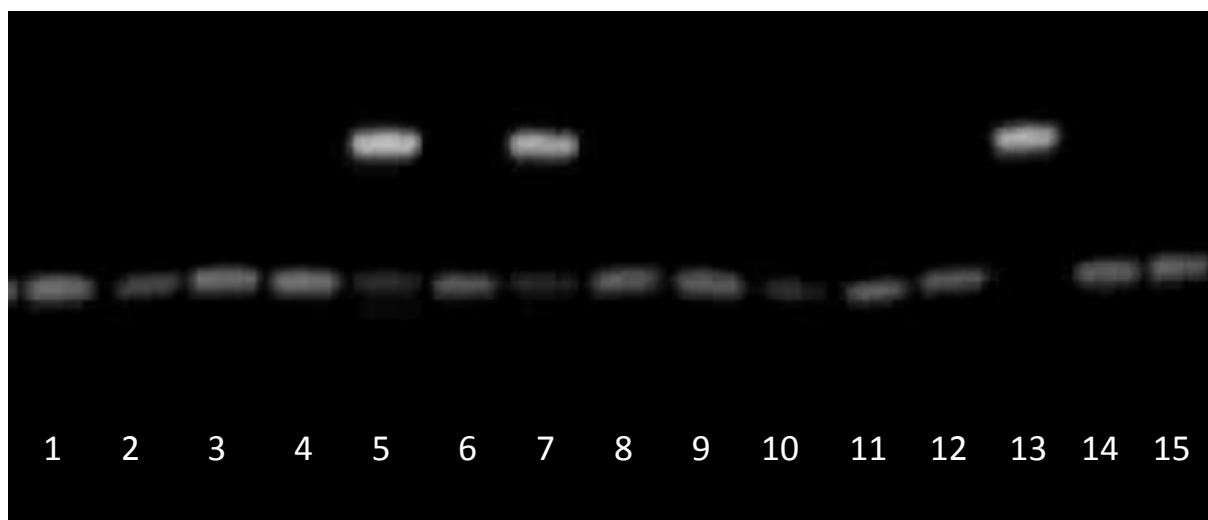


Рисунок 21 - Электрофореграмма, демонстрирующая генотипирование полиморфного локуса *Asp19His rs11887534* гена *ABCG8*

В нашем исследовании не были установлены достоверные ассоциации полиморфного варианта *rs11887534* гена *ABCG8* с риском развития ЖКБ (таблица 14). Наиболее часто встречался аллель *rs11887534 G (Asp)* – на 93,68% хромосом у больных и 93,29% у лиц контрольной группы, и гомозиготный генотип *rs11887534G/G* (больные – 87,89%, контроль – 87,92%). Гомозиготный по редкому аллелю генотип *rs11887534 C/C* был выявлен у одного больного с ОКХ в этнической группе русских и у двух лиц контрольной группы татар.

Таким образом, не выявлена ассоциация локуса *rs11887534* гена *ABCG8* с развитием ЖКБ.

Нами был проведен мета-анализ полиморфизмов генов *APOB-100*, *LRPAP1*, *ABCG5* и *ABCG8* в различных этнических группах исследуемых. По однонуклеотидным заменам *rs693* гена *APOB-100* и *rs4131229* гена *ABCG5* выявлен высокий уровень гетерогенности выборок – $I^2=89,2\%$ (95%CI 59,3-97,1%) и $I^2=61,9\%$ (95%CI 0,0-91,2%), соответственно. Гетерогенности между выборками по изученным локусам генов *LRPAP1* и *ABCG8* не найдено. Используя мета-анализ, не удалось обнаружить статистически достоверных различий в группах больных ЖКБ и контрольной группы ($p>0,05$).

В исследовании с помощью программы GMDR были разработаны модели взаимодействия изученных полиморфизмов генов. Статистически достоверных сочетаний полиморфных локусов *rs693* гена *APOB-100*, *rs11267919* гена *LRPAP1*, *rs4131229* гена *ABCG5* и *rs11887534* гена *ABCG8*, приводящих к возникновению холелитиаза, обнаружить не удалось.

Резюме: Маркерами повышенного риска развития ХКХ являются аллель *X+* и генотип *X+X-* полиморфного локуса *rs693* гена *APOB-100*. Аллель *C* ДНК - локуса *rs4131229* гена *ABCG5* ассоциирован с возникновением ОКХ, аллель *T* и генотип *T/T* - являются маркерами устойчивости к развитию ЖКБ. Полиморфизмы *rs11267919* гена *LRPAP1* и *rs11887534* гена *ABCG8* не связаны с риском развития холелитиаза. Аллель *X-* полиморфизма *rs693* гена *APOB-100* и аллель *C* ДНК - локуса *rs4131229* гена *ABCG5* ассоциированы с развитием ЖКБ у татар.

3.5 Анализ взаимосвязи наиболее значимых клинических признаков и полиморфных вариантов генов аполипопротеина В-100 *APOB-100* (*rs693*), АТФ-связанного кассетного (АВС) трансмембранного белка - транспортера холестерина *ABCG5* (*rs4131229*), контролирующих липидный обмен и их фенотипической реализации у больных с желчнокаменной болезнью

При сравнении полиморфизма *rs693* в гене *APOB-100* между больными ЖКБ и лицами контрольной группы было выявлено, что в группе больных холелитиазом чаще встречались гетерозиготный генотип *X+X-* (52,1-59,8% случаев среди больных ЖКБ, 41,9-46,5% - в контрольной группе) (таблица 15).

Таблица 15 - Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *rs693* гена *APOB-100* и *rs4131229* гена *ABCG5* у больных ЖКБ и практически здоровых лиц

Генетические признаки			ЖКБ (N=195)	Контроль (N=172)	$P \chi^2$
Генотипы	<i>APOB-100</i>	X+X+	31(18,9)	36(26,1)	0,17
		X+X-	93(56,7)	64(46,4)	0,01
		X-X-	40(24,4)	38(27,5)	0,62
	<i>ABCG5</i>	CC	38(21,1)	25(14,9)	0,18
		CT	80(44,4)	73(43,7)	0,98
		TT	62(34,5)	69(41,3)	0,23
Аллели	<i>APOB-100</i>	X+	155(47,3)	136(40,5)	0,08
		X-	173(52,7)	200(59,5)	0,08
	<i>ABCG5</i>	C	156(43,3)	123(36,8)	0,09
		T	204(56,7)	211(63,2)	0,09

Примечание: данные приведены в виде n (% от общей численности группы), где n – численность групп

При анализе фенотипических факторов (таблица 16) выявлена взаимосвязь риска развития ЖКБ с такими показателями крови, как повышение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) печени, общего и связанного билирубина, щелочной фосфатазы, лейкоцитов, уровня ЛПНП, ТГ, ХС, гемоглобина, а также массы тела, индекса массы тела. Следующим этапом был выбор из полученных показателей наиболее прогностически эффективных данных. Для ее решения использовали аппарат ROC-анализа (таблица 16).

Таблица 16 - Феногенетические факторы, влияющие на развитие ЖКБ ($M \pm m$)

Показатели	ЖКБ (N=195)	Контрольная группа (N=172)	ROC – анализ		
			Критерий (пороговые значения)	AUC (95% ДИ)	P
Генотип X+X- гена <i>APOB-100</i> , n	93 P=0,01	64	наличие	0,554 (0,496- 0,610)	0,011
Индекс массы тела (кг/м ²)	26,32±0,35 (17,63-45,52) P = 0,001	24,33±0,37 (14,50- 40,40)	> 21,6	0,59 (0,53 - 0,65)	0,01

Продолжение таблицы 16

Показатели	ЖКБ (N=195)	Контрольная группа (N=172)	ROC – анализ		
			Критерий (пороговые значения)	AUC (95% ДИ)	P
Беременности, n	73 P < 0,001	23	≥ 3	0,76 (0,69 - 0,82)	< 0,01
Сердечно- сосудистые заболевания, n	46 p=0,001	5	наличие	0,767 (0,72 - 0,81)	< 0,01
АЛТ (норма 0-40 Ед/л)	70,65±9,45 (6,8-904) P < 0,01	16,81±0,63 (2-39)	> 34	0,763 (0,71 - 0,81)	< 0,01
АСТ (норма 0-40 Ед/л)	58,05±6,97 (9-761) P < 0,001	19,4±0,7 (2-40)	> 15	0,73 (0,68 - 0,78)	<0,0001
Общий билирубин (норма 8,5-20,5 мкмоль/л)	26,87±3,52 (5,6-561) P < 0,001	11,42±0,3 (2-20)	> 15,5	0,73 (0,68 - 0,78)	<0,001
Св.билирубин (норма 2,0-5,1 мкмоль/л)	12,38±1,74 (2-240) P < 0,001	2,20±0,03 (1,5-2,9)	> 2,9	0,99 (0,97- 0,99)	<0,001
Щелочная фосфатаза (норма 35-130 Ед/л)	171,18±11,33 (6-1363) P < 0,001	71,50±2,74 (11-145)	> 115	0,75 (0,69- 0,79)	<0,0001
ЛПВП (норма 0,77-2,19 ммоль/л)	1,26±0,04 (0,49-2,10) P = 0,898	1,26±0,01 (1,09-1,9)	$\leq 1,26$	0,68 (0,63 - 0,74)	< 0,001
ЛПНП (норма 0-3,0 ммоль/л)	2,66±0,07 (1,22-5,15) P < 0,001	1,98±0,04 (1,68-3,26)	> 1,68	0,69 (0,63 - 0,74)	< 0,001
ТГ (норма 0,46-1,6 ммоль/л)	1,32±0,04 (0,56-3,54) P < 0,001	0,78±0,01 (0,69-1,12)	> 0,69	0,88 (0,83 - 0,91)	< 0,001
ХС (норма 3,0- 5,0 ммоль/л)	5,64±0,09 (2,7-9,3) P < 0,001	4,21±0,05 (2,1-5,0)	> 5	0,85 (0,80 - 0,89)	< 0,001
Гемоглобин (норма 120-140 (ж), 130-160 (м) г/л)	133,05±1,42 (5,3-260) P = 0,014	128,95±0,43 (118-140)	> 138	0,63 (0,57- 0,69)	< 0,001

Регрессионный логистический анализ показал, что генотип Х+Х- гена *АРОВ-100*, индекс массы тела более 25 кг/ м², повышение уровня связанного билирубина > 2,9мкмоль/л, изменений липидного обмена (ЛПНП >1,68 ммоль/л и ЛПВП ≤1,26 ммоль/л) и уровня лейкоцитов > 6*10⁹/л тесно связаны с развитием ЖКБ. Далее переменные превратили в категориальные единицы с помощью ROC – анализа с созданием клинко-генетической модели и простой шкалы для диагностики холелитиаза, которые могут быть использованы в ежедневной клинической деятельности (таблица 17).

Заболевание	Факторы риска	P	OR, отношение шансов	95%-ный доверительный интервал	Признак	Баллы
ЖКБ	Масса тела, кг	< 0,001	5,13	2,50 - 10,52	> 56	1
					≤ 56	0
	Лейкоциты, *10 ⁹ /л	< 0,001	24,76	13,32 - 46,04	> 6	1
					≤ 6	0
	Билирубин связанный, мкмоль/л	< 0,001	598,47	33,88-10570,72	> 2,9	1
					< 2,9	0
	ЛПВП, ммоль/л	< 0,001	240,85	32,74 - 1771,69	≤ 1,26	1
					> 1,26	0
	ЛПНП, ммоль/л	< 0,001	12,97	7,26 - 23,17	> 1,68	1
					≤ 1,68	0
Генотип X+X-гена <i>APOB-100</i>	0,04	1,54	0,98 - 2,42	Наличие	1	
				Отсутствие	0	

На основании полученных в исследовании значений была разработана клинико-генетическая модель для диагностики наличия заболевания:

$$P_{\text{(ЖКБ)}} = 1/1 + \exp(-79,55 + 1,63 * (\text{масса тела} > 56 \text{ кг}) + 3,21 * (\text{Лейкоциты} > 6 * 10^9/\text{л}) + 2,56 * (\text{ЛПНП} > 1,68 \text{ ммоль/л}) + 5,48 * (\text{ЛПВП} \leq 1,26 \text{ ммоль/л}) + 6,39 * (\text{Связанный билирубин} > 2,9 \text{ мкмоль/л}) + 0,43 * (\text{Генотип X+X-гена APOB-100})).$$

Модель испытана на 22 больных ЖКБ, не входивших в группу исследования. Результаты совпали с предсказанными в 14 (64 %) случаях.

3.6. Анализ взаимосвязи наиболее значимых клинических признаков, а также полиморфных вариантов генов *APOB-100* (7673C>T rs693) и *ABCG5* (i7892 T>C rs4131229), контролирующих липидный обмен и их фенотипической реализации у больных с хроническим и острым калькулезным холециститом

Попарное сравнение генетических факторов между больными контрольной группой приведены в таблице 18.

Таблица 18 - Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов rs693 гена *APOB-100* и rs4131229 гена *ABCG5* у больных ЖКБ и практически здоровых лиц

			ХКХ	Р χ^2	ОКХ	Р χ^2	Контрольная группа
Генотипы	<i>APOB-100</i>	X+X+	18(19,2)	0,29	13(18,6)	0,3	36(26,1)
		X+X-	58(61,7)	0,03	35(50)	0,73	64(46,4)
		X-X-	18(19,2)	0,19	22(31,4)	0,67	38(27,5)
	<i>ABCG5</i>	CC	21(20)	0,36	17(22,7)	0,21	25(14,9)
		CT	42(40)	0,63	38(50,7)	0,39	73(43,7)
		TT	42(40)	0,93	20(26,7)	0,04	69(41,3)
Аллели	<i>APOB-100</i>	X+	94(50)	0,04	61(43,6)	0,6	136(40,5)
		X-	94(50)	0,04	79(56,4)	0,6	200(59,5)
	<i>ABCG5</i>	C	84(40)	0,51	72(48)	0,03	123(36,8)
		T	126(60)	0,51	78(52)	0,03	211(63,2)

Примечание: данные приведены в виде n (%), где n – численность групп

При попарном сравнении 1 и 2 группы между собой выявлена достоверная взаимосвязь развития ХКХ с индексом массы тела, а ОКХ - с повышенным уровнем АЛТ и АСТ печени, общим и связанным билирубином, щелочной фосфатазой и уровнем ЛПВП в крови.

Таблица 19 - Фенотипические факторы, влияющие на развитие различных вариантов течения ЖКБ ($M \pm m$)

Признак	ХКХ (N=115)	ОКХ (N=80)	Контрольная группа (N=172)	$P_{\text{ХКХ/ОКХ}}$
Возраст, года	54,1±1,2 (23-84) $P = 0,181$	58,9±1,6 (21-87) $P = 0,149$	67,2±0,88 (19-87)	0,305
Индекс массы тела, кг/м ²	27,41±0,51 (18,37-45,52) $P < 0,001$	24,73±0,38 (17,63-35,16) $P = 0,515$	24,33±0,37 (14,50-0,40)	0,001
АЛТ, Ед/л	35,6±4,9 (6,8-375) $P < 0,001$	121,6±20,9 (8-904) $P < 0,001$	16,81±0,63 (2-39)	0,001
АСТ, Ед/л	34,2±4,65 (9-373) $P = 0,001$	95,1±15,1 (9-761) $P < 0,001$	19,4±0,7 (2-40)	0,001
ЩФ, Ед/л	126,26±8,58 (6-460) $P < 0,001$	235,87±23,05(25-1363) $P < 0,001$	71,50±2,74 (11-145)	0,001
Общий билирубин, мкмоль/л	15,96±0,99 (5,6-102) $P < 0,001$	42,75±8,24 (8,5-561) $P < 0,001$	11,42±0,3 (2-20)	0,001
Связанный билирубин, мкмоль/л	5,97±0,44 (2-48) $P < 0,001$	21,84±4,01 (2,4-240) $P < 0,001$	2,20±0,03 (1,5-2,9)	0,001
ЛПВП, ммоль/л	1,3±0,05 (0,73-2,1) $P = 0,341$	1,19±0,05 (0,49-2,10) $P = 0,11$	1,26±0,008 (1,09-1,9)	0,007
ЛПНП, ммоль/л	2,69±0,09 (1,28-5,15) $P < 0,001$	2,63±0,10(1,22-4,79) $P < 0,001$	1,98±0,04 (1,68-3,26)	0,349
ТГ, ммоль/л	1,36±0,06 (0,69-3,54) $P < 0,001$	1,26±0,06 (0,56-2,25) $P < 0,001$	0,78±0,01 (0,69-1,12)	0,657
ХС, ммоль/л	5,77±0,11 (2,7-9,3) $P < 0,001$	5,45±0,13 (2,9-8,4) $P < 0,001$	4,21±0,05 (2,1-5,0)	0,761

Следующим этапом исследования был выбор из полученных показателей прогностически наиболее эффективных данных. Для ее решения использовали аппарат ROC-анализа и регрессионный логистический анализ,

результаты которых показали, что риск развития ОКХ ассоциировано с наличием высоких значений связанного билирубина, ЛПНП, ТГ и общего ХС, низких значений ЛПВП, возраста старше 60 лет и аллеля С гена *ABCG5*, а ХКХ – с наличием высокого общего ХС, ЛПНП, низкого ЛПВП и генотипа Х+Х- гена *APOB-100*. Далее были созданы клинико-генетические шкалы оценки риска развития ХКХ и ОКХ, которые могут быть внедрены в ежедневную практику с использованием результатов многомерного анализа с помощью ROC – анализа (таблица 20).

Таблица 20 - Бинарная логистическая регрессия факторов риска развития фенотипов ЖКБ

Заболевание	Факторы риска	P	OR, отношение шансов	95%-ный доверительный интервал	Признак	Баллы
ХКХ	Генотип Х+Х- гена <i>APOB-100</i>	0,042	1,849	1,022 - 3,349	Наличие	1
					Отсутствие	0
	ХС общий, ммоль/л	0,001	5,263	2,894 - 9,573	>5	1
					≤5	0
	ЛПНП, ммоль/л	0,001	3,984	2,081 - 7,624	>2,48	1
					≤2,48	0
	ЛПВП, ммоль/л	0,001	3,179	1,825 - 5,539	≤1,09	1
					>1,09	0
ОКХ	Аллель С гена <i>ABCG5</i>	0,001	4,143	1,742- 9,849	Наличие	1
					Отсутствие	0
	Возраст, года	0,0002	6,6877	2,432-18,394	>60	1
					≤60	0
	ЛПВП, ммоль/л	0,001	10,844	3,809 - 30,873	≤1,08	1
					>1,08	0
	ЛПНП, ммоль/л	0,009	4,962	1,505 - 16,363	>1,68	1
					≤1,68	0
	ТГ, ммоль/л	0,001	0,073	0,022 - 0,246	>0,74	1
					≤0,74	0
	ХС общий, ммоль/л	0,015	3,636	1,289 - 10,255	>5	1
					≤5	0
	Связанный билирубин, мкмоль/л	0,0002	30,219	5,148 - 177,406	> 4	1
					≤ 4	0

Основываясь на полученные данные, был использован кластерный анализ переменных, который позволил наглядно выявить различия между двумя группами больных (рисунок 22):

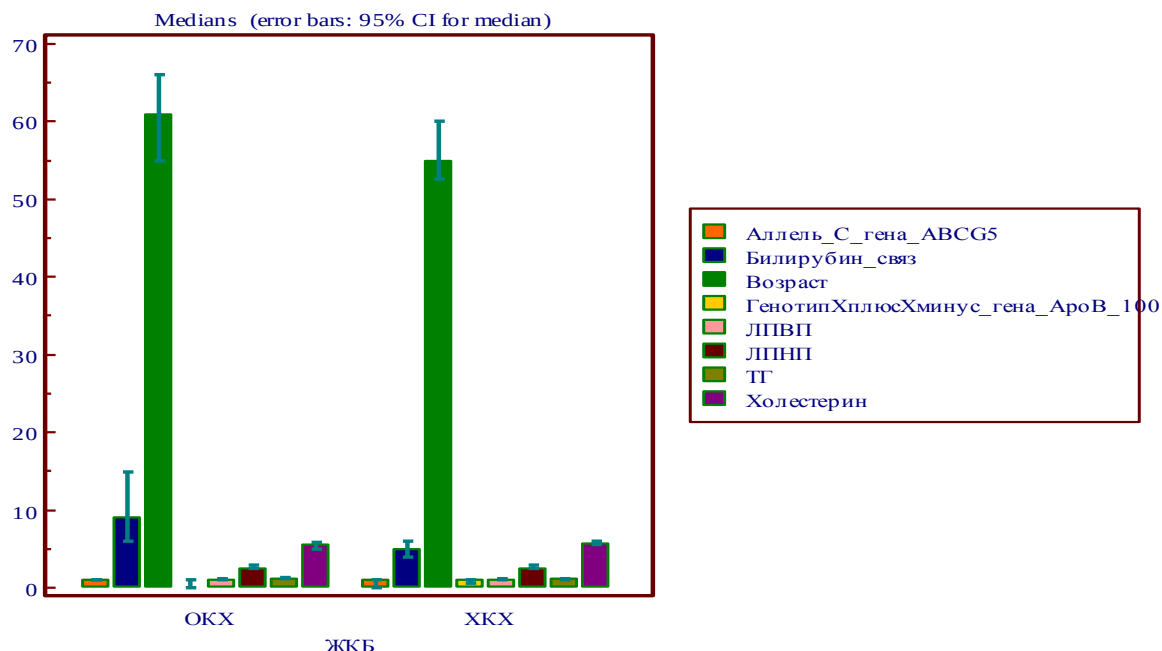


Рисунок 22 - Факторы риска развития фенотипов ЖКБ

Основываясь на полученные данные, разработаны клинико-генетические модели вероятности развития ХКХ и ОКХ:

$$P_{(ХКХ)} = 1/1 + \exp(-3,073 + 1,157 * (\text{ЛПВП} \leq 1,09 \text{ ммоль/л}) + 1,382 * (\text{ЛПНП} > 2,48 \text{ ммоль/л}) + 1,661 * (\text{Холестерин} > 5 \text{ ммоль/л}) + 0,615 * (\text{Генотип Х+Х-гена } APOB-100)).$$

$$P_{(ОКХ)} = 1/1 + \exp(-5,98 + 3,41 * (\text{Связанный билирубин} > 4 \text{ мкмоль/л}) + 1,9 * (\text{Возраст} > 60 \text{ лет}) + 2,384 * (\text{ЛПВП} \leq 1,08 \text{ ммоль/л}) + 1,602 * (\text{ЛПНП} > 1,68 \text{ ммоль/л}) + 1,421 * (\text{Аллель С гена } ABCG5) - 2,618 * (\text{ТГ} > 0,74 \text{ ммоль/л}) + 1,291 * (\text{Холестерин} > 5 \text{ ммоль/л})).$$

Модели испытаны на 19 больных ХКХ и 10 больных ОКХ, не входивших в группу исследования. Результаты совпали с предсказанными в 12 (63%) и 8 (80%) случаях соответственно.

Таким образом, выявлен неуклонный рост общей и первичной заболеваемости населения Республики Башкортостан болезнями желчного

пузыря и желчевыводящих путей как среди взрослого населения, так и среди девушек и подростков; установлены клинико-лабораторные признаки, которые можно считать критериями развития заболевания; изучена структура и строение желчных конкрементов, на основании которой предложена модель формирования холелитов; выявлены генетические ассоциации с риском развития ЖКБ. Используя полученные данные, сформированы модели и шкалы для оценки вероятности развития холелитиаза.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В структуре патологии билиарного тракта ЖКБ занимает значительное место [26]. До сих пор остается значительное количество неясных и спорных моментов при изучении этиологии и механизме образования камней в желчном пузыре.

ЖКБ формируется задолго до появления клинических симптомов в результате воздействия различных постоянных и изменчивых факторов [13, 54, 63, 76, 144], что требует необходимости поиска патогенетически значимых отклонений. Данная задача может быть решена, используя знания изменений в обмене липидов сыворотки крови, состава, структуры камней, механизма их образования, влияния генетических факторов на формирование заболевания.

Смертность от болезней пищеварительной системы в Российской Федерации увеличилась с 66,1 в 2014 году до 66,3 в 2016 году на 100 000 человек населения, в Республике Башкортостан выросла с 62,1 в 2014 году до 63,3 на 100 000 человек населения в 2016 году.

За период с 2005 по 2016 год в Республике Башкортостан отмечен неуклонный рост общей заболеваемости болезнями органов пищеварения среди девушек на 17,3 %, а также ЖКБ среди детей 0-14 лет – на 7,6%, среди девушек - на 5,9%, и среди взрослых – на 18,6%. Выявлено увеличение показателей первичной заболеваемости холелитиазом среди юношей – на 23,2%, среди девушек – на 29%, среди взрослых – на 29,7% в Республике Башкортостан. Рост числа холецистэктомий на 21,4% и снижение летальности на 0,1 % за отчетный период в республике свидетельствует об увеличении числа методов лечения ЖКБ неинвазивными методами и продолжения необходимости совершенствования методов лечения данной патологии.

Причиной возникновения биоминеральных образований в организме человека является нарушение равновесия в системе органических и неорганических веществ. С целью изучения структуры и свойств желчных конкрементов для установления закономерностей образования и эволюции

камней в организме человека нами, совместно с кафедрой материаловедения и физики металлов ФГБОУ ВО «Уфимский государственный авиационный технический университет», проведено исследование 25 камней, извлеченных после холецистэктомии у больных ЖКБ.

В холелитах, имеющих кристаллическую структуру с радиальным ростом кристаллов, выделяют ядро, строму и корковый слой [16], а Поляков В.В. с соавт. (2010) определили в желчном камне ядро из органических веществ, слой (центральная часть) и внешнюю граничную область [27]. Проведенное нами исследование состава и структуры желчного камня позволило установить радиально-слоистую структуру смешанного желчного камня, что указывает на изменения физико-химических характеристик камнеобразующей среды с несколькими сросшимися в процессе формирования центрами кристаллизации. Структура имеет четкое разделение на три области (центральную, промежуточную и периферическую), которое обусловлено слиянием ранее отдельных конкрементов с трансформацией размеров зерен ХС от мелко- до крупнопластинчатых, что подтверждает общую точку зрения этиопатогенеза камнеобразования с учетом холестеринового дисбаланса [1].

В ядре желчных камней обнаружены арагонит, билирубиновую известь, соли металлов, погибшие паразиты, инородные тела, ХС и слизь, считая арагонит результатом кристаллизации из пересыщенного коллоидного раствора желчи [16]. Поляков В.В. с соавт. (2010) в ядре выявили белок, фосфат, карбонат, билирубинат кальция, черный пигмент, натрий, магний, серу, хлор, затем от ядра увеличивалась концентрация кислорода, азота, и уменьшался уровень кальция [27]. В смешанных камнях определены железо, марганец, хром и др.[16]. Кроме безводного ХС в желчных камнях обнаружены карбонат кальция, фосфат кальция, билирубин, натриевая соль желчной кислоты, более 36 неорганических соединений. Для желчных камней было характерно зонально-слоистое строение [8]. Боровкова Е.В. (2014) выявила, что для холестериновых желчных камней характерна радиально-лучистая структура

[1]. В нашем исследовании конкременты, извлеченные у пациентов обеих групп, имели радиально-слоистое строение, во всех трех областях смешанного камня фазовый состав включал арагонит и безводный ХС, однако количественное соотношение этих фаз различалось. Центральная и промежуточная области образованы скоплением отдельных микросферолитов арагонита и органических веществ. Периферическая область состоит преимущественно из ХС и незначительного количества арагонита. Смешанные желчные камни являются стоком металлических и неметаллических элементов. В центральной области наблюдается повышенное содержание железа, кальция, фосфора, натрия и кремния, циркония, что и обуславливает высокую твердость 32-58 НV. Установлено, что в составе желчных конкрементов обнаруживаются карбонат и билирубинат кальция при увеличении содержания ионов кальция в самой желчи [8]. Перенасыщение ее ХС, нуклеация кристаллов моногидрата ХС из билиарных холестерино-фосфолипидных пузырьков с образованием ядра камня и присоединением кальциевых солей пигмента и муцина является условием образования холестериновых холелитов, что подтверждает общую точку зрения этиопатогенеза камнеобразования с учетом холестеринового дисбаланса [31].

Клиническая часть работы. В исследование вошли больные ЖКБ, разделенные на 2 группы: с ХКХ и ОКХ.

С целью изучения роли и оценки значимости различных факторов несостоятельности энтерогепатической циркуляции в развитии ЖКБ клинико-лабораторное исследование проведено у 195 больных ЖКБ, которые были разделены на две группы. В состав первой группы вошли 115 пациентов с ХКХ, в состав второй – 80 пациентов с ОКХ, в возрасте 21-87 лет (средний возраст $56,14 \pm 0,98$ года). 98 (85%) обследуемым больным из 115 пациентов с ХКХ была проведена плановая лапароскопическая холецистэктомия, 17 (15%) больным - консервативная терапия. 74 (92,5%) обследуемым пациентам с ОКХ была проведена лапароскопическая холецистэктомия, а 6 (7,5%) пациентов отказались от оперативного вмешательства.

Многочисленными исследованиями доказана большая роль различных факторов, влияющих на возникновение и развитие ЖКБ, среди которых пол, возраст (свыше 40 лет), наследственность, принадлежность к определенной этнической группе (постоянные факторы) [15, 18, 20, 65]; характер питания, беременность и роды для женщин, избыточная масса тела, сахарный диабет, метаболический синдром, гиподинамия, гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, прием лекарственных препаратов (оральные контрацептивы, клофибраты) (изменчивые факторы) [21, 22, 24, 25, 26].

Полученные в нашем исследовании данные анализа состава групп больных по постоянным факторам свидетельствует, что у женщин ЖКБ имела более широкое распространение (75,9%), причем с ХКХ - в 82% случаях, а с ОКХ – в 67,5%. Соотношение мужчин и женщин в группе больных ЖКБ зарегистрировано 1:3, в 1 группе - 1:4, во 2 группе – 1:2. Известно, что женщины во всех странах мира из-за меняющегося гормонального фона болеют холелитиазом в 2-4 раза чаще мужчин [15, 38, 111], а среди американских индейцев – в 7 раз чаще [116]. Половые различия при ЖКБ связывают с гормональными изменениями: преобладанием эстрогенов, влияющих на желчевыделение и желчеобразование [36], повышающих секрецию ХС в желчь и снижающих синтез желчных кислот [52].

В исследовании заболеваемость ЖКБ чаще наблюдалась у лиц старше 60 лет, причем у женщин старше 40 лет отмечался чаще ХКХ. Установлено, что с возрастом секреция ХС в желчь возрастает, и пул желчных кислот снижается из-за уменьшения активности холестериновой 7-альфа-гидроксилазы [115]. Учеными, проводившими исследование MISCOL (Италия), установлено, что распространенность ЖКБ увеличивается на 0,47% в 1 год у мужчин и на 0,67% - у женщин [117].

При анализе состава групп больных по изменчивым факторам выявлено, что одним из них является многократная беременность [15, 161, 24, 147]. Полученные нами данные показывают, что в анамнезе 3 и более беременности, как фактор риска развития заболевания, наблюдались у 73

женщин (49%) с ЖКБ, у 54 (57%) пациенток - с ХКХ, а у 35 (65%) пациенток с ОКХ - до 3 беременностей. Установлено, что у пациенток в 1 группе в 2,48 раз чаще встречалась многократная беременность, чем во 2 ($p=0,015$). В исследовании выявлено, что у больных холелитиазом в 4,6 раз чаще встречалась многократная беременность, чем в контроле ($p=0,0005$). При многократной беременности под влиянием прогестерона развивается гиподисфункция желчного пузыря с нарушением его опорожнения, что приводит к застою желчи [52].

Количество женщин с ХКХ в периоде менопаузы составило 77 человек (67%), с ОКХ – 40 человек (74%).

Известно, что заболевания желчевыводящих путей связаны с нарушением липидного обмена и в 30% случаев сочетается с ишемической болезнью сердца [4, 11, 49, 148]. В исследовании выявлено, что ЖКБ протекала на фоне сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний: у 38 (33%) пациентов в 1 группе, 8 (10%) больных во 2 группе, причем у лиц с ХКХ в 4,44 раза чаще, чем у больных с ОКХ ($p=0,001$).

Из сопутствующей патологии хронический паренхиматозный панкреатит у больных с ОКХ ($p<0,05$) был зарегистрирован чаще, чем у лиц с ХКХ. Сахарный диабет встречался у 13% пациентов 1 группы и 22,5% больных 2 группы ($p<0,05$).

Среди больных ЖКБ 96% пациентов (у 93% больных в 1 группе и у 100% – во 2-й) отмечали боли в животе. Горечь во рту, метеоризм и запоры чаще были зарегистрированы у пациентов с ХКХ, а тошнота и рвота – у больные с ОКХ.

Имеется множество данных о влиянии избыточной массы тела на ЖКБ. Повышение литогенности желчи у полных людей является следствием повышенной секреции ХС [130, 147, 192, 209]. Среди обследованных нами больных масса тела, превышающая нормальные показатели, выявлена у 57% индивидов с ЖКБ ($p<0,05$), причем у индивидов с ХКХ чаще, чем с ОКХ ($p<0,05$). Ожирение 1 ст. ($30-34,9 \text{ кг/м}^2$) было у 25, ожирение 2 ст. ($35-39,9$

кг/м²) - у 10, ожирение 3 ст. - у 3 (40 и более кг/м²) человек в группе ХКХ. Для ОКХ эти цифры составили: ожирение 1 ст. - у 6 больных, ожирение 2 ст. - у 1 пациента. В результате увеличения массы тела повышается активность ГМГ-КоА-редуктазы печени, ускоряется синтез ХС и секреция в желчь, прибавка массы жира в теле на 1 кг приводит к приросту экскреции ХС на 20 мг/сут [5].

Обмен липидов сыворотки крови управляется деятельностью различных ферментов и аполипопротеинов, которые являются структурными компонентами липопротеинов. Согласно литературным данным существуют общие факторы в патогенезе развития хронических заболеваний желчевыводящих путей. Избыточная насыщенность желчи ХС встречается при этих заболеваниях в равной степени [59]. При ЖКБ более значимы изменения липидов крови с увеличением общего ХС за счет ЛПНП и апобелкового компонента, ответственного за транспорт ХС в клетку [30, 65, 151].

В исследовании у больных с ХКХ достоверно зарегистрированы высокие уровни общего ХС, ЛПНП, ТГ и индекса атерогенности, а уровень ЛПВП ниже референтных значений. У пациентов с ОКХ статистически достоверно отмечался высокий уровень ХС и индекса атерогенности, ТГ и ЛПНП не превышали нормы, а уровень ЛПВП был ниже референтных значений. У больных 1 и 2 группы были установлены 2 А, 2 Б и 4 типы гиперлипидопроteinемий. В различных эпидемиологических исследованиях также было выявлено снижение уровня ЛПВП и повышение уровня ЛПНП и ТГ [2]. Показано, что при ЖКБ в крови увеличивается уровень ЛПНП и ЛПОНП [69]. Установлено, что ЛПНП содержат ХС, а ЛПОНП - ТГ, поэтому при увеличении ЛПНП и ЛПОНП имеется высокий риск развития атеросклероза [56].

У больных ХКХ установлена средней силы положительная корреляция между билирубином и многократной беременностью ($r=0,31$, $p=0,002$), ТГ и индексом массы тела ($r=0,43$, $p=0,033$) и средняя обратная корреляция между ЛПВП и ХС ($r=0,48$, $p=0,015$). У больных ОКХ обнаружена средняя

положительная корреляция между ЛПНП и ХС ($r=0,62$, $p=0,0003$), средняя обратная ассоциация между ЛПВП и ХС ($r=-0,45$, $p=0,008$), слабая положительная корреляция между билирубином и ХС ($r=0,37$, $p=0,0005$). В целом, при ЖКБ выявлена средняя положительная корреляция между ТГ и индексом массы тела ($r=0,38$, $p=0,003$), ТГ и многократной беременностью ($r=0,31$, $p=0,048$), индексом атерогенности и ХС ($r=0,36$, $p=0,005$), а также средняя обратная ассоциация между ЛПВП и ХС ($r=-0,44$, $p=0,0006$). В различных исследованиях также установлена взаимосвязь между дислипидемией и ЖКБ, особенно снижение уровня ЛПВП, повышение уровня ЛПНП и ТГ (Гаценко В.П., 2011, Scragg R.K., 1984, Mohr, 1991). Отмечена ассоциация между уровнем ХС, ЛПНП крови и риском возникновения ЖКБ [196]. В последнее время ведутся исследования в изучении связи между повышением уровня ТГ в крови, печени и формированием холелитиаза. Так, M. Krawczyk et al. (2011) исследовали влияние полиморфизма р.1148М общего адипонутрина (PNPLA3) на уровень глюкозы и ТГ и риск возникновения ЖКБ, и не выявили взаимосвязи между ХС и холелитиазом [198].

Полученные результаты свидетельствовали о том, что у многорожавших женщин с избыточной массой тела, с сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями ЖКБ развивается в виде ХКХ с повышением ХС в крови, избыточным скоплением газов и запорами. А у лиц в возрасте старше 60-лет с сопутствующими хроническим панкреатитом, сахарным диабетом, ЖКБ развивается в виде ОКХ с нормальным уровнем ТГ в крови, тошнотой и рвотой.

В метаболизме ХС участвует множество генов [190]. Для понимания формирования холелитиаза на генетическом уровне необходимо изучение полиморфизмов генов, которые кодируют белки, участвующие в процессе формирования ЖКБ.

В рамках данного исследования проведен анализ ассоциации 4 полиморфизмов генов АРОВ-100 (*rs693*), белка липопротеинового рецептора

LRPAP1 (rs11267919), белков - транспортеров ХС *ABCG5* (rs4131229) и *ABCG8* (rs11887534) с риском формирования холелитиаза.

Все больные разделены на группу с диагнозом ХКХ и группу с ОКХ. Установлено, что у носителей аллеля $X+$ полиморфизма *rs693* гена *APOB-100*, выявленный в 50% случаев у больных и в 40,48% случаев здоровых индивидов, и генотип $rs693*X+X-$, встречающийся среди пациентов с частотой 61,70%, а в контроле – 46,38% чаще формируется ХКХ. В контрольной группе аллель $rs693*X-$ (59,52%) встречался достоверно чаще, чем в описываемой группе больных (50,00%) – $\chi^2=4,44$, $p=0,04$; $OR=0,68$; 95%CI 0,48-0,97.

Рассматривая распределение пациентов в группе с ХКХ по этническому составу отмечено, что татар было 33 (27%), русских – 56 (49%) и метисов – 5 (4%). Результаты исследования взаимосвязи *XbaI*-полиморфизма гена *APOB-100* с риском возникновения холелитиаза у ученых различны. Так, Han T. с коллегами и позднее Liu F.L. с коллегами установили ассоциацию генотипа $X+X-$ и аллеля $X+$ у больных ЖКБ из Китая чаще, чем в группе контроля [152, 207]. Исследователи также выявили взаимосвязь аллеля $X+$ с повышенным уровнем ХС в крови [84]. Исследователи из Мексики Sánchez-Cuén J. et al. в 2010 году не выявили достоверной ассоциации данного полиморфизма гена *APOB-100* с развитием ЖКБ [208]. Gong Y. et al. (2013) установили, что $X+$ гена *APOB-100* может быть взаимосвязан с холелитиазом только среди населения Китая, а гомозиготный $X+X+$ генотип может быть связан со снижением риска развития рака желчного пузыря [178].

LRPAP1 представляет собой внутриклеточный белок, связанный с рецептором (RAP), который является субъединицей ЛПНП (LRP) [92].

При исследовании полиморфизма в интроне 5 гена *LRPAP1* у больных ХКХ и ОКХ и сравнении их с лицами контрольной группы не было выявлено достоверных различий ($p>0,05$). Наши результаты согласуются с данными исследований Juzyszyn Z. et al., которые изучали взаимосвязь данного полиморфизма с развитием ЖКБ в Польше [154].

Обнаружена взаимосвязь аллеля *C* полиморфизма *rs4131229* гена *ABCG5* с риском формирования ОКХ. Носители аллеля *rs4131229 T* и генотипа *rs4131229 T/T* устойчивы к риску развития ЖКБ ($\chi^2=5,06$, $p=0,02$; $OR=0,6$; 95%CI 0,39-0,94 и $\chi^2=4,45$, $p=0,03$; $OR=0,48$; 95%CI 0,25-0,91, соответственно). Установлено, что аллель *C* полиморфного варианта *rs4131229* в гене *ABCG5* у татар является маркером повышенного риска развития заболевания. Исследователи из Китая выявили снижение уровня общего ХС, ЛПВП, ТГ и отношения АРОА1/АРОВ у носителей аллеля *rs4131229*T* гена *ABCG5* мужского пола [92].

Куо К.-К. et al. у жителей о.Тайвань моложе 50 лет с генотипом *Asp/His* полиморфного варианта *rs11887534* гена *ABCG8* обнаружили повышенный риск развития ЖКБ [184]. Результаты мета-анализа 10 исследований из Дании, Германии, Швеции, Румынии, Чили, Индии и Китая показали, что полиморфизм *Asp19His* гена *ABCG8* связан с риском развития ЖКБ [143]. Напротив, Hubacek J. A. et al. установили, что полиморфный вариант *rs11887534* гена *ABCG8* не ассоциирован с развитием данного заболевания у больных в Чехии [59]. При исследовании полиморфизма *rs11887534* гена *ABCG8*, приводящего к замене аминокислот *Asp19His* в структуре соответствующего белка, нами установлено, что указанный полиморфизм не связан с риском формирования холелитиаза.

Используя мета-анализ и анализ межгенных взаимодействий исследованных полиморфизмов генов *АРОВ-100*, *LRPAP1*, *ABCG5* и *ABCG8* у русских и татар, не удалось обнаружить статистически значимых различий между выборками пациентов с ЖКБ и контрольной группы ($p>0,05$).

Следовательно, пациентам с гиперхолестеринемией кроме базисного лечения следует применять препараты, снижающие уровень ХС для профилактики рецидивов камнеобразования [52].

На основании исследования структуры и состава желчных камней, предложена модель образования желчных камней, которая постулирует формирование центров кристаллизации из арагонита и рост арагонитных

кристаллов в радиальном направлении благодаря диффузии атомов кальция. Упорядочены клинико-лабораторные, биохимические и генетические показатели и впервые показано их влияние на риск развития ЖКБ. У татар выявлена ассоциация аллеля X^- полиморфизма *rs693* гена *АРОВ-100* и аллеля *C* полиморфизма *rs4131229* гена *ABCG5* с риском развития холелитиаза.

Определены взаимосвязи таких факторов риска в механизме развития ЖКБ, как масса тела, возраст, наличие сердечно-сосудистой патологии, многократная беременность, уровень лейкоцитов, изменения обмена липидов, уровень билирубина в крови, генотип X^+X^- гена *АРОВ-100*, которые по отдельности нашли свое подтверждение в ряде исследований [15, 17-22, 24-26, 65, 67, 206]. Известно влияние постоянных факторов (пол, возраст (свыше 40 лет), наследственность, принадлежность к определенной этнической группе) [15, 18, 20, 65, 67] и изменчивых факторов (определенный характер питания, беременность и роды для женщин, избыточная масса тела, сердечно-сосудистая патология, сахарный диабет, метаболический синдром, низкая двигательная активность, повышенный уровень ХС, ТГ в крови, прием оральных контрацептивов, клофибратов) [17, 21, 22, 24-26, 47, 206].

В ряде работ повышенный уровень ЛПНП и ЛПОНП [7, 165], снижение показателей ЛПВП и повышение уровня ТГ установлены в качестве рисков развития холелитиаза [7, 159, 183]. У носителей аллеля *rs4131229*T* гена *ABCG5* мужского пола в Китае выявлено уменьшение уровня общего ХС, ЛПВП, ТГ и отношения АРОА1/АРОВ [97]. Stender S. et al. установили взаимосвязь высоких показателей общего билирубина сыворотки крови с риском развития ЖКБ [187].

Причиной повышенного выделения ХС в желчь, накопления липидов в тканях являются мутации генов *АРОВ-100*, регулирующих транспорт жиров [108, 212]. В нашем исследовании подтверждена роль нарушений липидного обмена ЛПНП и ЛПВП, генотипа X^+X^- полиморфизма гена *АроВ-100* в развитии ЖКБ, что соответствует результатам ряда исследований,

проведенных в Китае [85]. Напротив, Sánchez-Cuén J, Aguilar-Medina M. et al. в 2001 году в Мексике не подтвердили наличия достоверной связи полиморфизма *C-7673T* гена *APOB-100* с риском формирования холелитиаза [208].

Проведенный в исследовании анализ подтверждает роль фенотипа и генотипа в формировании ЖКБ. Впервые созданы прогностические клинико-генетические модели и шкалы вероятности развития холелитиаза, ХКХ и ОКХ для проведения диагностики с целью совершенствования лечения заболевания.

Данный способ может быть использован в медицинской практике и использован при других патологиях, в связи с учетом факторов внешней среды и генетических изменений.

Данное исследование можно рассматривать как один из этапов в развитии изучения этиологии формирования и диагностики ЖКБ. В то же время, существует необходимость дальнейшего изучения влияния других полиморфизмов генов на развитие данной патологии.

Таким образом, полученные в исследовании результаты указывают на различия в клинико-генетическом формировании ХКХ и ОКХ, ассоциации факторов риска с холелитиазом, роль дислипидемии, полиморфных локусов *rs693* гена *APOB-100*, *rs11267919* гена *LRPAP1*, *rs4131229* гена *ABCG5* и *rs11887534* гена *ABCG8* с риском развития ЖКБ, выявляют ряд патогенетических моментов данной патологии. Полученные результаты исследования позволяют расширить диапазон диагностических возможностей при холелитиазе для оптимизации оказания медицинской помощи больным.

ВЫВОДЫ

1. В структуре заболеваемости населения Республики Башкортостан за период 2005-2016 гг. зарегистрирован рост общей заболеваемости желчнокаменной болезнью среди детей 0-14 лет – на 7,6%, среди девушек - на 5,9%, среди взрослых – на 18,6%. Отмечается рост первичной заболеваемости желчнокаменной болезнью среди юношей – на 23,2%, среди девушек – на 29%, и взрослых – на 29,7%. За отчетный период наблюдается рост числа холецистэктомий в 21,4 раза и снижение летальности на 0,1 %.

2. Структура желчных камней смешанного типа - радиально-слоистая и имеет четкое разделение на три области (центральную, промежуточную и периферическую). Центральная и промежуточная области образованы скоплением отдельных микросферолитов арагонита и органических веществ. Периферическая - состоит из безводного холестерина и незначительного количества арагонита. Модель формирования смешанного желчного камня характеризуется образованием центров кристаллизации из арагонита и рост арагонитных кристаллов в радиальном направлении.

3. У многорожавших женщин с избыточной массой тела, с сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями, гиперхолестеринемией, метеоризмом и запорами в подавляющем большинстве диагностирован хронический калькулезный холецистит. У лиц старше 60 лет, с тошнотой, рвотой, сопутствующими хроническим панкреатитом, сахарным диабетом, с нормотриглицеридемией - острый калькулезный холецистит.

4. Для развития хронического калькулезного холецистита маркерами повышенного риска являются аллель X^+ и гетерозиготный генотип X^+X^- полиморфного варианта *rs693* гена *АРОВ-100*, а для развития острого калькулезного холецистита – аллель C полиморфного локуса *rs4131229* гена *ABCG5*. Аллель *rs4131229 T* и генотип *rs4131229 T/T* являются маркерами пониженного риска развития желчнокаменной болезни. ДНК-локусы

rs11267919 гена *LRPAP1* и rs11887534 гена *ABCG8* не ассоциированы с риском развития холелитиаза.

5. Для этнической группы русских генотип X+X- полиморфного варианта rs693 гена *APOB-100* является маркером повышенного риска развития желчнокаменной болезни ($p=0,05$). Для этнической группы татар маркерами повышенного риска развития желчнокаменной болезни являются аллель X- полиморфного варианта rs693 гена *APOB-100* и аллель C однонуклеотидной замены rs4131229 в гене *ABCG5* ($p<0,05$).

6. К основным фено-генотипическим факторам развития желчнокаменной болезни можно отнести генотип X⁺X⁻ гена *APOB-100*, массу тела > 56 кг, уровень лейкоцитов $>6 \cdot 10^9/\text{л}$, липидные изменения (ЛПВП $\leq 1,26$ ммоль/л, ЛПНП $>1,68$ ммоль/л), уровень связанного билирубина $>2,9$ мкмоль/л, что позволило создать прогностическую клинико-генетическую модель риска развития холелитиаза; хронического калькулезного холецистита - генотип X+X- гена *APOB-100*, липидные изменения в виде ЛПВП $\leq 1,09$ ммоль/л, ЛПНП $>2,48$ ммоль/л, уровня общего холестерина >5 ммоль/л; острого калькулезного холецистита - аллель C гена *ABCG5* и фенотипические признаки: уровень связанного билирубина сыворотки крови >4 мкмоль/л, возраст > 60 лет, липидные изменения в виде ЛПВП $\leq 1,08$ ммоль/л, ЛПНП $>1,68$ ммоль/л, уровень общего холестерина >5 ммоль/л.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Структура и динамика заболеваемости болезнями органов пищеварения, в частности желчнокаменной болезни, среди населения Республики Башкортостан свидетельствуют о медико-социальной значимости данной патологии и необходимости разработки лечебно-профилактических мероприятий по повышению качества оказания медицинской помощи больным, с учетом эпидемиологической ситуации по заболеваниям желчевыводящих путей.
2. Комплексное исследование структуры и химического состава желчных камней и разработка модели их формирования открывает перспективы для изучения процессов растворения смешанных желчных камней под воздействием химических агентов на холестериновый и арагонитный составляющие конкрементов и усовершенствования литолитической терапии.
3. При обследовании больных с патологией желчного пузыря и желчевыводящих путей необходимо учитывать основные постоянные и изменчивые факторы риска желчнокаменной болезни (масса тела > 56 кг, сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания, многократные беременности, возраст старше 60 лет, уровень связанного билирубина $> 2,9$ мкмоль/л, уровень лейкоцитов) с показателями липидов сыворотки крови.
4. Для проведения индивидуализированного лечения и профилактики желчнокаменной болезни, выявления группы повышенного риска развития заболевания следует проводить определение полиморфного варианта *rs693* гена *APOB-100*, *rs4131229* гена *ABCG5*.
5. Разработанные модели для оценки вероятности развития ЖКБ и ее фенотипов могут быть использованы в организации диспансерной работы с больными гепатобилиарной патологией в реальной клинической практике по мере развития доступности технологий генотипирования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ - аланинаминотрансфераза

АРОВ - аполипопротеин В

АРОЕ – аполипопротеин Е

АСТ - аспарагинаминотрасфераза

АХАТ - ацил холестерол ацилтрансфераза

ВНОК - Всероссийское научное общество кардиологов

ГМГ-КоА-редуктаза – 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктаза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКБ – желчнокаменная болезнь

ЛПОНП - липопротеины очень низкой плотности

ЛПНП - липопротеины низкой плотности

ЛПВП - липопротеины высокой плотности

ЛППП - липопротеины промежуточной плотности

ЛХАТ – лецитин-холестерин-ацетилтрансфераза

МКБ-10 – Международная классификация 10 пересмотра

ОКХ – острый калькулезный холецистит

ПААГ – полиакриламидный гель

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПФО – Приволжский федеральный округ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РЭМ - растровый электронный микроскоп

США – Соединенные Штаты Америки

ТГ – триглицериды

ФЛ – фосфолипиды

ХКХ - хронический калькулезный холецистит

ХС – холестерин

GMDR - Generalized Multifactor-Dimensionality Reduction

OR - Odds Ratio

95%CI – Confidence interval (доверительный интервал)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боровкова, Е.В. Морфологические типы желчных камней / Е.В. Боровкова // Вестник Института геологии Коми научного центра УрО РАН. – 2004. - № 5. - С. 13-14.
2. Бурков, С.Г. Желчнокаменная болезнь (эпидемиология, патогенез, клиника) / С.Г. Бурков, А.Л. Гребнев // Руководство по гастроэнтерологии: в трех т. / под общ. ред. Ф.И. Комарова, А.Л. Гребенева. - М.: Медицина, 1995. – Т. 2. Болезни печени и билиарной системы. - С. 417-441.
3. Быстровская, Е.В. Отдаленные результаты холецистэктомии / Е.В. Быстровская, А.А. Ильченко // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2008. - № 5. – С. 23-27.
4. Влияние патологии желчевыводящих путей на риск развития ишемической болезни сердца / А.М. Шилов, И.Д. Лоранская, А.Х. Михайлова, О.Ф. Тарасенко // Русский медицинский журнал. - 2008. - Т. 16, № 25. - С. 1695-1698.
5. Вовк, Е.И. Желчнокаменная болезнь в XXI веке: лечение или профилактика? / Е.И. Вовк // Consilium medicum. Гастроэнтерология. – 2010. - № 2. – С. 4.
6. Воротынцев, А.С. Современные представления о диагностике и лечении желчнокаменной болезни и хронического калькулезного холецистита / А.С. Воротынцев // Лечащий врач. – 2012. - № 2. – С. 54-58.
7. Гаценко, В.П. Целесообразность комплексного подхода при коррекции липидных нарушений у больных желчнокаменной болезнью и холестерозом желчного пузыря / В.П. Гаценко, Е.Р. Атькова, Р.А. Иванченкова // Лечащий врач. – 2011. - № 7. – С. 15-19.
8. Голованова, О.А. Биоминералогия мочевых, желчных, зубных и слюнных камней из организма человека: автореф. дис. ... д-ра гео-

минерал. наук : 25.00.05 / Голованова Ольга Александровна. – Томск, 2009. – 39 с.

9. Голованова, О.А. Патогенное минералообразование в организме человека / О.А. Голованова // Известия Томского политехнического университета. – 2009. – Т. 315, № 3. – С. 51-56.
10. Григорьева, И.Н. Основные факторы риска желчнокаменной болезни / И.Н. Григорьева // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2007. – Т. 17, № 6. – С. 17-21.
11. Григорьева, И.Н. Роль гиперлипидемии при желчнокаменной болезни / И.Н. Григорьева, С.К. Малютина, М.И. Воевода // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. - № 4. – С. 64-68.
12. Губергриц, Н.Б. «Карнавал» желчных камней. Актовая речь (28.11.2013.) / Н.Б. Губергриц. – Донецк, 2014. – 11 с.
13. Дедерер, Ю.М. Ожирение, гиперлипидемия и желчнокаменная болезнь / Ю.М. Дедерер, Г.Г. Устинов // Клиническая медицина. - 1984. - № 10. - С. 150.
14. Дисбиоз кишечника и атерогенная дислипидемия / Н.Г. Самсонова, Л.А. Звенигородская, Е.А. Черкашова, Л.Б. Лазебник // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. - № 3. – С. 88–94.
15. Драпкина, О.М. Заболевания билиарного тракта: новые методики профилактики и лечения / О.М. Драпкина // Эффективная фармакотерапия. – 2011. - № 5. – С. 36.
16. Желчнокаменная болезнь и холецистит / М.А. Галеев, В.М. Тимербулатов, Р.М. Гарипов, И.В. Верзакова. - М.: МЕДпресс-информ, 2001. – 280 с.
17. Желчнокаменная болезнь. Современные подходы к диагностике, лечению и профилактике: пособие для врачей / Т.Э. Скворцова, С.И. Ситкин, В.Г. Радченко [и др.]. – М.: Форте принт, 2013. – 32 с.
18. Желчнокаменная болезнь: результаты собственных 20-летних исследований (часть 1: Эпидемиология, липиды крови и желчи,

- Полиморфизм аполипопротеина Е) / И.Н. Григорьева, Ю.И. Рагино, Е.В. Шахтшнейдер [и др.] // Дневник казанской медицинской школы. – 2016. - №2 (XII). - С. 18-23.
19. Иванченкова, Р.А. Патогенез холестероза желчного пузыря / Р.А. Иванченкова, А.В. Свиридов, С.В. Грачев // Клиническая медицина. - 2002. - № 2. - С. 25-28.
 20. Иванченкова, Р.А. Некоторые аспекты желчеобразования / Р.А. Иванченкова // Клиническая Медицина. – 1999. - № 7. - С. 18–22.
 21. Ивашкин, В.Т. Гастроэнтерология. Национальное руководство: краткое издание / В.Т. Ивашкин; под ред. В.Т. Ивашкина, Т.Л. Лапиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 250 с.
 22. Ивашкин, В.Т. Клинические рекомендации. Гастроэнтерология / В.Т. Ивашкин; под ред. В.Т. Ивашкина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – С. 63, 74.
 23. Изменение показателей атерогенности липопротеидов под влиянием экзогенных воздействий в зависимости от фенотипа аполипопротеина Е / Н.В. Перова, В.А. Метельская, В.Г. Бубнова [и др.] // Кардиология. - 1995. - № 4. - С. 12-17.
 24. Ильченко, А.А. Желчнокаменная болезнь / А.А. Ильченко // Лечащий врач. – 2004. - № 4. - С. 27-33.
 25. Ильченко, А.А. Желчнокаменная болезнь / А.А. Ильченко. – М.: Анахарсис, 2004. – 200 с.
 26. Ильченко, А.А. Современный взгляд на проблему билиарного сладжа / А.А. Ильченко // Русский медицинский журнал. – 2010. - Т. 18, № 28. — С. 1707–1713.
 27. Исследование элементного состава различных видов биоминеральных образований в организме человека / В.В. Поляков, А.Н. Неймарк, Г.Г. Устинов, Е.В. Петрухно // Известия Алтайского государственного университета. – 2010. - № 1-1. – С. 151-157.

28. Кармазановский, Г.Г. Лучевая диагностика и терапия в гастроэнтерологии: национальное руководство / Г.Г. Кармазановский. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 920 с.
29. Козлова, Е.В. Микробиоценоз кишечника при билиарной патологии / Е.В. Козлова, С.В. Волков // Материалы VI съезда Научного общества гастроэнтерологов России, 1-3 февраля 2006 г., Москва. – М.: Анахарсис, 2006. - С. 126–127.
30. Колесова, Т.А. Метаболические предпосылки развития заболеваний билиарной системы и поджелудочной железы (клинико-биохимическое исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.05 / Колесова Татьяна Александровна. – Уфа, 2010. – 22 с.
31. Коновалова, М.А. Болезни печени и желчевыводящих путей / М.А. Коновалова. — М.: М-Вести, 2002 — С. 376-378.
32. Лейшнер, У. Практическое руководство по заболеваниям желчных путей / У. Лейшнер. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 264 с.
33. Лисицын, Ю.П. Здравоохранение в XX веке / Ю.П. Лисицын. – М.: Медицина, 2002. – 216 с.
34. Литолитическая терапия у больных желчнокаменной болезнью / В.М. Короваев, Т.Э. Скворцова, О.М. Жорина [и др.] // Рынок БАД. - 2009. - № 1 (47). — С. 25-29.
35. Лузина, Е.В. Патогенетическая роль нарушений обмена липидов и их перекисидации при заболеваниях желчевыводящих путей у жителей Забайкалья: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.16 / Лузина Елена Владимировна. — Иркутск, 2000. — 24 с.
36. Мансуров, Х.Х. О ведущих механизмах развития и прогрессирования холестеринового холелитиаза / Х.Х. Мансуров // Клиническая медицина. - 1991. - № 9. - С. 17-21.
37. Мараховский, Ю.Х. Желчнокаменная болезнь: на пути к диагностике ранних стадий патологического процесса в желчном пузыре / Ю.Х.

- Мараховский // Российский Журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1994. - № 4. – С. 6–19.
38. Мараховский, Ю.Х. Желчнокаменная болезнь: современное состояние проблемы / Ю.Х. Мараховский // Российский Журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2003. – Т. 13, № 1. – С. 81–92.
 39. Мараховский, Ю.Х. Профилактика и ранняя диагностика желчнокаменной болезни / Ю.Х. Мараховский // Российский Журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1997. - № 1. – С. 62–72.
 40. Медведева, В.Н. Атеросклероз брюшной аорты и сонных артерий и его корреляция с содержанием липидов в сыворотке крови при желчнокаменной болезни / В.Н. Медведева, С.И. Курицина, В.Н. Медведев // Кардиология. – 2003. – Т. 37, № 8. – С. 40–45.
 41. Метаболические факторы защиты коренного населения Севера при ИБС и холелитиазе / В.В. Цуканов, К.Г. Ноздрачев, Ю.Л. Тонких [и др.] // Бюллетень СО РАМН. — 2006. — Т. 2. — С. 100–104.
 42. Механизм обратного транспорта холестерина и холелитиаз у северных народностей / В.В. Цуканов, К.Г. Ноздрачев, Ю.Л. Тонких [и др.] // Клиническая медицина. — 2007. — Т. 85, № 2. — С. 33–35.
 43. Микроструктура желчных камней по данным цветной катодолюминисцентной растровой электронной микроскопии / А.С. Логинов, С.М. Чебанов, Г.В. Сапарин [и др.] // Российский гастроэнтерологический журнал. – 1998. - № 4. - С. 26-29.
 44. Митьков, В.В. Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике / В.В. Митьков. - М.: "Видар", 1996. – 20 с.
 45. Окорочков, А.Н. Диагностика болезней внутренних органов / А.Н. Окорочков. - М.: Мед. лит., 2005. – Т. 1. Диагностика болезней органов пищеварения. - 560 с.

46. Пальцев, А.И. Патология билиарного тракта у лиц пожилого возраста с позиций системного подхода. Принципы терапии / А.И. Пальцев, А.А. Еремина, Е.Н. Горбунова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2011. - № 4. – С. 48-54.
47. Панин, Л.Е. Рациональное питание на Севере — основа первичной профилактики / Л.Е. Панин // Проблемы современного социального развития народностей Севера. — Новосибирск, 1987. — С. 223–230.
48. Панфилов, Б.К. Билиарно–кардиальный синдром — холециститное сердце / Б.К. Панфилов. – М., 1986. – 241 с.
49. Панфилов, Б.К. Роль терапевта в хирургии холецистита / Б.К. Панфилов // Хирургия. – 1995. – № 1. – С. 34–36.
50. Петухов, В.А. Желчнокаменная болезнь и беременность: причинно-следственные взаимосвязи / В.А. Петухов, М.Р. Кузнецов, С.В. Лисин // Анналы хирургии. — 1998. — Т. 2. — С. 14–21.
51. Полиенко, А.К. Онтогенез уrolитов / А.К. Полиенко, Г.В. Шубин, В.А. Ермолаев. - Томск, 1997.
52. Полунина, Т.Е. Хронический холецистит / Т.Е. Полунина, Е.В. Полунина // Лечащий врач. – 2008. - № 4. – С. 9-12.
53. Пригун, Н.П. Нейрохирургические методы лечения желчнокаменной болезни / Н.П. Пригун // Взгляд в прошлое, оценка настоящего и проблемы будущего медикаментозной терапии в гастроэнтерологии. – Смоленск; М., 1994. - С. 319-322.
54. Резолюция Экспертного совета «Современный взгляд на проблему постхолецистэктомического синдрома» / В.Т. Ивашкин, А.В. Охлобыстин, Д.С. Бордин и др., Международный комитет экспертов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2017. - 27(6). – С. 96-108.
55. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению желчнокаменной болезни / В.Т. Ивашкин, И.В.

- Маев, Е.К. Баранская и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2016. - № 3. – С. 64-80.
56. Розанов, Б.С. Холестероз желчного пузыря / Б.С. Розанов, В.А. Пенин. - М.: Медицина, 1973. – 119 с.
 57. Ройтберг, Г.Е. Внутренние болезни. Сердечно-сосудистая система / Г.Е. Ройтберг, А.В. Струтынский. - М.: «Издательство БИНОМ», 2007. – 865 с.
 58. Ройтберг, Г.Е. Лабораторная и инструментальная диагностика заболеваний внутренних органов / Г.Е. Ройтберг, А.В. Струтынский. – М.: ЗАО «Издательство БИНОМ», 1999. – 622 с.
 59. Свиридов, А.С. Холестероз желчного пузыря. Патогенез, лечение: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.47 / Свиридов Александр Валентинович. - М., 2001. – 21 с.
 60. Творогова, М.Г. Аполипопротеины крови, диагностическое значение и методы определения / М.Г. Творогова, В.Н. Титов // Клиническая лабораторная диагностика. — 1993. — № 2. — С. 4-10.
 61. Творогова, М.Г. Обратный транспорт холестерина / М.Г. Творогова // Кардиология. - 2001. - № 2. - С. 66-71.
 62. Тертов, В.В. Белок-связанные липиды в липопротеидах низкой плотности человека / В.В. Тертов, В.В. Каплун, А.Н. Орехов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1995. - № 8. - С. 155-158.,
 63. Трэвис, С.П.Л. Гастроэнтерология / С.П.Л. Трэвис, Р.Х. Тэйлор, Д.Д. Мисевич. - М.: Мед. литература, 2002. – 279 с.
 64. Устинов, Г.Г. Исследование структуры желчных камней с помощью электронной сканирующей микроскопии / Г.Г. Устинов, В.В. Поляков, Е.В. Петрухно // Вестник АНЦ САН ВШ. – 2009. - № 9. – С. 71-77.
 65. Холестероз желчного пузыря (клиника, диагностика, лечение) / Р.А. Иванченкова, Т.Ф. Измайлова, Т.Ф. Лемина [и др.] // Клиническая медицина. - 1997. - № 5. - С. 46-52.

66. Хохлачева, Н.А. Возрастные и гендерные особенности развития желчнокаменной болезни / Н.А. Хохлачева, Н.Н. Сергеева, Я.М. Вахрушев // Архив внутренней медицины. – 2016. - № 1 (27). – С. 34-39.
67. Циммерман, Я.С. Гастроэнтерология: руководство / Я.С. Циммерман. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2013. – 800 с.
68. Циммерман, Я.С. Хронический холецистит и хронический панкреатит / Я.С. Циммерман. – Пермь, 2002.
69. Шарашкина, Н.В. Нарушения метаболизма липидов при хронических заболеваниях желчевыводящих путей: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.47 : 14.00.05 / Шарашкина Наталья Викторовна. – М., 2005. – 22 с.
70. Щербинина М. Б. Современная классификация желчнокаменной болезни / М. Б. Щербинина // Здоров'я України. – 2011. – С. 22-23.
71. Шерлок, Ш. Заболевания печени и желчных путей: пер. с англ. / Ш. Шерлок, Дж. Дули. – М., 1999. - 864 с.
72. Юргенсон, Г.А. Состав и строение желчных камней человека / Г.А. Юргенсон, Г.А. Мироненко // Клиническая медицина. – 1979. - № 3. - С. 73-79.
73. Яковенко, Э.П. Механизмы желчеобразования и желчегонные препараты / Э.П. Яковенко, Н.А. Агафонова // Русский медицинский журнал. Болезни органов пищеварения. – 2005. – Т. 7, № 1. - С. 43-49.
74. A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease / S. Buch, C. Schafmayer, H. Völzke [et al.] // Nat. Genet. – 2007. – Vol. 39. – P. 995–999.
75. A paraoxonase gene polymorphism, PON 1 (55), as an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in middle-aged women / G. Fortunato, P. Rubba, S. Panico [et al.] // Atherosclerosis. - 2003. – Vol. 167, № 1. - P. 141-8.
76. A prospective study of symptomatic gallstones in women: relation with oral contraceptives and other risk factors / F. Grodstein, G.A. Colditz, D.J. Hunter [et al.] // Obstet. Gynecol. - 1994. - Vol. 84. - P. 207-214.

77. Acalculous biliary tract disorders: the value of fatty meal-cholescintigraphy / B.R. Gunna, G.R. Yannam, N. Kavita [et al.] // Surgeon. - 2003. - Vol. 1, № 5. - P. 293-298.
78. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters / K.E. Berge, H. Tian, G.A. Graf [et al.] // Science. - 2000. - Vol. 290. - P. 1771-1775.
79. An increased familial frequency of gallstones / T. Gilat, C. Feldman, Z. Halpern [et al.] // Gastroenterology. - 1983. - Vol. 84. - P. 242-246.
80. Analysis of the human LRPAP1 gene coding for the lipoprotein receptor – associated protein: identification of 22 polymorphisms and one mutation / F. Van Leuven, E. Thirty, L. Stas, B. Neilissen // Genomics. - 1998. - Vol. 52. - P. 145–51.
81. ApoB-100, ApoE and CYP7A1 gene polymorphisms in Mexican patients with cholesterol gallstone disease / J. Sánchez-Cuén, M. Aguilar-Medina, E. Arámbula-Meraz [et al.] // World J. Gastroenterol. - 2010. - Vol. 16, Issue 37. - P. 4685-4690.
82. Apolipoprotein B (apo B) signal length polymorphisms are associated with apo B, low density lipoprotein cholesterol, and glucose levels in Mexican Americans / C.M. Kammerer, J.L. Van de Berg, S.M. Haffner, J.E. Hixson // Atherosclerosis. - 1995. - Vol. 120. - P. 37-45.
83. Apolipoprotein B gene DNA polymorphisms are associated with macro- and microangiopathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus / O. Ukkola, M.J. Savolainen, P.I. Salmela [et al.] // Clin. Genet. - 1993. - Vol. 44. - P. 177–184.
84. Apolipoprotein B-100 gene Xba I polymorphism and cholesterol gallstone disease / T. Han, Z. Jiang, G. Suo, S. Zhang // Clin. Genet. - 2000. - Vol. 57. - P. 304–308.
85. Apolipoprotein E genotype and gallbladder motility influence speed of gallstone clearance and risk of recurrence after extracorporeal shock-wave

- lithotripsy / P. Portincasa, K.J. van Erpecum, P.C. van de Meeberg [et al.] // *Hepatology*. — 1996. — Vol. 24. — P. 580-587.
86. Apolipoprotein E polymorphisms in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations / C. Enholm, M. Lukka, T. Kaussi [et al.] // *J. Lipid Res.* - 1986. - Vol. 27. - P. 227-235.
 87. Apolipoprotein E Polymorphism and Gallstones / A. Bertomeu, E. Rros, D. Zambon [et al.] // *Gastroenterology*. - 1996. - Vol. 111. - P. 1603-1610.
 88. Apolipoprotein E polymorphism and insulin levels in a biethnic population / R. Valdez, B.V. Howard, M.P. Stern, S.M. Haffner // *Diabetes Care*. — 1995. — Vol. 18. — P. 992-1000.
 89. Apolipoprotein E: genetic variants provide insights into its structure and function. (Review) / R.W. Mahley, T.L. Innerarity, S.C. Rail [et al.] // *Curr. Opin. Lipidol.* - 1990. - Vol. 1. - P. 87-95.
 90. Are plasma lipid levels related to ABCG5/ABCG8 polymorphisms? A preliminary study in siblings with gallstones / M. Acalovschi, A. Ciocan, O. Mostean [et al.] // *Eur. J. Intern. Med.* - 2006. - Vol. 17. - P. 490-494.
 91. Association of low density lipoprotein receptor related protein-associated protein (LRPAP1) gene insertion/deletion polymorphism with gallstone disease / M. Dixit, C. Gourdas, L.J. Keshri, B. Mittal // *J. Gastroenterol. Hepatol.* - 2006. - Vol. 21. - P. 847-849.
 92. Association of the insertion/deletion gene polymorphism of the apolipoprotein B signal peptide with myocardial infarction / A. Gardemann, D. Ohly, M. Fink [et al.] // *Atherosclerosis*. - 1998. - Vol. 141, № 1. - P. 167-75.
 93. Atherogenic lipoprotein phenotype A proposed genetic marker for coronary heart disease risk / M.A. Austin, M. King, K.M. Vranizan, R.M. Krauss // *Circulation*. - 1990. - Vol. 82. - P. 495-506.
 94. ATP binding cassette G5 C1950G polymorphism may affect blood cholesterol concentrations in humans / R.M. Weggemans, P.L. Zock, E.S. Tai [et al.] // *Clin. Genet.* - 2002. - Vol. 62. - P. 226-229.

95. ATP binding cassette G8 T400K polymorphism may affect the risk of gallstone disease among Chinese males / Y. Wang, Z.Y. Jiang, J. Fei [et al.] // Clin. Chim. Acta. – 2007. – Vol. 384. – P. 80–85.
96. ATP-Binding Cassette Transporter G5 and G8 Polymorphisms and Several Environmental Factors with Serum Lipid Levels / Q. Li, R.-X. Yin, X.-L. Wei [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, Issue 5. - P. 372-379.
97. Bacterial DNA in mixed cholesterol gallstones / D.K. Lee, P.I. Tarr, W.G. Haigh, S.P. Lee // Am. J. Gastroenterol. – 1999. – Vol. 94. – P. 3502-3506.
98. Beisiegel, U. An apolipoprotein homolog of rat apolipoprotein A IV in human plasma: isolation and partial characterization / U. Beisiegel, G. Utermann // Eur. J. Biochem. - 1979. - Vol. 93. - P. 601-608.
99. Berr, F. Bile acid kinetics in cholesterol gallstone disease / F. Berr, E. Pratschke, G. Paumgartner // Bile Acids as Therapeutic Agents / eds G. Paumgartner, A. Stiehl, W. Gerok. – Dordrecht; Boston; London, 1990. - P. 139-144.
100. Biliary lipid composition in normo- and hyperlipoproteinemia / J. Ahlberg, B. Angelin, K. Einarsson [et al.] // Gastroenterology. - 1980. - Vol. 79. - P. 90-94.
101. Breslow, J.L. Apolipoprotein genetic variation and human disease / J.L. Breslow // Physiol. Rev. - 1988. - Vol. 68. - P. 85-132.
102. Brewer, H.B. High-density lipoprotein: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease / H.B. Brewer // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2004. – Vol. 24. – P. 387-391.
103. Carey, M.C. Whither biliary sludge? / M.C. Carey, M.J. Cahalane // Gastroenterology. - 1988. - Vol. 95. - P. 508-523.
104. Characteristics of ten charge- differing supfractions isolated of human native low density lipoprotein. No evidence of peroxidative modifications / B. Chappey, I. Myara, M.O. Benoit [et al.] // Biochim. Biophysica Acta. - 1995. - Vol. 1259. - P. 261-270.
105. Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic canine beta-very

- low density lipoproteins / J.L. Goldstein, Y.K. Yo, M.S. Brown [et al.] // J. Biol. Chem. - 1980. - Vol. 255. - P. 1839-1848.
106. Chromosomal localization of human genes for the LDL receptor gene family member glycoprotein 330 (LRP2) and its associated protein RAP (LRPAP1) / J.R. Korenberg, K.M. Argraves, X.N. Chen [et al.] // Genomics. – 1994. – Vol. 22. – P. 88–93.
 107. Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinemia / D. Sharp, L. Blinderman, K.A. Combs [et al.] // Nature. - 1993. - Vol. 365. — P. 65-69.
 108. Common haplotypes of the ABCG5/G8 genes encoding the hepatocanalicular cholesterol transporter are associated with cholecystolithiasis / F. Lammert, H.E. Wasmuth, N. Mendez-Sanchez [et al.] // Bile acid biology and its therapeutic implications. XVIII International Bile Acid Meeting, June 18-19, 2004, Stockholm. – Stockholm, 2004. - P. 56.
 109. Compositional differences of low density lipoprotein particles in normal subjects with low density lipoprotein subclasses phenotype A and low density lipoprotein subclasses phenotype B / W.H. Capell, A. Zambon, M.A. Austin [et al.] // Arterioscler. Thromb. - 1996. – Vol. 16. - P. 1040-1046.
 110. Davignon, J. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis / J. Davignon, R.E. Gregg, C.E. Sing // Arteriosclerosis. - 1988. – Vol. 8. - P. 1-21.
 111. Diehl, A.K. Epidemiology and natural history of gallstone disease / A.K. Diehl // Gastroenterol. Clin. North Am. – 1991. – Vol. 20, № 1. – P. 1–19.
 112. Discrete subspecies of human low density lipoproteins and heterogeneous in their interaction with cellular LDL receptor / F. Nigon, P. Lesnik, M. Rouis, M.J. Chapman // J. Lipid. Res. - 1991. - Vol. 32. - P. 1741-1753.
 113. Disruption of Abcg5/Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion / L. Yu, R.E. Hammer, J. Li-Hawkins [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sei. - 2002. – Vol. 99. - P. 16237-16242.

114. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene are associated with altered plasma lipoprotein concentrations but not with perceived risk of cardiovascular disease: European Atherosclerosis Research Study / P.R. Turner, P.J. Talmud, S. Visvikis [et al.] // *Atherosclerosis*. – 1995. – Vol. 116. – P. 221–234.
115. EASL Clinical Practice Guidelines on the prevention, diagnosis and treatment of gallstones / F. Lammert, M. Acalovschi, G. Ercolani, [et al.] // *J. Hepatology*. – 2016. - Vol. 65. – P.146–181.
116. Einarsson, K. Influence of age on secretion of cholesterol and synthesis of bile acids by the liver / K. Einarsson, K. Nilsell, B. Angelin // *N. Engl. J. Med.* – 1985. – Vol. 313. – P. 277–282.
117. Epidemiology of cholelithiasis in the PimaIndians / W.C. Knowler, M.J. Carraher, D.J. Pettitt, P.H. Bennett // *Epidemiology and prevention of gallstone disease*. – Lancaster–Boston–Hague–Dordrecht: MTP Press Limited, 1984. – P. 15–22.
118. Epidemiology of gallstone disease in Italy: prevalence data of the Multicenter Italian study on Cholelithiasis (M.I.COL.) / A.F. Attili, N. Carulli, E. Roda [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* – 1995. – Vol. 141, № 2. – P. 158–165.
119. Evidence for substantial effect modification by gender in a large scale genetic association study of the metabolic syndrome among the coronary heart disease patients / J.J. McCarthy, J. Meyer, D.J. Moliterno [et al.] // *Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 114. - P. 87–98.
120. Fainaru, M. Diurnal heterogeneity in structure and function of low density lipoprotein of normalipidemic males / M. Fainaru, D. Gavish, Z. Schater // *Israel J. Med. Sci.* - 1996. - Vol. 32. - P. 454-464.
121. Familial apolipoprotein E deficiency and type III hyperlipoproteinemia due to a premature stop codon in the apolipoprotein E gene / P. Lohse, B.H. Brewer, M.S. Meng [et al.] // *J. Lipid Res.* - 1992. - Vol. 33, № 5. - P. 1583-1589.

122. Farese, R.V. Apolipoprotein B gene mutations affecting cholesterol levels / R.V. Farese, M.F. Linton, S.G. Young // *J. Intern. Med.* - 1992. – Vol. 231. - P. 643-652.
123. Feng, D. Polymorphism at the LDL receptor gene locus in patients with cholesterol gallstone disease / D. Feng, T. Han, S. Chen // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 1998. – Vol. 78. – P. 63-65.
124. Fenofibrate and LDL metabolic heterogeneity in hypercholesterolemia / M.J. Caslake, C.J. Packard, N. Gaw [et al.] // *Arterioscler. Thromb.* - 1993. - Vol. 13. - P. 702-713.
125. Figge, A. Molecular genetics of cholesterol cholelithiasis: identification of human and murine gallstone genes / A. Figge, S. Matern, F. Lammert // *Z. Gastroenterol.* – 2002. – Vol. 40, № 6. – P. 425–432.
126. Gallbladder disease is associated with insulin resistance in a high risk Hispanic population / F. Nervi, J.F. Miquel, M. Alvarez [et al.] // *J. Hepatol.* – 2006. – Vol. 45. – P. 299-305.
127. Gallstones: genetics versus environment / A. Nakeeb, A.G. Comuzzie, L. Martin [et al.] // *Ann. Surg.* – 2002. – Vol. 235, № 6. – P. 842–849.
128. Gram-positive cocci are associated with the formation of completely pure cholesterol stones / M. Kawai, M. Iwahashi, K. Uchiyama [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2002. – Vol. 97. – P. 83-88.
129. Hepatic insulin resistance directly promotes formation of cholesterol gallstones / S.B. Biddinger, J.T. Haas, B.B. Yu [et al.] // *Nat. Med.* – 2008. – Vol. 14. – P. 778-782.
130. Hepatitis C virus infection facilitates gallstone formation / T.S. Chang, S.K. Lo, H.Y. Shyr [et al.] // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2005. – Vol. 20. – P. 1416-1421.
131. High familial prevalence of gallstones in the firstdegree relatives of gallstone patients / S.K. Sarin, V.S. Negi, R. Dewan [et al.] // *Hepatology.* — 1995. — Vol. 22, № 1. — P. 138-141.

132. Human cholesterol 7 α hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype / C.R. Pullinger, C. Eng, G. Salen [et al.] // J. Clin. Invest. – 2002. – Vol. 110. – P. 109-117.
133. Impaired human gallbladder lipid absorption in cholesterol solubility in bile / S.G. Corradini, W. Elisei, L. Giovanelli [et al.] // Gastroenterology. – 2000. – Vol. 118. – P. 912 – 920.
134. In vivo metabolism of apolipoprotein A-IV and A-I associated with high density lipoprotein in normolipidemic subjects / C.I. Malmendier, J.F. Lontie, L. Lagrost [et al.] // J. Lipid Res. - 1991. - Vol. 32, № 4. - P. 801-807.
135. Increased gallstone risk in humans conferred by common variant of hepatic ATP-binding cassette transporter for cholesterol / F. Gruhage, M. Acalovschi, S. Tirziu [et al.] // Hepatology. – 2007. – Vol. 46. – P. 793–801.
136. Increased high density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation / A. Inazu, M. Brown, C. Hesler [et al.] // N. Engl. J. Med. - 1990. - Vol. 323. - P. 1234-1238.
137. Increased high density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation / S. Yamashita, D. Sprecher, N. Sakai [et al.] // J. Clin. Invest. - 1990. - Vol. 86. - P. 688-695.
138. Independent risk factors for gallstone formation in a region with high cholelithiasis prevalence / H. Völzke, S.E. Baumeister, D. Alte [et al.] // Digestion. – 2005. – Vol. 71. – P. 97-105.
139. Insulin resistance causes human gallbladder dysmotility / A. Nakeeb, A.G. Comuzzie, H. Al-Azzawi [et al.] // J. Gastrointest. Surg. – 2006. – № 10. – P. 940-948.
140. Insulin suppresses bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes by down-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase gene transcription / J. Twisk, M.F. Hoekman, E.M. Lehmann [et al.] // Hepatology. – 1995. – Vol. 21. – P. 501-510.

141. Investigation of LDL supfractions as a coronary risk factor in normotriglyceridemic men / I. Rajman, M.J. Kendall, R. Cramb [et al.] // *Atherosclerosis*. - 1996. - Vol. 125. - P. 231-242.
142. Ioannou, Y.A. Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport / Y.A. Ioannou // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2001. - Vol. 2. - P. 657 -668.
143. Jiang, Z.-Y. Association of Three Common Single Nucleotide Polymorphisms of ATP Binding Cassette G8 Gene with Gallstone Disease: A Meta-Analysis / Z.-Y. Jiang, Q. Cai, E.-Z. Chen // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. e87200. doi:10.1371/journal.pone.0087200
144. Judd, E.S. Cholesterosis of the gallbladder / E.S. Judd, S.H. Mentzer // *Calif. West. Med.* - 1927. - Vol. 17. - P. 337-346.
145. Katsuya, T. Epsilon 4 allele of apolipoprotein E gene associates with lower blood pressure in young Japanese subjects: The Suita Study / T. Katsuya, S. Baba, K. Ishikawa // *J. Hypertens.* — 2002. — Vol. 20, № 10. — P. 2017-2021.
146. Kesaniemi, Y.A. Intestinal cholesterol absorbtion efficiency is related to apolipoprotein E phenotype / Y.A. Kesaniemi, C. Ehnholm, T.A. Miettinen // *J. Clin. Invest.* — 1987. — Vol. 80. — P. 578-581.
147. Ko, C.W. Risk factors for gallstone-related hospitalization during pregnancy and the postpartum / C.W. Ko // *Am. J. Gastroenterol.* – 2006. – Vol. 101. – P. 2263-2268.
148. Konnel, W. Hipertension and other risk factors in coronary heart disease / W. Konnel // *Amer. Heart J.* – 1987. – Vol. 114, № 4. – P. 918–925.
149. Lammert, F. Chromosomal localization of candidate genes involved in cholesterol gallstone formation: a murine gallstone map / F. Lammert, M.C. Carey, B. Paigen // *Gastroenterology*. – 2001. – Vol. 120. – P. 221–38.
150. Lammert, F. The genetic background of cholesterol gallstone formation: an inventory of human lithogenic genes / F. Lammert, S. Matern // *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* – 2005. – № 5. – P. 163-170.

151. Lee, J. Reverse cholesterol transport in cultured gallbladder epithelial cells / J. Lee, H.S. Choi // *Korean J. Gastroenterol.* - 2004. - Vol. 43, № 3. - P. 145-152.
152. Liu, F.L. Xba I polymorphisms of apolipoprotein B gene: Another risk factor of gallstone formation after radical gastrectomy / F.L. Liu, W.B. Lu, W.X. Niu // *World J. Gastroenterol.* - 2010. - Vol. 16. - P. 2549-2553.
153. Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gallbladder and intestine / E.L. Klett, M.H. Lee, D.B. Adams [et al.] // *BMC Gastroenterol.* - 2004. - № 4. - P. 21.
154. Low-density lipoprotein receptor-related protein-associated protein (LRPAP1) gene IVS5 insertion/deletion polymorphism is not a risk factor for gallstone disease in a Polish population / Z. Juzyszyn, M. Kurzawski, A. Modrzejewski [et al.] // *Dig. Liver Dis.* - 2008. - Vol. 40, № 2. - P. 122-125.
155. Mahley, R.W. Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with expanding Role in Cell Biology / R.W. Mahley // *Science*. - 1988. - Vol. 240. - P. 622-630.
156. Mathew, C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA / C.C. Mathew // *Methods in molecular biology* / ed. J.M. Walker. - N.Y.: Haman press, 1984. - Vol. 2. - P. 31-34.
157. Metabolic syndrome as a risk factor for gallstone disease / N. Méndez-Sánchez, N.C. Chavez-Tapia, D. Motola-Kuba [et al.] // *World J. Gastroenterol.* - 2005. - № 11. - P. 1653-1657.
158. Miettinen, T.A. Impact of Apo E phenotype on the regulation of cholesterol metabolism / T.A. Miettinen // *Ann. Med.* - 1991. - Vol. 23. - P. 181-186.
159. Mittal, B. Genetics of gallstone disease / B. Mittal, R.D. Mittal // *J. Postgrad Med.* - 2002. - Bd. 48. - S. 149-152.
160. Mohr, G.C. Plasma lipids and gallbladder disease / G.C. Mohr, D. Kritz-Silverstein, E. Barrette-Connor // *Am. J. Epidemiol.* - 1991. - Vol. 134. - P. 78-85.

161. Norum, K.R. Familial lecetin cholesterol acyl- transferase deficiency including fish eye disease / K.R. Norum, E. Gjone, J.A. Glomset // The metabolic basis of inherited disease / ed. C.R. Scriver. – N.Y.: Mc-Graw Hill, 1989. – P. 1-181.
162. Novacek, G. Gender and gallstone disease / G. Novacek // Wien Med. Wochenschr. – 2006. – Bd. 156. – S. 527-533.
163. Overexpression of human lipoprotein lipase in transgenic mice / M. Shimada, H. Shimano, T. Gotoda [et al.] // J. Biol. Chem. - 1993. - Vol. 268. - P. 17924-17929.
164. Paigen, B. Gallstones / B. Paigen, M.C. Carey // The genetic basis of common diseases. – 2nd ed. – Oxford: University Press, 2002. – P. 298–335.
165. Pediatric gallstone disease in familial hypobetalipoproteinemia / S. Lancellotti, M. Zaffanello, E. Di Leo [et al.] // J. Hepatol. – 2005. – Vol. 43. – P. 188-191.
166. Polymorphisms at cholesterol 7 α -hydroxylase, apolipoproteins B and E and low density lipoprotein receptor genes in patients with gallbladder stone disease / Z.Y. Jiang, T.Q. Han, G.J. Suo [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2004. – Vol. 10, № 10. – P. 1508-1512.
167. Polymorphisms at the apo B, apo A-I, and cholesteryl ester transfer protein gene loci in patients with gallbladder disease / T. Juvonen, M.J. Savolainen, M.I. Kairaluoma [et al.] // J. Lipid Res. – 1995. – Vol. 36. – P. 804–812.
168. Portincasa, P. From lipid secretion to cholesterol crystallization in bile. Relevance in cholesterol gallstone disease / P. Portincasa, A. Moschetta, G. Palasciano // Ann. Hepatol. – 2002. – Vol. 1, № 3. – P. 121–128.
169. Prieur, X. The human apolipoprotein A5 gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- α and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element / X. Prieur, H. Coste, J.C. Rodriguez // J. Biol. Chem. - 2003. - Vol. 278, № 28. - P. 25468-25480.
170. Rader, D. High-density lipoproteins as an emerging therapeutic target for atherosclerosis / D. Rader // JAMA. - 2003. – Vol. 290, № 17. - P. 2322-2324.

171. Reichl, D. Pathophysiology of reverse cholesteroltransport. Insights from inherited disorders of lipoprotein metabolism / D. Reichl, N.E. Miller // *Arteriosclerosis*. – 1989. – № 9. – P. 785-97.
172. Relation between the insertion/deletion polymorphism in the gene encoding for receptor associated protein (RAP) and plasma apolipoprotein A-I (apo A-I) and high density lipoprotein cholesterol (HDL) levels / P. Bense, J. Muzik, J. Benedik [et al.] // *Clin. Genet*. – 2000. – Vol. 57. – P. 309–10.
173. Relations between plasma lipids and postheparin plasma lipases and VLDL and LDL subfraction patterns in normolipid men and women / C.E. Tan, L. Forester, M.J. Caslake [et al.] // *Arterioscler. Thromb.* - 1995. – Vol. 15. - P. 1839-1848.
174. Reshetnyak, V.I. Concept of the pathogenesis and treatment of cholelithiasis / V.I. Reshetnyak // *World J. Hepatol.* - 2012. – Vol. 4. – P. 18-34.
175. RFLP for the human apolipoprotein B gene: V; Xba I / L. Priestley, T. Knott, S. Wallis [et al.] // *Nucleic Acid Res.* – 1985. – Vol. 13. – P. 6793.
176. Risk factors of familial gallstone disease: study of 135 pedigrees / J. Qin, T.Q. Han, J. Fei [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. – 2005. – Vol. 85. – P. 1966-1969.
177. Role of the ABCG8 19H risk allele in cholesterol absorption and gallstone disease / O. Renner, D. Lütjohann, D. Richter [et al.] // *BMC Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 13. – P. 30.
178. Roles of ApoB-100 Gene Polymorphisms and the Risks of Gallstones and Gallbladder Cancer: A Meta-Analysis / Y. Gong, L. Zhang, P. Bie, H. Wang // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8, № 4. – P. e61456. doi:10.1371/journal.pone.0061456
179. Ruhl, C.E. Association of diabetes, serum insulin, and C-peptide with gallbladder disease / C.E. Ruhl, J.E. Everhart // *Hepatology*. – 2000. – Vol. 31. – P. 299-303.
180. Schneider, H. In vitro effects of cholecystokinin fragments on human gallbladders. Evidence for an altered CCK-receptor structure in a subgroup of

- patients with gallstones / H. Schneider, P. Sanger, E. Hanisch // J. Hepatol. – 1997. – Vol. 26. – P. 1063-1068.
181. Scragg, R.K. Plasma lipids and insulin in gallstone disease: A case-control study / R.K. Scragg, G.D. Calvert, J.R. Oliver // Br. Med. J. – 1984. – Vol. 289. – P. 521-5.
 182. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester protein / K.R. Marotti, C.K. Castle, T.P. Boyle [et al.] // Nature. - Vol. 364. - P. 73-75.
 183. Shaffer, E.A. Gallstone disease: Epidemiology of gallbladder stone disease / E.A. Shaffer // Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 20, № 6. – P. 981–996.
 184. Significant association of ABCG5 604Q and ABCG8 D19H polymorphisms with gallstone disease / K.-K. Kuo, S.-J. Shin, Z.-C. Chen [et al.] // Br. J. Surg. – 2008. – Vol. 95. – P. 1005–1011.
 185. Small, D.M. Role of ABC transporters in secretion of cholesterol from liver into bile / D.M. Small // Proc. Nat. Acad. Sci. - 2003. - Vol. 100. - P. 4-6.
 186. Somien, G.L. A non-micellar mode of cholesterol transport in human bile / G.L. Somien, T. Gibat // FEBS. – 1983. – Vol. 156, № 2. – P. 265-268.
 187. Soutar, A.K. Familial hypercholesterolemia and LDL receptor mutations / A.K. Soutar // J. Intern. Med. - 1992. - Vol. 231. - P. 633-641.
 188. Sterol Transporter Adenosine Triphosphate–Binding Cassette Transporter G8, Gallstones, and Biliary Cancer in 62,000 Individuals from the General Population / S. Stender, R. Frikke-Schmidt, B.G. Nordestgaard, A. Tybjaerg – Hansen // Hepatology. – 2011. - Vol. 53, № 2. - P. 640-648.
 189. Stinton, L.M. Epidemiology of Gallbladder Disease: Cholelithiasis and Cancer / L.M. Stinton, E.A. Shaffer // Gut Liver. – 2012. - Vol. 6, № 2. - P. 172-187.
 190. Stinton, L.M. Epidemiology of gallstones / L.M. Stinton, R.P. Myers, E.A. Shaffer // Gastroenterol. Clin. North Am. – 2010. – Vol. 39. – P. 157-169.
 191. Structure of the human apolipoprotein B gene / B.D. Blackhart, E.M. Ludwig, V.R. Pierotti [et al.] // J. Biol. Chem. – 1986. – Vol. 261. – P. 15364–15367.

192. Study on the position of genes responsible for gallstone disease in Chinese population / J. Qin, T.Q. Han, W.T. Yuan [et al.] // *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* – 2006. – Vol. 44. – P. 485–487.
193. Subcellular localization and endocytic function of low density lipoprotein receptor-related protein in human glioblastomas cells / G. Bu, E.A. Maksymovitch, H. Geuze, A.L. Schwartz // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 29874–82.
194. Tauscher, A. ABCG5 and ABCG8 are expressed in gallbladder epithelial cells / A. Tauscher, R. Kuver // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 307. – P. 1021–8.
195. The ABCG5 polymorphism contributes to individual responses to dietary cholesterol and carotenoids in eggs / K.L. Herron, M.M. McGrane, D. Waters [et al.] // *J. Nutrit.* – 2006. – Vol. 136. – P. 1161–1165.
196. The aetiology of symptomatic gallstones quantification of the effects of obesity, alcohol and serum lipids on risk. Epidemiological and biomarker data from a UK prospective cohort study (EPIC-Norfolk) / P.J. Banim, R.N. Luben, H. Bulluck [et al.] // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* — 2011. — Vol. 23, № 8. — P. 733-40.
197. The apolipoprotein (a) resides on human chromosome 6q2.6-2.7 in close proximity to the homologous gene for plasminogen / S.L. Frank, I. Klisak, R.S. Sparkes [et al.] // *Hum. Genet.* - 1988. – Vol. 79. - P. 352-356.
198. The common adiponutrin variant p.I148M does not confer gallstone risk but affects fasting glucose and triglyceride levels / M. Krawczyk, F. Gruenig, M. Mahler [et al.] // *J. Physiol. Pharmacol.* — 2011. — Vol. 62, № 3. — P. 369-375.
199. The effects of the apolipoprotein B signal peptide (ins/del) and XbaI polymorphisms on plasma lipid responses to dietary change / P.E. Pajunkanta, L.M. Valsta, A. Aro [et al.] // *Atherosclerosis.* - 1996. - Vol. 122. - P. 1-10.

200. The genetic effect of the apoprotein A5 gene on the serum triglyceride level in Japanese / T. Nabika, S. Nasreen, S. Kobayashi, J. Masuda // *Atherosclerosis*. - 2002. – Vol. 165, № 2. - P. 201-205.
201. The paraoxonase gene family and atherosclerosis / C.J. Ng, D.M. Shih, S.Y. Hama [et al.] // *Free Radic Biol. Med.* - 2005. - Vol. 38, № 2. - P. 153-163.
202. Thijs, C. Serum lipids and gallstones: a case — control study / C. Thijs, P. Knipschild, P. Brombaer // *Gastroenterology*. — 1990. — Vol. 99, № 3. — P. 843–849.
203. Tikanen, M.J. Regulation of hepatic lipase and serum lipoprotein by sex steroids / M.J. Tikanen, E.A. Nikkila // *Am. J. Heart*. - 1987. – Vol. 113. - P. 562-567.
204. Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolic2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively / K. Lu, M.H. Lee, S. Hazard [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2001. – Vol. 69. – P. 278–90.
205. Type III hyperlipoproteinemia: diagnosis, molecular defects, pathology and treatment. (Review) / H.B. Brewer, L.A. Zech, R.E. Gregg [et al.] // *Ann. Int. Med.* - 1983. - Vol. 98. - P. 623-640.
206. Utermann, G. Apolipoprotein E polymorphisms in health and disease. (Review) / G. Utermann // *Am. Heart J.* - 1987. - Vol. 113. - P. 433-90.
207. Variation in the LRP, a-2 M, and LRPAP genes in relation to plasma lipid levels and risk of early myocardial infarction / P. Gonzalez, R. Alvarez, J.R. Reguero [et al.] // *Coron. Artery Dis.* – 2002. – Vol. 13. – P. 251–4.
208. Variation in the LRP-associated protein gene (LRPAP1) is associated with late-onset Alzheimer's disease / L. Sanchez, V. Alvarez, P. Gonzalez [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 2001. – Vol. 105. – P. 76–8.
209. Vega, G.L. Primary hypertriglyceridemia with borderline high cholesterol and elevated apolipoprotein B concentrations. Comparison of gemfibrozil vs lovastatin therapy / G.L. Vega, S.M. Grundy // *JAMA*. - 1990. - Vol. 264, № 21. - P. 2759-2763.

210. Walden, C.C. Apolipoprotein E and hyperlipidemia / C.C. Walden, R.A. Hegele // *Ann. Intern. Med.* — 1994. — Vol. 120. — P. 1026-1036.
211. Williams, P.T. Effects of dietary fat on high density lipoprotein subclasses are influenced by both apolipoprotein E isoforms and low density lipoprotein subclasses pattern / P.T. Williams, D.M. Dreon, R.M. Kraus // *Am. J. Clin. Nutr.* - 1995. – Vol. 61. - P. 1234-1240.
212. Ye, P. Association of polymorphisms of the apolipoprotein B gene with coronary heart disease in Han Chinese / P. Ye, B. Chen, S. Wang // *Atherosclerosis.* – 1995. – Vol. 117. – P. 43–50.