

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-165-5-121-125

УДК 616.34–002

Ассоциации полиморфного варианта гена TNF-A (G-308A) с тяжестью клинического течения воспалительных заболеваний кишечника в томской области

Койнова И. А., Белобородова Е. В., Бурковская В. А., Черногорюк Г. Э.

ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России

TNF-A polymorphic G-308A variant correlation with the severity of the course of the inflammatory bowel disease in tomsk region

I. A. Koynova, E. V. Beloborodova, V. A. Burkovskaya, G. E. Chernogoryuk

Siberian State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russia

Для цитирования: Койнова И. А., Белобородова Е. В., Бурковская В. А., Черногорюк Г. Э. Ассоциации полиморфного варианта гена TNF-A (G-308A) с тяжестью клинического течения воспалительных заболеваний кишечника в томской области. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2019;165(5): 121–125. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-165-5-121-125

For citation: Koynova I. A., Beloborodova E. V., Burkovskaya V. A., Chernogoryuk G. E. TNF-A polymorphic G-308A variant correlation with the severity of the course of the inflammatory bowel disease in tomsk region. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2019;165(5): 121–125. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-165-5-121-125

Койнова Ирина Александровна, кафедра госпитальной терапии с курсом реабилитации, физиотерапии и спортивной медицины, ассистент; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7805-1287>

Белобородова Екатерина Витальевна, кафедра госпитальной терапии с курсом реабилитации, физиотерапии и спортивной медицины, д-р мед. наук, профессор; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-8776-5924>

Бурковская Вера Антоновна, кафедра госпитальной терапии с курсом реабилитации, физиотерапии и спортивной медицины, канд. мед. наук, доцент; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-2854-1258>

Черногорюк Георгий Эдинович, кафедра госпитальной терапии с курсом реабилитации, физиотерапии и спортивной медицины, д-р мед. наук, профессор; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-5780-6660>

Irina A. Koynova, Teaching assistant; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7805-1287>

Ekaterina V. Beloborodova, Department of Hospital Therapy, Professor, MD; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-8776-5924>

Vera A. Burkovskaya, Department of Hospital Therapy, Assistant professor; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-2854-1258>

Georgiy E. Chernogoryuk, Department of Hospital Therapy, Professor, MD; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-5780-6660>

✉ *Corresponding author:*

**Койнова
Ирина Александровна**
Irina A. Koynova
i.a.tarasova@mail.ru

Резюме

Целью исследования являлось изучение влияния концентрации TNF-α в сыворотке крови и полиморфных вариантов генов TNF-α (G-308A) на течение болезни Крона и язвенного колита.

Материалы и методы. Обследовано 123 пациента с воспалительными заболеваниями кишечника, группу контроля составили 40 здоровых добровольцев.

Результаты исследования показали, что сывороточный уровень TNF-α был значительно повышен в группе пациентов с ВЗК, по сравнению со значением в контрольной группе и коррелировал с активностью заболеваний. Полиморфный вариант –308A гена TNF-α в 6 раз чаще встречался при болезни Крона, чем в контрольной группе. Аллель –308A гена TNF-α у пациентов с язвенным колитом в изученной выборке ассоциировался с утяжелением течения заболевания, при этом достоверных связей между полиморфизмом гена TNF-α (G-308A) и течением болезни Крона не выявлено.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, TNF-α, иммуногенетика

Summary

The aim of the research is to study the influence of concentration of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in the blood serum and polymorphic genes variants TNF- α (G-308A) on the clinical course of Crohn's disease and Ulcerative colitis.

Materials and methods. We examined 123 patients with inflammatory bowel diseases, observational group consisted of 40 healthy volunteers.

Results. Findings of a study have shown that serum TNF-alpha level is increased greatly among the inflammatory bowel disease patients in comparison with the value of the observational group and correlates with the disease activity. Crohn's disease patients had TNF- α polymorphic G-308A variant 6 times oftener than ones in the observational group. Patients with TNF- α -308A allele had a more severe disease, however no veridical relations between TNF- α polymorphic G-308A variant and the course of the Crohn's disease were discovered.

Keywords: Inflammatory bowel disease, Ulcerative colitis, Crohn's disease, TNF- α , immunogenetics

Введение

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это группа аутоиммунных заболеваний с многофакторным механизмом развития, в основе которых лежит генетическая предрасположенность, реализующаяся в определенных условиях среды [1,2,4]. В связи с этим продолжается активный поиск иммуногенетических локусов, которые отвечают за развитие, тяжесть и характер течения болезни Крона (БК) и язвенного колита (ЯК), приводящих к формированию хронического иммунного воспаления. В дальнейшем это позволит не только прогнозировать тяжелое течение заболеваний, но и своевременно назначать биологические генно-инженерные препараты. Изучение профиля цитокинов при болезни Крона и язвенном колите несет высокую значимость, ввиду того, что их концентрация отражает интенсивность процессов деструкции и заживления в кишечнике, частоту и характер прогрессирования ВЗК [5,6,7].

Провоспалительный цитокин фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) играет ключевую роль в патогенезе ВЗК, являясь активным иммунорегуляторным белком. Его ген состоит из четырех экзонов, расположенных на коротком плече 6-й хромосомы. Полиморфизм промоторной части гена TNF- α (G-308A) определяет интенсивность продукции TNF- α [8]. В настоящее время полу-

чены данные о связи генетического полиморфизма гена TNF- α с особенностями клинического течения ВЗК, но результаты исследований противоречивы [9,10]. Исследование, проведенное в Санкт-Петербурге получило ряд данных, свидетельствующих о повышенном риске развития БК при наличии аллеля -308A TNF- α . [1]. В тоже время исследовательская работа, проведенная в г. Новосибирске в 2012 г. не выявила достоверных связей исследуемых генетических полиморфизмов, в том числе и гена TNF- α (G-308A), с клиническим течением ВЗК, однако показало наличие ассоциации патологического аллеля -308A с развитием стероидозависимости в процессе лечения данных болезней [2]. Исследование группы пациентов с ЯК в Рязанском регионе в 2013 г. подчеркнуло связь аллеля -308A с утяжелением течения данного заболевания. [3] Учитывая особую актуальность поиска маркеров, определяющих характер течения ВЗК необходимо продолжить изучение связи полиморфного варианта гена TNF- α (G-308A) с особенностями течения ЯК и БК в различных регионах России. Целью этого исследования было проанализировать ассоциации сывороточной концентрации TNF- α и его генетического полиморфизма (G-308A) с клиническими параметрами течения ВЗК в Томском регионе.

Материалы и методы

Обследовано 123 человека страдающих ВЗК проживающих в Томской области в возрасте от 18 до 60 лет, из них у 61 пациента (26 мужчин и 35 женщин) был диагностирован язвенный колит и у 63 пациентов (32 мужчин и 31 женщина) – болезнь Крона. Группу контроля составили 40 здоровых добровольцев. Диагноз был выставлен согласно утвержденным международным и российским стандартам, подтверждался морфологически. Для болезни Крона тяжесть текущего обострения определялась с использованием индекса CDAI (Беста), при язвенном колите использовался индекс Мейо. Возраст пациентов с ЯК составил 41,0 (30–54) год, при БК 34,0 (23–50) года,

в контрольной группе также 34,0 (26–43) года. Исследуемые группы были сопоставимы по полу и возрасту. Всем пациентам, вошедшим в исследование, проводилось молекулярно-генетическое исследование: изучение полиморфизма гена TNF- α (G-308A) и определялась сывороточная концентрация TNF- α . Полученные результаты сопоставлялись с тяжестью и характером течения заболевания, возрастом манифестации болезни, с наличием осложнений и внекишечных проявлений. Обобщенные клинические данные пациентов с ВЗК отражены в табл. 1.

Концентрацию TNF- α в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа

Группа наблюдения	Язвенный колит		Болезнь Крона			
	%	n	%	n		
Дебют заболевания	До 16 лет	3	4,92	12	19,05	$\chi^2=8,271$ $p=0,159$
	От 16 до 40 лет	35	57,38	38	60,32	
	После 40 лет	23	37,7	13	20,63	
Тяжесть атаки	Ремиссия	2	3,28	7	11,11	$\chi^2=4,482$ $p=0,214$
	Легкая	21	34,43	21	33,33	
	Среднетяжелая	28	45,9	30	47,62	
	Тяжелая	10	16,39	5	7,94	
Характер течения	Острое, впервые возникшее	9	14,75	14	22,22	$\chi^2=8,07$ $p=0,044$
	Непрерывно рецидивирующее	12	19,67	22	34,92	
	Хроническое рецидивирующее	40	65,57	27	42,86	
Осложнения		18	29,51	41	65,08	$\chi^2=15,722$ $p<0,001$
Внекишечные проявления		9	14,75	12	19,05	$\chi^2=0,406$ $p=0,524$

Таблица 1.
Основные клинические данные пациентов с ВЗК

Table 1.
The main clinical data of patients with IBD)

с использованием набора реагентов «Альфа- TNF-ИФА-Бест», ЗАО «Вектор-Бест», РФ.

ДНК выделялось методом фенольной экстракции, используя коммерческий набор «Вектор ДНК экстракция» производитель ЗАО «Вектор-Бест», РФ. Анализ полиморфизма G-308A гена TNF- α проводился путем амплификации соответствующих участков генома с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Рестриктию исследуемых участков генома проводили рестриктазой Bsp19I, производства «Сибэнзим» (Россия). Генотипирование проводили путем разделения рестрицированных продуктов ПЦР в 3% агарозном геле в течение 30–40 мин и окрашивания бромистым этидием, визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете на установке фирмы «BioRad». Исследования выполнены на базе НИИ

Медицинской генетики Томского НИМЦ (г. Томск, директор профессор В. А. Степанов).

Всеми пациентами подписано добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Статистическая обработка результатов исследования проведена с помощью пакета программ Statistica 10, количественные данные представлены в виде медианы (Me) и межквартильных размахов (25 и 75 процентиля). Качественные данные представлены в виде абсолютных (N) и относительных частот (%). Для оценки значимости различий независимых выборок использовался критерий χ^2 , Манна-Уитни, и Краскела-Уоллиса. Корреляционный анализ проведен с использованием ранговых корреляций Спирмена. Статистическая значимость была принята при значении $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение

Уровень сывороточной концентрации провоспалительного цитокина TNF- α при БК составил 2,96 (1,69–4,60) пг/мл ($p<0,001$), при ЯК 2,01 (1,24–3,50) пг/мл ($p=0,042$), в контрольной группе 1,41 (0,60–1,69) пг/мл (рис. 1), что еще раз подтверждает роль данного цитокина в реализации воспалительных заболеваний кишечника.

При ЯК была установлена прямая корреляционная связь между сывороточным уровнем TNF- α и уровнем индекса активности Мейо, который соответствует тяжести текущей атаки ($r=0,333$). При БК также отмечалась аналогичная взаимосвязь с активностью заболевания CDAI ($r=0,404$). Кроме этого выявлена минимальная прямая корреля-

ция между концентрацией TNF- α и протяженностью поражения кишечника при язвенном колите ($r=0,288$), а также с наличием анемии различной степени выраженности ($r=0,366$). Таким образом в данном исследовании была установлена прямая связь между сывороточным уровнем TNF- α и тяжестью течения как язвенного колита, так и болезни Крона.

Ранее в исследованиях было установлено, что патологическими вариантами являются генотипы G/A и A/A для гена TNF- α G-308A. Частоты аллелей и генотипов полиморфных вариантов G-308A гена TNF- α изученной выборки пациентов с ВЗК в Томском регионе представлены в таблице 2.

Таблица 2.
Частота аллелей и генотипов полиморфных вариантов (G-308A) гена TNF- α при ВЗК в сравнении с группой контроля

Примечание:
* – значимые различия ($p<0,05$) в частотах в сравнении с контрольной группой.

Table 2.
Allele and genotype frequencies of polymorphic variants (G-308A) of the TNF- α gene in IBD compared with the control group)

Полиморфизм	Генотипы и аллели	Язвенный колит			Болезнь Крона			Контрольная группа	
		N	Частота,%	p	N	Частота,%	p	N	Частота,%
Ген TNF- α G-308A	G/G	51	83,61	0,22	37*	58,73	<0,001	37	92,5
	G/A	9	14,75	0,75	20*	31,75	0,004	3	7,5
	A/A	1*	1,64	0	6*	9,52	0	0	0
	A	11	9,02	0,76	32*	25,4	0,001	3	3,75
	G	111	90,98	0,16	94*	74,6	0,001	77	96,25

Таблица 3.

Клинические характеристики ВЗК в связи с частотой распределения полиморфных генотипов -G308A гена TNF-α

Table 3.

Clinical characteristics of IBD due to the frequency distribution of the polymorphic genotypes -G308A of the TNF-α gene)

Группа наблюдения	Язвенный колит						Болезнь Крона						
	G/G		G/A		A/A		G/G		G/A		A/A		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Дебют заболевания	До 16 лет	3	4,92	0	0	0	0	0	0	6	9,52	6	9,52
	От 16 до 40 лет	27	44,26	8	13,11	0	0	4	6,35	11	17,46	23	36,51
	После 40 лет	21	34,43	1	1,64	1	1,64	2	3,17	3	4,76	8	12,7
Тяжесть атаки	Ремиссия	2	3,28	0	0	0	0	0	0	4	6,35	3	4,76
	Легкая	21	34,43	1	1,64	0	0	4	6,35	6	9,52	11	17,46
	Среднетяжелая	23	37,7	4	6,56	0	0	1	1,59	7	11,11	22	34,38
Характер течения	Тяжелая	5	8,2	4	6,56	1	1,64	1	1,59	3	4,76	1	1,59
	Острое, впервые возникшее	7	11,47	1	1,64	1	1,64	0	0	8	12,7	6	9,52
	Непрерывно рецидивирующее	10	16,39	2	3,28	0	0	5	7,94	4	6,35	13	20,63
Осложнения	Хроническое рецидивирующее	34	55,74	6	9,84	0	0	1	1,59	8	12,7	18	28,57
	Внекишечные проявления	2	3,28	2	3,28	1	1,64	1	1,59	4	6,35	7	11,11

Мы проанализировали особенности клинического течения ВЗК в двух группах пациентов: с наличием патологического аллеля -308A гена TNF-α и с нормальным вариантом этого гена. При анализе полученных данных выявлено, что в изученной выборке ЯК для подавляющего большинства пациентов (n=51; 83,61%) характерно наличие физиологического генотипа, при этом аллель -308A гена TNF-α определен лишь у каждого десятого пациента (n=10; 16,39%), что сопоставимо частотой выявления в контрольной группе (n=3; 7,5%). Схожие данные получены в исследованиях других регионов России (Рязань, Новосибирск) [2,3]. В группе контроля гомозиготных вариантов по патологическому аллелю -308A выявлено не было.

При БК патологические варианты G/A и A/A полиморфизма G-308A гена TNF-α были выявлены практически у половины пациентов (n=26; 41,27%) изученной выборки, в 6 раз выше в сравнении с группой контроля. Полученные данные могут свидетельствовать о значимости носительства патологического аллеля -308A гена TNF-α в развитии болезни Крона.

На следующем этапе был проведен анализ ассоциаций полиморфизма G-308A гена TNF-α с клиническими особенностями течения язвенного колита и болезни Крона, такими как тяжесть и характер течения заболевания, возраст манифестации болезни, наличие осложнений и внекишечных проявлений (табл. 3).

При анализе полученных данных выявлено, что возраст манифестации ЯК составил 35 (26–47) лет, а при БК 27 (20–40) лет (p=0,003). Обработка результатов показала, что при проведении корреляционного анализа значимых связей между возрастом манифестации ВЗК и полиморфизмом G-308A гена TNF-α обнаружено не было.

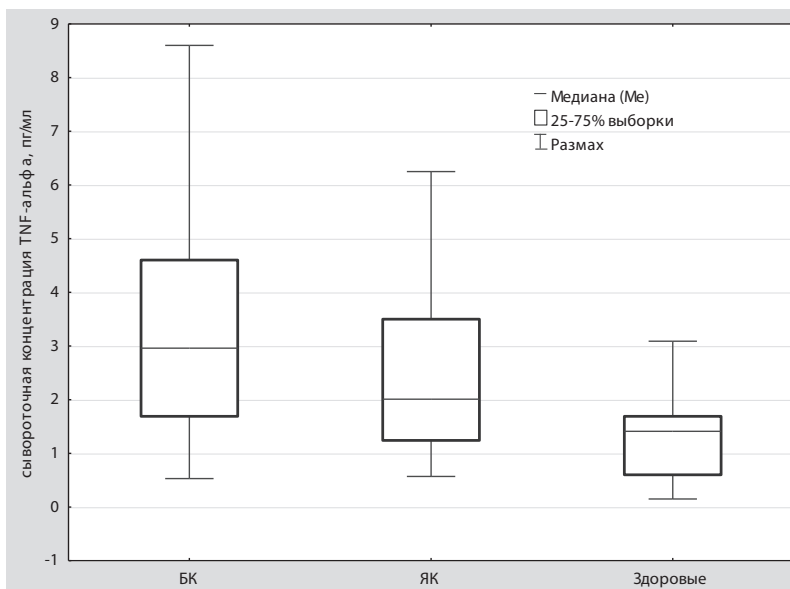
Тяжесть текущей атаки ЯК была оценена с помощью индекса активности Мейо, который по группе составил 5 (4–7) баллов. Оценка тяжести обострения БК проведена с использованием индекса CDAI, балл по группе составил 320 (178–385) баллов, что также приближается к среднетяжелой атаке. Корреляционный анализ выявил умеренную прямую корреляцию (r=0,424) между наличием патологического аллеля -308A гена TNF-α и баллов по

Рисунок 1.

Диаграмма размаха уровня TNF-α в сыворотке крови при ВЗК в сравнении с группой контроля

Figure 1.

Chart of the magnitude of the serum TNF-α level in IBD versus the control group)



шкале Мейо в группе ЯК. В отличие от этого, при БК значимых связей между индексом активности и полиморфизмом G-308A гена TNF- α выявлено не было. Наличие аллеля -308A в изученной выборке ЯК характеризовалось более тяжелыми атаками болезни как в дебюте, так и при последующих обострениях.

При проведении корреляционного анализа в изучаемых группах как при ЯК, так и при БК характер течения заболевания не был значимо взаимосвязан с полиморфизмом гена TNF- α (G-308A).

Заключение

Преобладание частоты выявления патологического аллеля -308A гена TNF- α (G-308A) при ВЗК, в особенности при болезни Крона возможно отражает более значимую роль генетической предрасположенности в реализации заболевания, по сравнению с прочими факторами среды. Наличие патологического аллеля -308A гена TNF- α прямо ассоциировалось с утяжелением течения язвенного колита. Сывороточный уровень TNF- α

По результатам работы внекишечные проявления были выявлены у каждого пятого пациента с язвенным колитом (n=13; 21,3%) и с болезнью Крона (n=12; 19%). Наличие патологического аллеля -308A гена TNF- α при ЯК было ассоциировано с наличием анемии различной степени тяжести ($r=0,348$). Корреляционный анализ не выявил ассоциаций между полиморфизмом TNF- α и наличием внекишечных проявлений или осложнений в группе болезни Крона.

у пациентов с ВЗК значимо превышал таковой в контрольной группе, при этом концентрация данного цитокина в группе БК в 1,5 раза превышала таковую при ЯК. В обеих группах ВЗК повышение концентрации TNF- α в сыворотке крови было напрямую ассоциировано с тяжестью атаки заболевания. Полученные данные могут найти применение в практической медицине для подбора тактики ведения пациентов с ВЗК.

Литература | References

1. Барановский А.Ю., Кондрашева Э.А., Харитонов А.Г. и соавт. Полиморфизм гена TNF- α у пациентов с язвенным колитом // Вестник Санкт-Петербургской мед. академии последипломного образования. – 2011. – Т. 3, № 3. – С. 41–45.
Baranovsky A. Yu., Kondrasheva E. A., Kharitonov A. G. et al. TNF- α gene polymorphism in patients with ulcerative colitis. Herald of St. Petersburg med. Academy of Postgraduate Education. – 2011. – Vol. 3, No. 3. – P. 41–45.
2. Валуиских Е. Ю. Влияние генетических и средовых факторов на клинические проявления хронических воспалительных заболеваний кишечника (болезнь Крона и неспецифический язвенный колит): автореф. дис. канд. мед. наук / – Новосибирск, 2012. – 32 с.
Valuisky E. Yu. The influence of genetic and environmental factors on the clinical manifestations of chronic inflammatory bowel disease (Crohn's disease and ulcerative colitis): Doct. diss. Novosibirsk, 2012. 32 p.
3. Якубовская А.Г., Низов А.А., Баранов В.С. и соавт. Полиморфизм генов NOD2/CARD15 и TNF- α у больных язвенным колитом Рязанского региона // Вестник соврем. клин. медицины. – 2013. – Т. 6, № 4. – С. 17–21.
Yakubovskaya A. G., Nizov A. A., Baranov V. S. et al. Polymorphism of NOD2 / CARD15 and TNF- α genes in patients with ulcerative colitis of the Ryazan region. Bulletin of Sovrem. wedge. medicine. – 2013. – V. 6, № 4. – P. 17–21.
4. Воробьев Г.И., Халиф И.Л. Неспецифические воспалительные заболевания кишечника. – Москва: Миклош, 2008. – 422 с.
Vorobiev G. I., Khalif I. L. Nonspecific inflammatory bowel disease. – Moscow: Miklos, 2008. – 422 p.
5. McGovern D., Kugathasan S., Cho J. H. Genetics of Inflammatory Bowel Diseases // Gastroenterology. – 2015. – 149 (5). – P. 1163–1176.
6. Dave, M., Papadakis, K. A., Faubion, W. A. Immunology of Inflammatory Bowel Disease and Molecular Targets for Biologics // Gastroent. Clin. of North America. – 2014. – 43 (3). – P. 405–424.
7. López-Hernández R., Valdés M., Campillo J. A. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene single-nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease // International J. of Immunogen. – 2014. – Vol.42. – P. 38–45.
8. Cleynen I., Vermeire S. The genetic architecture of inflammatory bowel disease: past, present and future // Curr Opin Gastroenterol. – 2015. – 31 (6). – P. 456–463.
9. Cantor M.J., Nickerson P. The role of cytokine gene polymorphisms in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease // Am. J. Gastroenterol. – 2005. – 100. (5). – P. 1134–1142.
10. De Mattos, Bruno R. R., Garcia M. P.G. et al. Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments // Mediators of Inflammation. – 2015. – 493012.