

КУЗНЕЦОВА

Дарья Александровна

**КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ФАКТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Кемерово – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Разумов Александр Сергеевич – доктор медицинских наук профессор

Официальные оппоненты:

Никонов Евгений Леонидович – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой гастроэнтерологии факультета дополнительного профессионального образования

Ларионова Валентина Ильинична – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Северо-западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры педиатрии и детской кардиологии

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится «22» ноября 2018 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д. 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте <https://nrcerm.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), а именно, болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), несмотря на разработку современных, высокотехнологичных методов диагностики и лечения, практически во всех странах сохраняют или приобретают тенденцию к увеличению распространенности и заболеваемости, особенно, среди лиц молодого и трудоспособного возраста (Kaplan G.G., 2015; Ng S.C. et al., 2018). При этом отсутствие однозначного представления о причинах и механизмах развития ВЗК затрудняет своевременное установление диагноза БК или ЯК, что, в ряде случаев, приводит к развитию тяжелых осложнений, требующих оперативного вмешательства, и неблагоприятному медико-социальному прогнозу (Zhang Y.Z. et al., 2014; de Lange K.M. et al., 2015). Кроме того, сходство клинических, эндоскопических и лабораторных признаков БК и ЯК обуславливает сложность проведения их дифференциальной диагностики, а также индивидуального прогнозирования клинического течения заболеваний и правильного выбора лечебной тактики (Dulai P.S. et al., 2018). Это, в свою очередь, определяет потребность в совершенствовании традиционных диагностических алгоритмов ВЗК с использованием лабораторных биомаркеров, обладающих клинико-патогенетической, диагностической и прогностической значимостью при БК и ЯК.

Определенные перспективы в повышении эффективности диагностики и прогнозирования риска развития ВЗК появились после расшифровки генома человека. Были выявлены полиморфизмы генов, ассоциированные с клинической реализацией ключевых звеньев патогенеза БК и ЯК, в частности, нарушений врожденного и адаптивного иммунитета, дифференцировки Th17-лимфоцитов, слизистого и эпителиального барьеров кишечника и аутофагии (Zhang J.X. et al., 2014; Aamann L. et al., 2014; Cheng Y. et al., 2015).

Однако имеющиеся данные об особенностях клинической реализации генетических факторов, ассоциированных с развитием ВЗК, полученные в разных странах и даже в разных регионах в пределах одной страны, весьма противоречивы (Lee G.H. et al., 2005; Валуйских Е.Ю., 2008; Chua K.H. et al., 2009; Шумилов П.В., 2010; Насыхова Ю.А. и др., 2010; Liu J.Z. et al., 2015), что препятствует внедрению в клиническую практику молекулярно-генетических методов диагностики БК и ЯК. Возможно, это обусловлено различной распространенностью изучаемых полиморфизмов, а также особенностями их клинической реализации при различных сочетаниях с индивидуально-средовыми факторами.

Степень научной разработанности темы

Первые генетические факторы, ассоциированные с развитием ВЗК, были выявлены в конце XX века, когда у представителей Северной и Западной Европы обнаружили ассоциацию БК с локусом на 16 хромосоме, названного *IBD1*, а ЯК – с генами *HLA* (Hugot J.P. et al., 1996; Satsangi J. et al., 1996).

В 2001 году у евреев ашкенази была показана ассоциация полиморфизмов C2104T, G2722C и 3020insC гена *CARD15* с нарушениями врожденного иммунитета у пациентов с БК (Hugot J.P. et al., 2001; Ogura Y. et al., 2001). В дальнейшем были выявлены ассоциации полиморфизмов генов *IL23R*, *CARD9*, *TNFSF15*, *PTPN2*, *IL-12B*, *TNF- α* , *ATG16L1*, *IRGM* с нарушениями адаптивного иммунитета и аутофагии при БК (Duerr R.H. et al., 2006; Rioux

J.D. et al., 2007; Van Limbergen J. et al., 2009), а генов *HNF4A*, *CDH1*, *LAMB1* – с нарушениями эпителиального барьера при ЯК (UK IBD Genetics Consortium et al., 2009).

В настоящее время благодаря широкомасштабным ассоциативным исследованиям генома человека GWAS и крупным международным проектам в области изучения ВЗК (Prometheus Laboratories Inc., Molecular Genetics Service, UK10K, GENDIA) установлено более 1500 нуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с различными патогенетическими звеньями БК и ЯК (Jostins L. et al., 2012; Liu J.Z. et al., 2015). При этом были выявлены особенности распространенности, диагностической и прогностической значимости большинства полиморфизмов в европейских, американских, восточноазиатских странах, а также в отдельных регионах Российской Федерации (Chua K.H. et al., 2009; Шумилов П.В., 2010; Насыхова Ю.А. и др., 2010; Liu J.Z. et al., 2015). Эти особенности, по мнению некоторых авторов, обусловлены тем, что для развития БК или ЯК недостаточно только наличия соответствующих нуклеотидных полиморфизмов, необходима их фенотипическая реализация, которая возможна при определенных сочетаниях генетических факторов с индивидуально-средовыми (Zhang Y.Z. et al., 2014; de Lange K.M. et al., 2015).

Таким образом, имеющиеся литературные данные убедительно свидетельствуют об ассоциации определенных нуклеотидных полиморфизмов с развитием БК и ЯК. Однако повышению объективности и информативности диагностики ВЗК на основе применения молекулярно-генетических методов препятствуют противоречивые данные, как о распространенности, так и о клинико-диагностической значимости нуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с фенотипической реализацией различных патогенетических звеньев БК и ЯК.

Цель исследования

Установить клинико-лабораторные ассоциации и прогностическую значимость определения нуклеотидных полиморфизмов генов *CARD15* (rs5743293, rs2066845), *TNF- α* (rs1800629), *VDR* (rs1544410) и индивидуально-средовых факторов для оценки риска развития и особенностей клинического течения болезни Крона и язвенного колита.

Задачи исследования

1. Оценить распространенность нуклеотидных полиморфизмов 3020insC и G2722C гена *CARD15*, G308A гена *TNF- α* и BsmI гена *VDR* у пациентов с болезнью Крона и язвенным колитом.
2. Установить клинико-лабораторные корреляции носительства полиморфизмов генов *CARD15*, *TNF- α* и *VDR* с риском развития и особенностями клинического течения болезни Крона и язвенного колита.
3. Выявить роль индивидуально-средовых факторов в фенотипической реализации полиморфизмов генов *CARD15*, *TNF- α* и *VDR* при воспалительных заболеваниях кишечника.
4. Определить комплексный вклад нуклеотидных полиморфизмов генов *CARD15*, *TNF- α* , *VDR* и индивидуально-средовых факторов в прогнозирование риска развития и особенностей клинического течения болезни Крона и язвенного колита.

Научная новизна исследования

Впервые установлены особенности распределения частот аллелей и генотипов нуклеотидных полиморфизмов 3020insC и G2722C гена *CARD15*, G308A гена *TNF- α* и BsmI гена *VDR*, ассоциированных с ключевыми звеньями патогенеза воспалительных заболеваний

кишечника, у пациентов с болезнью Крона и язвенным колитом, проживающих на территории Кемеровской области РФ.

Подтверждена клинико-лабораторная корреляция носительства аллеля 3020insC гена *CARD15* с повышенным риском развития, тяжелым течением, осложненными фенотипическими вариантами болезни Крона, требующими проведения хирургического лечения. Для язвенного колита данных корреляций не выявлено, так же, как и не подтверждена ассоциация носительства аллеля 2722C гена *CARD15* с развитием болезни Крона и язвенного колита.

Впервые показано, что наличие аллеля 308A гена *TNF-α* ассоциировано с более поздним возрастом дебюта болезни Крона и язвенного колита – 44 и 43 года соответственно, тогда как у носителей аллеля G308 – 30 и 34 года соответственно.

Впервые установлена клинико-лабораторная корреляция носительства аллеля В полиморфизма BsmI гена *VDR* с повышенным риском развития язвенного колита, а также поздним возрастом дебюта и установления окончательного диагноза, тогда как гомозиготное носительство аллеля b обладает протективным эффектом в отношении развития язвенного колита. При болезни Крона носительство аллеля В полиморфизма BsmI показало ассоциацию с локализацией патологического процесса в виде колита (L2).

Впервые установлено, что перенесенные кишечные инфекции, глистные и паразитарные инвазии независимо от носительства аллелей 3020insC гена *CARD15*, 308A гена *TNF-α* и В полиморфизма BsmI гена *VDR* не влияют на фенотипическую реализацию болезни Крона и язвенного колита, тогда как курение, при отсутствии ассоциации с данными нуклеотидными полиморфизмами, служит неблагоприятным фактором развития тяжелого течения, осложненных фенотипических вариантов и проведения иммуносупрессивной терапии болезни Крона.

Впервые показано значение комплексной оценки нуклеотидных полиморфизмов генов и индивидуально-средовых факторов, ассоциированных с болезнью Крона и язвенным колитом, в прогнозировании риска развития и особенностей клинического течения данных нозологических форм.

Теоретическая и практическая значимость

Расширено представление о роли нуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями врожденного иммунитета – 3020insC и 2722C гена *CARD15*, вторичного иммунного ответа – G308A гена *TNF-α* и чувствительности рецептора витамина D – BsmI гена *VDR* в развитии ВЗК. Определены распространенность, клинико-диагностическая и прогностическая значимость полиморфизмов генов *CARD15*, *TNF-α* и *VDR* при ВЗК, а также индивидуально-средовые особенности их фенотипической реализации у пациентов с БК и ЯК, проживающих на территории Кемеровской области.

Полученные результаты являются теоретическими предпосылками для разработки способов повышения объективности и информативности клинико-лабораторной диагностики и прогнозирования клинического течения БК и ЯК с использованием молекулярно-генетических технологий.

Внедрение полученных результатов молекулярно-генетических методов диагностики воспалительных заболеваний кишечника в клиническую практику позволит использовать определение нуклеотидных полиморфизмов 3020insC гена *CARD15*, G308A гена *TNF-α* и BsmI гена *VDR* в качестве как дополнительных малоинвазивных маркеров верификации БК

и ЯК, так и прогностических факторов риска развития и особенностей клинического течения данных заболеваний.

Положения, выносимые на защиту

1. Носительство аллеля 3020insC гена *CARD15*, 308A гена *TNF-α* и В полиморфизма BsmI гена *VDR* ассоциировано с риском развития и особенностями клинического течения болезни Крона и язвенного колита у пациентов, проживающих на территории Кемеровской области.

2. Курение, перенесенные кишечные инфекции, глистные и паразитарные инвазии не ассоциированы с фенотипической реализацией нуклеотидных полиморфизмов 3020insC гена *CARD15*, G308A гена *TNF-α* и BsmI гена *VDR* при болезни Крона и язвенном колите у пациентов, проживающих на территории Кемеровской области.

3. Сочетанное определение носительства аллеля 3020insC гена *CARD15*, аллеля В полиморфизма BsmI гена *VDR*, курения и наличия перенесенных операций на органах брюшной полости (аппендэктомия, резекции различных отделов кишечника, операции по поводу кишечных свищей и абсцессов) служат неблагоприятными прогностическими факторами риска развития и осложненного фенотипа болезни Крона, тогда как носительство аллеля В полиморфизма BsmI гена *VDR* – риска развития язвенного колита.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационного исследования послужили научные труды отечественных и зарубежных авторов в области изучения БК и ЯК, роли генетических и индивидуально-средовых факторов в их развитии. Объект исследования – клиническая лабораторная диагностика и прогнозирование развития ВЗК. Предмет исследования – индивидуально-средовые особенности диагностической и прогностической значимости генетических факторов у пациентов с БК и ЯК, проживающих на территории Кемеровской области.

Методы исследования включали в себя: ретроспективный анализ историй болезней, анкетирование. Молекулярно-генетические исследования были выполнены с использованием высокотехнологичного оборудования.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Степень достоверности результатов исследования определяется достаточно представительной выборкой (231 пациент), адекватными поставленным задачам методами исследования и корректными методами статистической обработки.

Результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 70-летию юбилею ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница» (Кемерово, 2014); на III межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы абдоминальной хирургии и онкологии» (Томск, 2014); на межрегиональной научно-практической конференции «Современная лабораторная диагностика: состояние и перспективы», посвященная 60-летию юбилею ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» (Кемерово, 2015); на межрегиональной научно-практической конференции «Воспалительные заболевания толстой кишки» (Кемерово, 2015); на XXII объединенной Российской гастроэнтерологической неделе (Москва, 2016); на научно-образовательном семинаре Российской гастроэнтерологической ассоциации «Воспалительные заболевания кишечника: школа клинициста» (Кемерово, 2016); на 25-й объединенной Европейской

гастроэнтерологической неделе (Barcelona, 2017); на первом Российском гастроэнтерологическом конгрессе с международным участием «Гастроэнтерология России с рождения до старости (неонатологические, педиатрические, терапевтические, хирургические и медико-социальные аспекты)» (Санкт-Петербург, 2018).

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты исследования внедрены в клиническую практику гастроэнтерологического отделения ГАУЗ КОКБ Минздрава РФ, научную работу ЦНИЛ и кафедры патологической физиологии, медицинской и клинической биохимии ФГБОУ ВО «КемГМУ» Минздрава РФ и практику учебной работы кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова» Минздрава РФ.

Личный вклад автора в исследование

Личное участие автора осуществлялось на всех этапах планирования и проведения научной работы. Автором лично разработаны дизайн исследования и научная гипотеза, определена методология исследования, выполнен анализ данных отечественной и зарубежной литературы, медико-биологических и генетических баз данных, анализ историй болезни, анкетирование пациентов, забор материала для проведения молекулярно-генетических исследований, выделение ДНК, полимеразная цепная реакция, электрофоретическая детекция продуктов амплификации, статистическая обработка и анализ полученных данных, а также написание научных статей и самого текста диссертации.

Публикации результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста. Состоит из введения, трех глав (аналитического обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Иллюстративный материал представлен 6 рисунками, 35 таблицами. Библиографический указатель включает 228 источников, из них 213 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В исследование включены пациенты (n=231), которые были госпитализированы в ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С.В. Беляева» в период с января 2014 года по июль 2016 года. Из них основную группу составили 141 пациент гастроэнтерологического отделения с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК): 64 пациента – с болезнью Крона (БК) и 77 пациентов – с язвенным колитом (ЯК) и контрольную группу (К) – 90 пациентов различных отделений: 27 (30%) пациентов гинекологического отделения, 27 (30%) – урологического, 18 (20%) – оториноларингологического, 14 (15%) – нейрохирургического, 2 (2,5%) – кардиологического

и 2 (2,5%) – неврологического отделения. Все пациенты на момент обследования проживали на территории Кемеровской области. Распределение пациентов основной и контрольной групп по полу и возрасту представлено в таблице 1.

Таблица 1.

Половая и возрастная характеристика пациентов основной и контрольной групп

Пациенты		Me	25%	75%
Болезнь Крона	Мужчины, n=31 (48,5%)	33	27	44
	Женщины, n=33 (51,5%)	40	33	53
Язвенный колит	Мужчины, n=35 (45,5%)	40	29	53
	Женщины, n=42 (54,5%)	46	33	57
Контрольная группа	Мужчины, n=45 (50%)	40	33	49
	Женщины, n=45 (50%)	35	26	43

Критерии включения в основную группу: пациенты, имеющие диагноз БК и ЯК на момент госпитализации, подтвержденные клиническими, лабораторно-инструментальными и морфологическими методами диагностики, возраст от 18 лет и старше.

Критерии исключения из основной группы: отсутствие на момент исследования диагноза БК и ЯК, подтвержденных клиническими, лабораторно-инструментальными и морфологическими методами диагностики, наличие тяжелой сопутствующей патологии (туберкулез, злокачественные новообразования, аутоиммунные заболевания, ВИЧ), возраст моложе 18 лет.

Критерии включения в контрольную группу: пациенты, не имеющие на момент исследования клинически и анамнестически верифицированного диагноза БК и ЯК и тяжелой сопутствующей патологии (туберкулез, злокачественные новообразования, аутоиммунные заболевания, ВИЧ), возраст от 18 лет и старше.

Критерии исключения из контрольной группы: наличие на момент исследования и в анамнезе ВЗК, отягощенного наследственного анамнеза по БК и ЯК, тяжелой сопутствующей патологии (туберкулез, злокачественные новообразования, аутоиммунные заболевания, ВИЧ), возраст моложе 18 лет.

Исследование выполнено в соответствии с этическими принципами проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта (Хельсинкская декларация Всемирной Медицинской Ассоциации 1964 г., с изменениями от 2013 г.) и одобрено комитетом по этике и доказательности медицинских научных исследований ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (протокол от 14.10.2015). От всех пациентов получено информированное добровольное согласие на предоставление генетического материала для исследования, а также на обработку, систематизацию, хранение и использование персональных данных.

Клиническая характеристика обследованных пациентов

У пациентов основной группы диагноз БК и ЯК верифицировался на основании оценки жалоб, анамнеза заболеваний, данных клинических, лабораторных и

инструментальных методов исследований. В обязательном порядке диагноз БК и ЯК верифицировался морфологически.

На основании данных историй болезней и с учетом Монреальской классификации (2005) у пациентов основной группы учитывались клинические особенности диагноза БК и ЯК, включая локализацию поражения, тяжесть атаки, фенотип (характер клинического течения) заболевания, проведение гормональной (преднизолон) и иммуносупрессивной терапии (азатиоприн), оперативного лечения, а также наличие отягощенного наследственного анамнеза по ВЗК и перенесенных операций на органах брюшной полости (таблица 2).

Таблица 2.

Клиническая характеристика пациентов основной группы

Показатель		БК (N=64)	ЯК (N=77)
		n (%)	n (%)
Локализация	L1	23 (36)	-
	L2	15 (23,5)	-
	L3	18 (28)	-
	L4	3 (4,5)	-
	L2+L4	5 (8)	-
	E1	-	2 (2,5)
	E2	-	43 (56)
E3	-	32 (41,5)	
Тяжесть атаки	Легкая	6 (9,5)	8 (10)
	Средняя	34 (53)	56 (73)
	Тяжелая	24 (37,5)	13 (17)
Фенотип / клиническое течение	Неосложненный	23 (36) *	72 (93,5)
	Осложненный	41 (64) **	5 (6,5)
Преднизолон	Да	46 (72)	55 (71,5)
Азатиоприн	Да	41 (64)	36 (47)
Оперативное лечение	Да	35 (55)	6 (8)
Перенесенные операции на органах брюшной полости	Да	28 (43,75)	6 (8)
Отягощенный наследственный анамнез по ВЗК	Да	2 (3)	9 (12)

Примечание: L1 – терминальный илеит, L2 – колит, L3 – илеоколит, L4 – поражение верхних отделов ЖКТ, E1 – проктит, E2 – левостороннее поражение, E3 – тотальное поражение, * – пациенты с люминальными формами БК (B1), ** – объединенная группа пациентов с пенетрирующими и стенозирующими формами БК (B2+B3)

Структура перенесенных операций на органах брюшной полости у пациентов основной (до установления окончательного диагноза в сроки от шести и более месяцев) и контрольной групп представлена в таблице 3.

Структура перенесенных операций на органах брюшной полости основной и контрольной групп

Виды операций	Объем операции	БК, N=28	ЯК, N=6	К, N=18
		n (%)	n (%)	n (%)
Аппендэктомия ¹	Аппендэктомия	12 (43)	6 (100)	13 (72)
Резекция различных отделов кишечника ²	Правосторонняя гемиколэктомия	2 (7)	0	0
	Резекция илеоцекального угла	1 (3,5)	0	0
	Резекция подвздошной кишки	1 (3,5)	0	0
Вскрытие и дренирование абсцессов брюшной полости ³	Абсцесс правой подвздошной области	1 (3,5)	0	0
	Параколитический абсцесс	1 (3,5)	0	0
	Абсцесс дугласова пространства	1 (3,5)	0	0
Иссечение кишечных свищей различной локализации	Параректальный свищ	1 (14)	0	1 (5,5)
	Кожно-кишечный свищ	1 (3,5)	0	0
	Ректо-вагинальный свищ	1 (3,5)	0	0
	Тонко-тонкокишечный свищ	1 (3,5)	0	0
Диагностическая лапаротомия	Диагностическая лапаротомия	2 (7)	0	0
Сочетание операций ¹⁻³		3 (11)	0	0
Острые и тупые травмы живота	Резекция восходящего отдела ободочной кишки	0	0	1 (5,5)
	Ушивание разрыва брыжейки тонкой кишки	0	0	1 (5,5)
Ущемленная паховая грыжа	Герниопластика	0	0	1 (5,5)
Липома ободочной кишки	Удаление липомы ободочной кишки	0	0	1 (5,5)

У пациентов основной группы учитывались возрастные особенности установления диагноза болезни Крона и язвенного колита, а именно, возраст первых клинических проявлений заболевания и возраст установления окончательного диагноза (таблица 4).

Таблица 4.

Возрастная характеристика пациентов основной группы к моменту установления окончательного диагноза

Показатель		БК (n=64)			ЯК (n=77)		
		Me	25%	75%	Me	25%	75%
Возраст первых клинических проявлений заболевания, лет	м	25	19	34	34	26	48
	ж	32	27	44	38,5	25	46
Возраст установления окончательного диагноза, лет	м	27	22	41	34	27	48
	ж	37	29	47	39,5	26	52

Примечание: м – мужчины, ж – женщины

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы ДНК пациентов, выделенные из лейкоцитов крови с использованием реагента «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ "ЛИТЕХ", Россия) согласно прилагаемой инструкции.

Выявление нуклеотидных полиморфизмов 3020insC и G2722C гена *CARD15*, G308A гена *TNF- α* и BsmI гена *VDR* проводилось методом аллель-специфической ПЦР (амплификатор BIORAD C1000, USA) с использованием наборов «SNP-экспресс» (НПФ "ЛИТЕХ", Россия) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации.

Пациентам основной и контрольной групп, в дополнении к данным историй болезней, было проведено анкетирование на установление средовых факторов, ассоциированных с развитием ВЗК, по разработанной анкете «Воспалительные заболевания кишечника». Влияние индивидуально-средовых факторов на риск развития, клиническое течение, необходимость проведения гормональной, иммуносупрессивной терапии и оперативного лечения ВЗК оценивали по вредным привычкам (наличие активного курения до установления окончательного диагноза и на момент анкетирования), перенесенным кишечным инфекциям (сальмонеллез, эшерихиоз, дизентерия и пищевые токсикоинфекции), глистным и паразитарным инвазиям (описторхоз, аскаридоз, токсокароз, жиардиаз), а также операциям на органах брюшной полости в сроки от шести и более месяцев до установления окончательного диагноза БК и ЯК, включая аппендэктомию, резекции различных отделов кишечника, операции по поводу кишечных свищей и абсцессов.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statistica "6.0" (InstallShield Software Corporation, 1984-2001, США, лицензия № BXXR006B092218FAN11). Количественные переменные представлялись в виде медианы (Me) и 25-ого и 75-ого процентилей [Q25; Q75]. Для сравнения количественных независимых переменных применялись критерии Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса (Гланц С., 1999). Для оценки качественных признаков вычисляли долю (%) признака, значимость различий между группами которых оценивали при помощи χ^2 Пирсона и точного критерия Фишера. При наличии статистически значимых различий между сравниваемыми группами ($p \leq 0,05$), вычисляли коэффициент соотношения шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ) (Ланг Т.А. и др., 2011).

Для определения комплексного вклада генетических и индивидуально-средовых факторов, ассоциированных с БК и ЯК, использовалась множественная логистическая регрессия, Квази-Ньютоновский метод оценивания. В случае значимости логистической регрессии определялись диагностическая чувствительность, диагностическая специфичность полученной модели, а также коэффициент В, стандартная ошибка, p -уровень, ОШ с 95%- ДИ, χ^2 Вальда и константы для каждого предиктора. Для более наглядного представления полученных моделей проводился ROC-анализ с построением графика ROC-кривой и AUC (Ланг Т.А. и др., 2011). Статистически значимыми различия принимали при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Диагностическая и прогностическая значимость нуклеотидных полиморфизмов генов *CARD15*, *TNF- α* и *VDR* при болезни Крона и язвенном колите

Изучение частоты встречаемости аллелей и генотипов нуклеотидного полиморфизма 3020ins гена *CARD15* было выполнено у 64 пациентов с БК, 77 пациентов с ЯК и 90 пациентов контрольной группы, проживающих на территории Кемеровской области.

Проведенный сравнительный анализ распространенности полиморфизма 3020insC гена *CARD15* показал, что частота встречаемости аллеля 3020insC у пациентов с БК была достоверно выше по сравнению с контрольной группой ($p<0,001$) и пациентами с ЯК ($p<0,001$) в 4,75 и 6,3 раз соответственно, тогда как у пациентов с ЯК практически не отличалась от таковой в контрольной группе – 3% и 4% соответственно (таблица 5).

Таблица 5.

Частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма 3020insC гена *CARD15*

3020insC		БК (N=64)	ЯК (N=77)	Контроль (N=90)	БК и К	ЯК и К	БК и ЯК
		n (%)	n (%)	n (%)	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
Генотип	-/-	46 (72)	72 (93,5)	85 (94,5)	<0,001	0,9	0,001
	-/3020insC	12 (19)	5 (6,5)	3 (3,3)	0,004	0,5	0,049
	3020insC / 3020insC	6 (9)	0 (0)	2 (2,2)	0,11	0,5	0,02
Аллель	-	104 (81)	149 (97)	173 (96)	<0,001	0,9	0,001
	3020insC	18 (19)	5 (3)	7 (4)			

Носительство аллеля 3020insC в 5,6 раз повышало риск развития БК (ОШ=5,62; 95% ДИ: 1,84-17,22) и сколько-нибудь значимо не было ассоциировано с увеличением риска развития ЯК (ОШ=0,8; 95% ДИ: 0,18-3,66).

Показано, что носительство аллеля 3020insC гена *CARD15* ассоциировано со степенью тяжести клинических проявлений БК, а именно, у пациентов-носителей аллеля 3020insC тяжелая атака БК встречалась в 1,85 раз достоверно чаще по сравнению с пациентами, не имеющими данный аллель – 55,5% и 30% соответственно, что в 2,8 раз увеличивало риск развития тяжелой степени клинических проявлений БК (ОШ=2,85; 95% ДИ: 1,59-5,1; $p=0,005$).

Показано, что аллель 3020insC гена *CARD15* ассоциирован с различными фенотипическими вариантами БК. Частота аллеля 3020insC была в 5 раз достоверно выше в объединенной группе пациентов с осложненными формами БК – стенозирующими и пенетрирующими ($p=0,04$) по сравнению с пациентами с люминальными формами. При этом носительство аллеля 3020insC гена *CARD15*, особенно среди женщин, в 3,8 раз увеличивало риск развития осложненных вариантов течения БК по сравнению с пациентами, не имеющими данный аллель (ОШ=3,8; 95% ДИ: 1,99-7,4).

У пациентов с ЯК достоверно значимые различия между носительством аллеля 3020insC гена *CARD15* и особенностями клинического течения заболевания отсутствовали.

Достоверно значимых различий между носительством аллеля 3020insC гена *CARD15* и необходимостью проведения гормональной и иммуносупрессивной терапии у пациентов с БК и ЯК установлено не было.

Обнаружено, что у пациентов-носителей аллеля 3020insC гена *CARD15* оперативное вмешательство проводилось в 1,9 раз чаще по сравнению с пациентами, не имеющими данный аллель – 83% и 43,5% соответственно ($p=0,008$). При этом носительство аллеля 3020insC в 6,5 раз увеличивало риск проведения оперативного вмешательства по сравнению

с пациентами, не имеющими данный аллель, особенно у женщин (ОШ=6,48; 95% ДИ: 3,36-12,5), тогда как мужчины-носители в 100 % случаев имели оперативное вмешательство по сравнению с мужчинами, не имеющими аллель 3020insC ($p=0,04$).

У пациентов с ЯК не было выявлено достоверно значимых различий между носительством аллеля 3020insC гена *CARD15* и необходимостью проведения оперативного вмешательства.

Результаты клинико-диагностической и прогностической значимости полиморфизма 3020insC гена *CARD15* при БК и ЯК у пациентов, проживающих на территории Кемеровской области существенно отличаются от Японии, Кореи и Китая (Leong R.W. et al., 2003; Lee G. H. et al. 2005), где данный аллель отсутствует вне зависимости от наличия БК и ЯК, тогда как совпадают с большинством европейских стран и другими регионами России (Северо-Западный регион и Московская область) (Насыхова Ю.А. и др., 2010; Степанова Е.В., 2009). Поэтому определение аллеля 3020insC гена *CARD15* у жителей европейских стран и Российской Федерации, в том числе Кемеровской области, служит дополнительным маркером верификации БК, но не ЯК, а также прогностическим фактором оценки риска развития степени тяжести клинических проявлений, осложненного течения и необходимости проведения хирургического лечения БК.

Диагностическая и прогностическая значимость полиморфизма G2722C гена *CARD15* при болезни Крона и язвенном колите

Проведенный сравнительный анализ распространенности полиморфизма G2722C гена *CARD15* у 141 пациента с ВЗК и 90 пациентов контрольной групп, проживающих на территории Кемеровской области, показал, что частота встречаемости аллеля 2722C гена *CARD15* у пациентов с БК по сравнению с пациентами с ЯК и контрольной группой не имела достоверно значимых различий – 2%, 1% и 2% соответственно, что существенно отличается от Северо-Западного региона России и греческой популяции, где данный аллель не ассоциирован с риском развития и особенностями клинического течения БК и ЯК (Насыхова Ю.А. и др., 2010; Gazouli M. et al., 2005) и совпадает с восточноазиатскими странами.

Совокупность полученных результатов позволяет заключить, что аллель 2722C гена *CARD15* не обладает диагностической и прогностической значимостью при развитии БК и ЯК если не во многих странах, то хотя бы в восточноазиатских странах и в некоторых российских регионах, в частности, в Кемеровской области, а значит, включение его в список полиморфизмов для диагностики и прогнозирования развития БК и ЯК в данных регионах можно признать необоснованным.

Диагностическая и прогностическая значимость полиморфизма G308A гена *TNF-α* при болезни Крона и язвенном колите

Изучение частоты встречаемости аллелей и генотипов нуклеотидного полиморфизма G308A гена *TNF-α* было выполнено у 52 пациентов с БК, 62 пациентов с ЯК и 65 пациентов контрольной группы, проживающих на территории Кемеровской области.

Проведенный сравнительный анализ распространенности полиморфизма G308A гена *TNF-α* показал, что частота встречаемости аллеля 308A у пациентов с БК не имела достоверно значимых различий по сравнению пациентами с ЯК и контрольной группой – 16%, 10,5% и 18% соответственно.

При этом установлено, что аллель 308А гена *TNF-α* ассоциирован с возрастными особенностями фенотипической реализации БК, особенно среди женщин, которые имели более поздний возраст первых клинических проявлений и установления окончательного диагноза БК – 44 и 46 лет соответственно по сравнению с женщинами с отсутствием данного аллеля – 30 и 32 года соответственно ($p \leq 0,05$), тогда как у мужчин этой ассоциации не выявлено.

Показано, что наличие аллеля 308А гена *TNF-α* достоверно значимо ассоциировано с возрастными особенностями фенотипической реализации ЯК – пациенты-носители аллеля имели более поздний возраст дебюта и установления окончательного диагноза ЯК – 43 и 44 года соответственно по сравнению с пациентами с отсутствием данного аллеля – 34 и 34 года соответственно ($p \leq 0,05$).

Носительство аллеля 308А гена *TNF-α* не показало достоверно значимых ассоциаций с особенностями клинического течения, необходимостью проведения гормональной и иммуносупрессивной терапии, а также хирургического лечения БК и ЯК.

Полученные результаты диагностической и прогностической значимости полиморфизма G308А гена *TNF-α* у пациентов, проживающих на территории Кемеровской области, существенно отличаются от других регионов России, в частности, Новосибирской области (Валуйских Е.Ю. и др., 2008,) где аллель 308А был ассоциирован с риском развития БК и стероидозависимостью при БК и ЯК, Московской области и Северо-Западного региона РФ, где показано наличие с риском развития БК, а также перианальным поражением, неэффективностью медикаментозной терапии и частым рецидивирующим течением ЯК (Шумилов П.В., 2010; Насыхова Ю.А. и др., 2010).

Таким образом, полиморфизм G308А гена *TNF-α* имеет значимые региональные особенности распространенности, диагностической и прогностической значимости при развитии БК и ЯК как в пределах одной страны, так и среди других мировых популяций. При этом среди пациентов, проживающих на территории Кемеровской области, полиморфизм G308А служит прогностическим фактором отсроченного развития БК и ЯК, что позволяет его определить использовать для оценки возрастных особенностей фенотипических проявлений ВЗК.

Диагностическая и прогностическая значимость полиморфизма BsmI гена VDR при болезни Крона и язвенном колите

Для оценки частоты встречаемости аллелей и генотипов нуклеотидного полиморфизма BsmI гена VDR при ВЗК нами было проведено молекулярно-генетическое тестирование 60 образцов ДНК пациентов с БК, 76 – с ЯК и 85 пациентов контрольной группы.

Установлено, что частота встречаемости аллеля В полиморфизма BsmI гена VDR у пациентов с БК, проживающих на территории Кемеровской области, была в 1,5 раза выше по сравнению с контрольной группой (38% и 26,5% соответственно, $p=0,6$) и не отличалась от таковой у пациентов с ЯК – 44%, тогда как у пациентов с ЯК частота данного аллеля была в 1,7 раз достоверно выше по сравнению с контрольной группой ($p=0,007$). При этом частота встречаемости гомозиготного генотипа ВВ полиморфизма BsmI у пациентов с ЯК была в 3 раза чаще по сравнению с контрольной группой – 21% и 7% соответственно ($p=0,02$) и достоверно значимо не отличалась от таковой у пациентов с БК (17%, $p=0,5$). Носительство аллеля В в 2,2 раза повышало риск развития ЯК (ОШ=2,2; 95% ДИ: 1,2-4,1), тогда как

носительство гомозиготного генотипа ВВ увеличивало риск развития ЯК до 3,5 раз (ОШ=3,5; 95% ДИ: 1,4-8,6) (таблица 6).

Таблица 6.

Частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма BsmI гена VDR

BsmI		БК	ЯК	Контроль	БК и	ЯК и	БК и
		(N=60)	(N=76)	(N=85)	К	К	ЯК
		n (%)	n (%)	n (%)	p	p	p
Генотип	bb	24 (40)	25 (33)	46 (54)	0,09	0,007	0,4
	Bb	26 (43)	35 (46)	33 (39)	0,6	0,3	0,7
	BB	10 (17)	16 (21)	6 (7)	0,1	0,02	0,5
Аллель	b	74 (62)	85 (56)	125 (73,5)	0,6	0,02	0,1
	B	36 (38)	51 (44)	39 (26,5)			

Частота встречаемости гомозиготного генотипа bb полиморфизма BsmI гена VDR у пациентов с БК была в 1,3 раза ниже по сравнению с контрольной группой ($p=0,09$) и не отличалась от таковой у пациентов с ЯК, тогда как у пациентов с ЯК генотип bb встречался в 1,6 раз достоверно реже по сравнению с контрольной группой – 33% и 54% соответственно ($p=0,02$; ОШ=0,4; 95% ДИ: 0,2-0,7), что указывает на возможный протективный эффект данного генотипа в развитии ЯК.

Установлено, что носительство аллеля В полиморфизма BsmI ассоциировано с возрастными особенностями фенотипической реализации ЯК, особенно у мужчин, а именно, более поздним возрастом первых клинических проявлений и установления окончательного диагноза ЯК – 37 и 43 лет соответственно, по сравнению с мужчинами, не имеющими данного аллеля – 27,5 и 28,5 лет соответственно ($p \leq 0,05$), тогда как у женщин эта ассоциация отсутствовала.

Установлено, что носительство аллеля В полиморфизма BsmI гена VDR ассоциировано с локализацией БК в виде колита (L2), что в 5,5 раз увеличивало риск развития данного поражения кишечника при БК (ОШ= 5,5; ДИ: 1,1-27,4).

Достоверно значимые различия между носительством аллеля В полиморфизма BsmI гена VDR и особенностями клинического течения ЯК, также как и необходимостью проведения гормональной, иммуносупрессивной терапии и хирургического лечения БК и ЯК, отсутствовали.

Полученные результаты диагностической и прогностической значимости полиморфизма BsmI гена VDR при БК и ЯК у пациентов, проживающих на территории Кемеровской области, существенно отличаются от представителей Ирландии и Ирана (Hughes D.J. et al., 2011; Naderi N. et al., 2008), где носительство аллеля В не ассоциировано с риском развития и особенностями клинического течения БК и ЯК, тогда как совпадают с таковыми Китая (Pei F.H. et al., 2011) и евреев ашкенази (Dresner-Pollak R. et al., 2004). При этом, чем выше частота встречаемости аллеля В полиморфизма BsmI (Иран и европейские страны – 46,3% и 41% соответственно), тем менее значимы его ассоциации с риском развития и особенностями клинического течения БК и ЯК, тогда как у представителей Китая, Кемеровской области и евреев ашкенази при меньшей частоте встречаемости (18,7%; 26,5% и 38,4% соответственно) определяется значимая диагностическая и прогностическая ценность аллеля В полиморфизма BsmI гена VDR при развитии БК и ЯК.

Диагностическая и прогностическая значимость индивидуально-средовых факторов при воспалительных заболеваниях кишечника

Изучение влияния индивидуально-средовых факторов (курения, перенесенных кишечных инфекций, глистных и паразитарных инвазий, а также операций на органах брюшной полости) на риск развития, особенности клинического течения, необходимость проведения гормональной и иммуносупрессивной терапии, а также хирургического лечения ВЗК было проведено у 64 пациентов с БК, 77 – с ЯК и 90 – контрольной группы.

Показано, что частота курящих лиц не имела достоверно значимых различий среди пациентов с БК и ЯК по сравнению с контрольной группой – 45%, 35% и 29% соответственно (таблица 7), что свидетельствует об отсутствии ассоциации курения с развитием ВЗК у пациентов, проживающих на территории Кемеровской области.

Таблица 7.

Частоты встречаемости индивидуально-средовых факторов у пациентов основной и контрольной групп

Индивидуально-средовой фактор		БК (N=64)	ЯК (N=77)	К (N=90)	БК и К	ЯК и К	БК и ЯК
		n (%)	n (%)	n (%)	p	p	p
Курение	ж	12 (39)	12 (31)	13 (29)	0,9	0,6	0,7
	м	17 (49)	15 (39)	22 (49)	0,2	0,1	0,8
	все	29 (45)	27 (35)	35 (39)	0,3	0,2	0,1
Кишечные инфекции**	ж	3 (9,1)	6 (14,3)	5 (11,1)	0,9	0,9	0,7
	м	2 (6,5)	1 (2,9)	2 (4,44)	0,9	0,9	0,6
	все	5 (7,8)	7 (9,1)	7 (7,8)	0,9	0,9	0,9
Глистные и паразитарные инвазии***	ж	6 (18)	7 (16,7)	10 (22,2)	0,9	0,7	0,9
	м	5 (16)	11 (31,4)	6 (13,3)	0,7	0,09	0,2
	все	11 (17)	18 (23,4)	16 (17,8)	0,9	0,4	0,4
Операции на органах* брюшной полости	ж	16 (48,5)	3 (7,1)	6 (13,3)	0,002	0,5	0,0001
	м	12 (38,7)	3 (8,6)	12 (26,7)	0,3	0,047	0,01
	все	28 (43,7)	6 (7,8)	18 (20)	0,001	0,04	0,0001
Аппендэктомия	ж	6 (18,2)	3 (7,1)	5 (11,1)	0,6	0,9	0,3
	м	6 (19,3)	3 (8,6)	8 (17,8)	0,9	0,3	0,3
	все	12 (18,7)	6 (7,8)	13 (14,4)	0,5	0,4	0,15

Примечание: ж – женщины, м – мужчины, * – перенесенные операции на органах брюшной полости, включая аппендэктомию, ** – объединенная группа пациентов с наличием в анамнезе сальмонеллеза, эшерихиоза, дизентерии и пищевых токсикоинфекций, *** – объединенная группа пациентов с наличием в анамнезе описторхоза, аскаридоза, токсокароза и жиардиаза

При этом показано, что курение ассоциировано с особенностями клинического течения и необходимостью проведения иммуносупрессивной терапии (азатиоприн) БК. У курящих пациентов с БК тяжелая атака и осложненные фенотипические варианты течения (пенетрирующие и стенозирующие) встречались в 2,4 и 1,7 раз соответственно достоверно чаще по сравнению с некурящими пациентами – 55% vs. 23% ($p=0,004$) и 62% vs. 36% ($p=0,03$) соответственно, что в 4 раза увеличивало риск развития тяжелых клинических

проявлений БК (ОШ=4,01; ДИ: 2,22-7,53) и в 2,9 раз – осложненного течения заболевания (ОШ=2,9; ДИ: 1,63-5,15). Кроме того, курящим пациентам с БК в 1,5 раза достоверно чаще назначалось лечение азатиоприном по сравнению с некурящими пациентами – 79% vs. 51% ($p=0,02$) соответственно, что в 3,6 раз увеличивало риск проведения иммуносупрессивной терапии при БК (ОШ=3,01; ДИ: 1,94-6,72).

Достоверно значимых ассоциаций курения с риском развития, особенностями клинического течения, необходимостью проведения гормональной и иммуносупрессивной терапии, а также оперативного лечения у пациентов с ЯК установлено не было.

Показано, что наличие в анамнезе кишечных инфекций (сальмонеллеза, эшерихиоза, дизентерии и пищевых токсикоинфекций), глистных и паразитарных инвазий (описторхоза, аскаридоза, токсокароза и жиардиаза) не ассоциировано с риском развития, особенностями клинического течения, необходимостью проведения гормональной и иммуносупрессивной терапии, а также хирургического лечения БК и ЯК.

Установлено, что перенесенные операции на органах брюшной полости (включая аппендэктомию, резекции различных отделов кишечника, операции по поводу кишечных свищей и абсцессов) встречались у пациентов с БК в 5,6 и 1,6 раз достоверно чаще по сравнению с пациентами с ЯК ($p=0,0001$) и контрольной группой ($p=0,001$) соответственно (таблица 7).

Наряду с этим показано, что частота встречаемости перенесенных операций на органах брюшной полости была в 3 раза достоверно выше в объединенной группе пациентов с осложненными (пенетрирующими и стенозирующими) вариантами течения БК и с проведением хирургического лечения по сравнению с пациентами с люминальными формами БК и с отсутствием в анамнезе операций на органах брюшной полости – 75% и 25%, 75% и 25% соответственно, что в 4,7 раз увеличивало риск развития осложненных форм БК и проведения хирургического лечения данной патологии (ОШ=4,71; ДИ: 1,59-14,0).

Полученные результаты клинико-диагностической и прогностической значимости перенесенных операций на органах брюшной полости при БК, с одной стороны, выступают в качестве проявления манифестации заболевания, а с другой – могут служить неблагоприятным прогностическим фактором осложненного течения и необходимости проведения последующего оперативного вмешательства БК, что необходимо учитывать при ведении и планировании лечебно-профилактических мероприятий этих пациентов.

Установлено, что у пациентов с ЯК перенесенные операции на органах брюшной полости встречались достоверно реже по сравнению с контрольной группой (7,8% и 20%, $p=0,04$; ОШ=0,26; 95% ДИ: 0,07-0,99), особенно среди мужчин, и пациентами с БК (7,8% и 43,7%, $p=0,0001$; ОШ=6,74; 95% ДИ: 1,68-26,9). Однако, полученные результаты клинико-диагностической и прогностической значимости перенесенных операций на органах брюшной полости при ЯК не позволяют сделать однозначного заключения об их протективном эффекте в развитии заболевания. Сколько-нибудь значимых ассоциаций перенесенных операций на органах брюшной полости с необходимостью проведения гормональной и иммуносупрессивной терапии при БК, также, как и особенностями клинического течения и необходимостью проведения оперативного лечения у пациентов с ЯК установлено не было.

Полученные результаты диагностической и прогностической значимости индивидуально-средовых факторов при БК и ЯК у пациентов, проживающих на территории

Кемеровской области имеют значимые различия по сравнению с европейскими, американскими и восточноазиатскими странами, что может быть обусловлено, с одной стороны популяционными особенностями диагностической и прогностической значимости различных индивидуально-средовых факторов в развитии БК и ЯК, а с другой – клинико-патогенетическими особенностями генетических факторов, ассоциированных с ВЗК, фенотипическую реализацию которых определяет тот или иной индивидуально-средовой фактор в зависимости от места проживания.

Индивидуально-средовые особенности клинико-патогенетической реализации генетических факторов при болезни Крона и язвенном колите

Изучение влияния индивидуально-средовых факторов (курения, перенесенных кишечных инфекций, глистных и паразитарных инвазий) на клинико-патогенетическую реализацию аллелей 3020insC гена *CARD15*, 308A гена *TNF-α* и В полиморфизма BsmI гена *VDR* при ВЗК было проведено у 64 пациентов с БК, 77 – с ЯК и 90 – контрольной группы, проживающих на территории Кемеровской области РФ.

Установлено, что курение, перенесенные кишечные инфекции (сальмонеллез, эшерихиоз, дизентерия и пищевые токсикоинфекции), глистные и паразитарные инвазии (описторхоз, аскаридоз, токсокароз и жиардиаз) не ассоциированы с клинической реализацией аллеля 3020ins гена *CARD15*, 308A гена *TNF-α* и В полиморфизма BsmI гена *VDR* у пациентов с БК и ЯК, проживающих на территории Кемеровской области РФ, что существенно отличается от других стран, в частности, Германии, где носительство аллеля 3020insC у курящих представителей увеличивало риск развития БК (Helbig K.L. et al., 2012), а также США и Японии, где наличие глистных инвазий обладало протективным эффектом в развитии БК только у пациентов, имеющих нуклеотидные полиморфизмы гена *CARD15* (Ramanan D. et al., 2016).

Полученные нами результаты индивидуально-средовых особенностей клинико-патогенетической реализации аллелей 3020insC гена *CARD15*, 308A гена *TNF-α* и В полиморфизма BsmI гена *VDR* у пациентов с БК и ЯК являются предпосылкой для поиска новых средовых факторов, обуславливающих фенотипическую реализацию данных нуклеотидных полиморфизмов генов при ВЗК, что, в свою очередь, позволит проводить оценку реальной диагностической и прогностической значимости ген-средового взаимодействия при БК и ЯК, а также целенаправленно модулировать влияние индивидуально-средовых факторов на фенотипическую реализацию генетических, ассоциированных с ВЗК.

Вклад генетических и индивидуально-средовых факторов в инициацию болезни Крона и язвенного колита

Для оценки комплексного вклада генетических и индивидуально-средовых факторов в развитие БК и ЯК нами был использован метод логистического регрессионного анализа. В состав модели прогноза развития БК были включены наиболее значимые предикторы – носительство аллелей 3020insC гена *CARD15*, В полиморфизма BsmI гена *VDR* и перенесенные операции на органах брюшной полости, развития ЯК – носительство аллеля В полиморфизма BsmI гена *VDR*, возраст пациента и перенесенные операции на органах брюшной полости (таблица 8).

Прогностические факторы развития воспалительных заболеваний кишечника

Предикторы развития болезни Крона				
Переменная	Коэффициент В±СО	Критерий Вальда χ^2	<i>p</i>	ОШ (ДИ)
Аллель 3020insC гена <i>CARD15</i> *	2,12±0,32	11,4	0,001	8,30 (2,41-28,6)
Аллель В полиморфизма BsmI гена <i>VDR</i> *	0,94±0,40	5,63	0,02	2,57 (1,17-5,46)
Возраст	0,01±0,01	0,75	0,4	1,01 (0,98-1,04)
Курение	0,50±0,39	1,63	0,2	1,65 (0,76-3,56)
Перенесенные операции на органах брюшной полости*	1,05±0,43	6,07	0,01	2,86 (1,23-6,63)
Константа	-2,16±0,72	9,06	0,003	0,11 (0,03-0,47)
Предикторы развития язвенного колита				
Аллель В полиморфизма BsmI гена <i>VDR</i> *	0,61±0,34	3,13	0,07	1,84 (0,93-3,65)
Возраст*	0,03±0,01	6,32	0,01	1,03 (1,01-1,06)
Перенесенные операции на органах брюшной полости*	-0,98±0,53	3,43	0,06	0,37 (0,13-1,07)
Перенесенные глистные и паразитарные инвазии	0,46±0,41	1,26	0,3	1,59 (0,70-3,62)
Константа	-1,75±0,57	9,55	0,002	0,17 (0,06-0,53)

Примечания: ОШ – отношение шансов, ДИ – границы 95% доверительного интервала, СО – стандартная ошибка, * – неблагоприятные предикторы развития заболевания

На основании показателей данной регрессионной модели получена математическая формула для оценки вероятности развития БК (Y_1): $Y_1 = \text{EXP}(Z_1) / (1 + \text{EXP}(Z_1))$,

$$Z_1 = (-2,16 + (X_1 \times 2,12) + (X_2 \times 0,94) + (X_3 \times 0,01) + (X_4 \times 1,05) + (X_5 \times 0,50)),$$

где: Y_1 – вероятность развития БК, X_1 – аллель 3020 insC гена *CARD15* («0» – отсутствие, «1» – наличие), X_2 – аллель В полиморфизма BsmI гена *VDR* («0» – отсутствие, «1» – наличие), X_3 – возраст пациента (лет) («0» – отсутствие, «1» – наличие), X_4 – перенесенные операции на органах брюшной полости («0» – отсутствие, «1» – наличие), X_5 – курение («0» – отсутствие, «1» – наличие); при значениях $Y_1 \geq 0,37$ модель прогнозирует развитие заболевания.

Для оценки вероятности развития ЯК (Y_2) была получена следующая математическая формула: $Y_2 = \text{EXP}(Z_2) / (1 + \text{EXP}(Z_2))$,

$$Z_2 = (-1,75 + (X_1 \times 0,61) + (X_2 \times 0,03) + (X_3 \times -0,98) + (X_4 \times 0,46)),$$

где Y_2 – вероятность развития ЯК, X_1 – аллель В полиморфизма BsmI гена *VDR* («0» – отсутствие, «1» – наличие), X_2 – возраст пациента (лет), X_3 – перенесенные операции на органах брюшной полости («0» – отсутствие, «1» – наличие), X_4 – перенесенные глистные и паразитарные инвазии («0» – отсутствие, «1» – наличие); при значениях $Y_2 \geq 0,47$ модель прогнозирует развитие ЯК

Общие характеристики полученных прогностических моделей развития БК и ЯК свидетельствуют о ее эффективности: значения χ^2 Пирсона составили 29,2 ($p=0,002$) и 17,6 ($p=0,001$) соответственно, диагностическая чувствительность – 66% и 63% соответственно, диагностическая специфичность – 65% и 68% соответственно, диагностическая

эффективность теста – 71,7% и 64% соответственно, площадь под ROC-кривой AUC – 0,72 [0,64–0,81] и 0,70 [0,60–0,76], что соответствует уровням хорошего классификатора.

Кроме того, сочетание носительства аллеля В полиморфизма BsmI гена *VDR*, перенесенных операции на органах брюшной полости, глистных и паразитарных инвазий показало прямую зависимость с возрастом пациента, тогда как при его отсутствии – данной корреляции не отмечается (значения $Y_2 < 0,47$).

В состав модели прогноза развития осложненных фенотипических вариантов БК было включено носительство аллеля 3020insC гена *CARD15*, 308A гена *TNF-α*, наличие перенесенных операций на органах брюшной полости и курение (таблица 9).

Таблица 9.

Предикторы развития осложненного течения болезни Крона

Переменная	Коэффициент В±СО	Критерий Вальда χ^2	<i>p</i>	ОШ (ДИ)
Аллель 3020insC гена <i>CARD15</i>	1,01±0,80	1,60	0,2	2,75 (0,55-13,7)
Аллель 308A гена <i>TNF-α</i>	1,15±0,74	2,37	0,13	3,16 (0,70-14,3)
Перенесенные операции на органах брюшной полости*	1,45±0,78	3,49	0,06	4,26 (0,89-20,3)
Курение*	1,42±0,69	4,22	0,045	4,12 (1,03-16,5)
Константа	-1,22±0,61	4,03	0,05	0,29 (0,09-1,01)

Примечания: ОШ – отношение шансов, ДИ – границы 95% доверительного интервала, СО – стандартная ошибка, * – неблагоприятные предикторы развития осложненного течения БК

На основании показателей данной регрессионной модели получена математическая формула для оценки вероятности развития осложненных фенотипических вариантов БК (Y_3):

$$Y_3 = \text{EXP}(Z_3) / (1 + \text{EXP}(Z_3)), Z_3 = (-1,22 + (X_1 \times 1,01) + (X_2 \times 1,45) + (X_3 \times 1,42) + (X_4 \times 1,15)),$$

где Y_3 – вероятность развития осложненного течения болезни Крона, X_1 – аллель 3020 insC гена *CARD15* («0» – отсутствие, «1» – наличие), X_2 – перенесенные операции на органах брюшной полости («0» – отсутствие, «1» – наличие), X_3 – курение («0» – отсутствие, «1» – наличие), X_4 – аллель 308A гена *TNF-α* («0» – отсутствие, «1» – наличие); при значениях $Y_3 \geq 0,55$ модель прогнозирует развитие осложненных фенотипических вариантов БК

Общие характеристики полученной прогностической модели развития осложненных форм БК свидетельствуют о ее эффективности: значение χ^2 Пирсона составило 13,5 ($p=0,009$), диагностическая чувствительность – 72%, диагностическая специфичность – 65%, диагностическая эффективность теста – 65,4%, площадь под ROC-кривой AUC – 0,79 [0,60–0,76], что соответствует уровню хорошего классификатора.

Таким образом, применение метода логистического регрессионного анализа с целью установления роли генетических и индивидуально-средовых факторов в прогнозировании риска развития и особенностей клинического течения ВЗК еще раз подтвердило значение аллеля 3020insC гена *CARD15* и перенесенных операций на органах брюшной полости в развитии БК. Кроме того, полученная модель комплексного вклада нуклеотидных полиморфизмов генов и индивидуально-средовых факторов, ассоциированных с развитием БК, показала достоверно значимую ассоциацию носительства аллеля В полиморфизма BsmI гена *VDR* с развитием БК (ОШ=2,57; 95%

ДИ: 1,17-5,46), что, скорее всего, отражает клинико-патогенетическую значимость ген-средового, а также ген-генного взаимодействия при развитии БК. Полученная модель прогнозирования риска развития осложненного течения БК показала значимость только индивидуально-средовых факторов, а именно, перенесенных операций на органах брюшной полости и курения, тогда как носительство аллеля 3020insC гена *CARD15*, в сочетании с данными средовыми факторами, не обладает значимой предсказательной ценностью в оценке клинического течения БК. Для ЯК наиболее значимыми предикторами развития заболевания послужили носительство аллеля В полиморфизма BsmI гена *VDR* и возраст пациента, тогда как перенесенные операции на органах брюшной полости продемонстрировали протективный эффект в развитии данной патологии.

Полученные результаты прогностических моделей риска развития и особенностей клинического течения БК и ЯК свидетельствуют о необходимости учета комплексного вклада генетических и индивидуально-средовых факторов, ассоциированных с ВЗК, что, в свою очередь, может быть использовано для разработки молекулярно-генетических технологий диагностики и прогнозирования развития БК и ЯК.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, проживающих на территории Кемеровской области, по сравнению с лицами контрольной группы аллель 3020insC гена *CARD15* встречается достоверно чаще при болезни Крона (19% и 4%, $p < 0,001$), аллель В полиморфизма BsmI гена *VDR* – язвенном колите (44% и 26,5% соответственно, $p = 0,02$), тогда как достоверно значимых различий в частоте встречаемости аллеля 2722C гена *CARD15* и 308A гена *TNF- α* не обнаружено.

2. Подтверждена клинико-лабораторная корреляция носительства аллеля 3020insC гена *CARD15* с риском развития болезни Крона (ОШ=5,62; 95% ДИ: 1,84-17,22), ее тяжелого течения (ОШ=2,85; 95% ДИ: 1,59-5,1) и осложненными (пенетрирующие и стенозирующие) фенотипическими вариантами (ОШ=3,8; 95% ДИ: 1,99-7,4), требующими хирургического лечения (ОШ=6,48; 95% ДИ: 3,36-12,5), тогда как носительство аллеля 2722C гена *CARD15* не влияет на риск развития и особенности клинического течения воспалительных заболеваний кишечника.

3. Носительство аллеля В полиморфизма BsmI гена *VDR* ассоциировано с риском развития язвенного колита (ОШ=2,2; 95% ДИ: 1,2-4,1) и его поздним возрастом дебюта (37 vs. 27,5 лет, $p = 0,05$), а также с локализацией болезни Крона в виде колита (L2) (ОШ=5,5; ДИ: 1,1-27,4), тогда как гомозиготное носительство аллеля b обладает протективным эффектом в отношении развития язвенного колита (ОШ=0,4; 95% ДИ: 0,2-0,7).

4. Носительство аллеля 308A гена *TNF- α* не влияет на риск развития, особенности клинического течения и необходимость проведения оперативного лечения воспалительных заболеваний кишечника, однако, ассоциировано с более поздним возрастом дебюта болезни Крона и язвенного колита (44 vs. 30 лет и 43 vs. 34 года соответственно).

5. Информативность и прогностическая значимость нуклеотидных полиморфизмов 3020insC и G2722C гена *CARD15*, G308A гена *TNF- α* и BsmI гена *VDR* при воспалительных

заболеваниях кишечника имеют выраженные популяционные различия, как среди различных стран, так и в пределах отдельных регионов одной страны.

6. Курение независимо от носительства аллелей 3020insC гена *CARD15*, 308A гена *TNF- α* и аллеля В полиморфизма BsmI гена *VDR* служит неблагоприятным фактором развития тяжелого течения (ОШ=4,01; ДИ: 2,22-7,53), осложненных фенотипических вариантов (ОШ=2,9; ДИ: 1,63-5,15), а также проведения иммуносупрессивной терапии болезни Крона (ОШ=3,01; ДИ: 1,94-6,72), тогда как перенесенные кишечные инфекции, глистные и паразитарные инвазии – не влияют на фенотипическую реализацию болезни Крона и язвенного колита.

7. Наибольший риск развития болезни Крона отмечается при наличии аллеля 3020insC гена *CARD15*, В полиморфизма BsmI гена *VDR* в сочетании с перенесенными операциями на органах брюшной полости (аппендэктомия, резекции различных отделов кишечника, операции по поводу кишечных свищей и абсцессов), язвенного колита – аллеля В полиморфизма BsmI гена *VDR*. При этом одновременное выявление носительства аллеля 3020insC гена *CARD15*, курения и наличия в анамнезе операций на органах брюшной полости служат неблагоприятными прогностическими факторами развития осложненных фенотипических вариантов болезни Крона.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики, гастроэнтерологов, общей практики, абдоминальных хирургов, а также специалистов территориальных органов управления и организации здравоохранения:

1. При проведении комплексной диагностики воспалительных заболеваний кишечника в качестве дополнительных малоинвазивных маркеров верификации болезни Крона показано использование определения полиморфизмов 3020insC гена *CARD15* и BsmI гена *VDR*, язвенного колита – BsmI гена *VDR*.

2. Для прогнозирования развития тяжелого клинического течения и осложненных (пенетрирующие и стенозирующие) фенотипических вариантов болезни Крона, требующих проведения оперативного лечения, следует включать в алгоритм традиционных клинических и лабораторно-инструментальных методов диагностики определение нуклеотидного полиморфизма 3020insC гена *CARD15*.

3. Для повышения клинической значимости молекулярно-генетических методов прогнозирования развития и диагностики болезни Крона и язвенного колита необходимо создание информационных баз данных распространенности, клинико-диагностической и прогностической значимости генетических и средовых факторов, ассоциированных с воспалительными заболеваниями кишечника, для отдельных стран и регионов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Одним из дальнейших направлений работы является продолжение изучения особенностей распространенности, клинико-диагностической и прогностической значимости нуклеотидных полиморфизмов генов и средовых факторов, ассоциированных с

развитием болезни Крона и язвенного колита в сочетании с серологическими, фекальными и микробиологическими маркерами в разных регионах Российской Федерации. Это позволит не только установить особенности клинической реализации ключевых факторов патогенеза воспалительных заболеваний кишечника, но и внедрить в клиническую практику новые технологии лабораторной диагностики и прогнозирования развития болезни Крона и язвенного колита с учетом популяционных, региональных и индивидуальных особенностей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации

1. Кузнецова, Д.А. Молекулярно-генетическая оценка прогноза хирургического лечения неспецифических воспалительных заболеваний кишечника / Д.А. Кузнецова, М.В. Мерзляков, А.С. Разумов // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2014. – Т. 17. №4 (51). – С. 35-40.

2. Кузнецова, Д.А. Популяционные особенности распространенности и клинико-диагностической значимости полиморфизмов гена NOD2, ассоциированных с болезнью Крона / Д.А. Кузнецова, М.В. Мерзляков, Г.В. Вавин, А.С. Разумов, В.Л. Эмануэль // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2016. – Т. 26, № 4. – С. 116-123.

3. Кузнецова, Д.А. Молекулярно-генетическая диагностика воспалительных заболеваний кишечника / Д.А. Кузнецова, А.С. Разумов, М.В. Мерзляков, Г.В. Вавин, Р.В. Репникова // Альманах клинической медицины. – 2017. – Т. 45, № 5. – С. 408-415.

4. Кузнецова, Д.А. Ассоциация полиморфизма VsmI-гена рецептора витамина D (VDR) с воспалительными заболеваниями кишечника / Д.А. Кузнецова, А.С. Разумов, В.Л. Эмануэль, Г.В. Вавин // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. – 2018. – Т. 2, № 19. – С. 25-28.

Статьи, тезисы докладов в материалах конференций

5. Кузнецова, Д.А. Генетические нарушения аутофагии / Д.А. Кузнецова, М.В. Мерзляков // Проблемы медицины и биологии: материалы межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и студентов с междунар. участием (Кемерово, 18-19 апр. 2013 г.). – Кемерово: КемГМА, 2013. – С. 109.

6. Кузнецова, Д.А. Перспективы внедрения молекулярно-генетических исследований в оценке прогноза развития воспалительных заболеваний кишечника / Д.А. Кузнецова, М.В. Мерзляков, А. С. Разумов // Новые задачи медицины и пути их решения: сб. статей международной научно-практической конференции / Под ред. А.А. Сукиасян. – Уфа: Аэтерна, 2014. – С. 68.

7. Кузнецова, Д.А. Нуклеотидные полиморфизмы генов в оценке прогноза хирургического лечения неспецифических воспалительных заболеваний кишечника / Д. А. Кузнецова, М.В. Мерзляков, А. С. Разумов // Актуальные вопросы абдоминальной хирургии и онкологии: сборник тезисов III межрегиональной научно-практической конференции. – Томск: Иван Федоров, 2014. – С. 75-77.

8. Кузнецова, Д.А. Популяционные особенности прогнозирования риска развития, клинического течения и хирургических осложнений болезни Крона / Д. А. Кузнецова, М.В. Мерзляков, А. С. Разумов, И.А. Радионов, Г.В. Вавин // Актуальные вопросы

современной хирургии: материалы межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, посвященная 55-летию кафедры и клиники госпитальной хирургии КемГМА и 60-летию КемГМА. – Кемерово: ФГОУ ВПО КемГМА Минздрава России, 2015. – С. 22-25.

9. Кузнецова, Д.А. Молекулярно-генетическая оценка риска развития воспалительных заболеваний кишечника / Д.А. Кузнецова, М.В. Мерзляков, А. С. Разумов, Г.В. Вавин // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины: сборник научных трудов к 60-летию КемГМА. – Кемерово: ООО «ИНТ», 2015. – С. 112-113.

10. Кузнецова, Д.А. Популяционные особенности клинико-диагностической значимости генетических факторов риска болезни Крона / Д.А. Кузнецова, М.В. Мерзляков, А. С. Разумов, Г.В. Вавин // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии (прил. № 48): мат. XXII Объединенной Российской Гастроэнтерологической Недели, 2016. – Т. 26, № 5. – С. 40.

11. Kuznetsova, D.A. VDR gene BSM I polymorphism and ulcerative colitis / D.A. Kuznetsova, A. Razumov, M. Merzlyakov, G. Vavin // United European Gastroenterology Journal, 2017. – V. 5, Supplement №1. – P. 274.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БК – болезнь Крона

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ЯК – язвенный колит

CARD15 – caspase activation and recruitment domain 15, каспазо-активирующий домен

GWAS – Genome-wide association studies, широкомасштабные ассоциативные исследования генома человека

TNF- α – tumor necrosis factor- α , фактор некроза опухоли α

VDR – vitamin D receptor, рецептор витамина D