



На правах рукописи

Ставцев Дмитрий Сергеевич

**ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРИ ЯЗВЕННОМ
КОЛИТЕ И БОЛЕЗНИ КРОНА У ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ
МОСКОВСКОГО РЕГИОНА**

03.02.07 - генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

4 МАЙ 2016



Москва - 2016

Работа выполнена на кафедре биологии и общей генетики медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ и в ГБУЗ города Москвы «Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения города Москвы» с 23.11.2013 г. согласно приказу ДЗМ №278 от 27.03.2013 г. реорганизованном в ГБУЗ «Станция переливания крови Департамента здравоохранения города Москвы».

Научные руководители:

доктор медицинских наук Астрелина Татьяна Алексеевна
доктор биологических наук, доцент Азова Мадина Мухамедовна

Официальные оппоненты:

Полоников Алексей Валерьевич
доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

Филиппова Тамара Владимировна

доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры медицинской генетики ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ

Ведущая организация:

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Защита диссертации состоится «25» сентября 2016 года в 15 часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.39 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6) и на сайте www.rudn.ru.

Автореферат размещен на сайте www.vak.ed.gov.ru

Автореферат разослан «19» сентября 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.203.39
кандидат биологических наук, доцент



О.Б. Гигани

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК) относятся к воспалительным заболеваниям кишечника (ВЗК), при которых наблюдаются комплексные расстройства организма.

Распространенность язвенного колита в мире составляет от 5 до 500, болезни Крона – от 2 до 300 случаев на 100 тыс. населения [Белоусова Е.А., 2006; Ekblom A., 1991, 2004; Long, M., 2014; Molodecky N.A., 2012; Ponder A., 2013; Thia K., 2008], причем наиболее высокая встречаемость ЯК и БК отмечается в экономически развитых странах, низкая – в странах Азии и Южной Америки [Ekblom A. et al., 1991, 2004; Long, M. et al., 2014; Molodecky N.A. et al., 2012; Ponder A. et al., 2013; Thia K. et al., 2008].

В России, согласно немногочисленным исследованиям, данный показатель колеблется в диапазоне 3 – 20 случаев на 100 тыс. населения [Бодрягина Е.С. и др., 2013; Никулина И.В., 1997; Белоусова Е.А., 2006; Николаева Н.Н. и др., 2004; Ткачев А.В. и др., 2009].

Как известно, важная роль в иммунном ответе в целом, и в возникновении ЯК и БК в частности, принадлежит главному комплексу гистосовместимости (МНС), причем развитие обоих заболеваний носит мультифакториальный характер. К настоящему времени проведено значительное количество исследований, связывающих указанные заболевания с определенными генами HLA-системы. Так, исследователями из разных стран, в числе которых США [Trachtenberg E.A. et al., 2003], Канада [Silverberg M.S. et al., 2003], Испания [Fernandez, L. et al., 2004], Финляндия [Lappalainen M. et al., 2008], была подтверждена связь аллеля HLA-DRB1*0103 как с развитием БК и ЯК в целом, так и с характером течения заболеваний и их осложнений. Во многих работах показано существование ассоциации HLA-DRB1*1502 с развитием ЯК [Fisher S.A. et al., 2008; Stephen A. et al., 2011].

В Израиле установлена взаимосвязь развития БК с DR15 [Gulwani-Akolkar V. et al., 2006], в Германии – с HLA-DRB1*0701 [Адлер Г., 2001], в Китае – с HLA-Cw*12 [Okada Y. et al., 2011], в Японии – с HLA-DRB1*0405 и 0410 [Kawasaki A. et al., 2000]. В Великобритании ЯК ассоциирован с HLA-DRB1*103, HLA-DRB1*12 [Satsangi J. et al., 1996], в Голландии - с HLA-DRB1*15 [Bouma G. et al., 1997], в Китае - с HLA-DRB1*07 и HLA-Cw*07 [Jun Yun et al., 2003; Zhang H.X. et al., 2011], в Корее – с HLA-DR2 и DRB1*1502 [Stephen A. et al., 2011]. В ряде исследований оценивалась не только предрасположенность к заболеванию, но и к определенным его формам. Так, в Италии установлена ассоциация DRB1*0304, DRB1*0305, DRB1*0307, DRB1*0309 с тотальным поражением толстой кишки [Annese V. et al., 2005], в Испании HLA-DRB1*07 – с терминальным илеитом при БК и HLA-DRB1*0103 – с колитом [Fernandez, L. et al., 2004].

В России подобного рода исследований крайне мало, и они, в основном, проводились с использованием серологических методов типирования. Согласно полученным результатам, развитие ЯК ассоциировано с Cw4, DR3, DR5 [Морозова Н.А., 1997], В13 и Cw4 [Белоусова Е.А., 1998], DRB1*01 [Лоранская И.Д. и др., 2001], A29, В13, DR3 [Павленко В.В., 2003], БК – с В14 и А3 [Морозова Н.А., 1997], В18 и DRB1*01 [Лоранская И.Д. и др., 2001]. При исследовании ЯК и БК были выявлены общие положительные ассоциации с В14, DR3 и DR5 [Морозова Н.А., 1997; Белоусова Е.А., 1998].

Степень разработанности темы

Несмотря на многочисленные исследования иммуногенетической предрасположенности к возникновению ЯК и БК, сведения о роли антигенов HLA в патогенезе данных заболеваний противоречивы и требуют дальнейшего изучения, причем обращает на себя внимание тот факт, что полученные данные имеют выраженную этническую специфичность. В этой связи следует отметить, что недостаточно полно охарактеризованы частота среди больных ВЗК Московского региона различных аллельных групп системы HLA, их связь с клиническими формами ЯК и БК, тяжестью течения указанных заболеваний, с возрастом и полом пациентов и ответом на проводимую терапию.

Цель исследования

Изучить иммуногенетические маркеры предрасположенности и протекции к развитию язвенного колита и болезни Крона у взрослого славянского населения Московского региона.

Задачи исследования

1. Изучить встречаемость различных аллельных групп генов HLA среди проживающих в Московском регионе славян, страдающих язвенным колитом.
2. Выявить ассоциации между группами аллелей HLA и предрасположенностью к развитию ЯК, клинической формой, степенью тяжести заболевания и ответом на проводимую терапию, полом и возрастом пациентов.
3. Изучить встречаемость различных аллельных групп генов HLA среди славян с болезнью Крона, проживающих в Московском регионе.
4. Исследовать распределение групп аллелей HLA в зависимости от клинической формы БК, степени тяжести заболевания и ответа на проводимую терапию, пола и возраста пациентов.
5. Выявить HLA-маркеры предрасположенности и протекции к развитию ВЗК у взрослого славянского населения Московского региона.

Научная новизна работы

Впервые с применением технологии генотипирования проведено изучение полиморфизма генов HLA I и II классов у пациентов с ЯК, БК и в общей группе больных ВЗК славян, проживающих в Московском регионе.

Впервые исследовано распределение генов HLA I и II классов в группах пациентов с ЯК, БК и ВЗК в зависимости от клинической формы, тяжести течения заболевания, ответа на гормональную терапию, возраста и пола больных.

Впервые установлено, что группы аллелей A*26, V*38 и C*12 являются общими маркерами предрасположенности к развитию ЯК и ВЗК у женщин старше 35 лет. Впервые показана связь группы аллелей V*52 с развитием ЯК и ВЗК в возрасте до 35 лет, V*56 отнесен к маркерам развития ВЗК в возрасте после 35 лет. Показана ассоциация V*58 с ЯК.

Впервые выявлено, что с развитием БК у женщин ассоциирована группа аллелей C*12. Впервые охарактеризованы маркеры различных форм БК. Показано, что характерными маркерами стриктурирующего типа БК являются V*38 и A*11. Маркерами нестриктурирующего, непенетрирующего типа являются группы аллелей C*14 и V*56. C*14 ассоциирована также с развитием БК у мужчин.

Впервые установлено, что маркерами протекции к развитию ЯК являются группы аллелей V*15, C*04 и DQB1*02, причем V*15 выступает маркером протекции к

развитию ЯК у мужчин, DQB1*02 – у лиц младше 35 лет. Установлено, что группа аллелей DRB1*07 отрицательно ассоциирована с развитием ВЗК у мужчин, DQB1*02 – с развитием ВЗК у мужчин младше 35 лет. Впервые определены характерные маркеры протекции, в частности, к развитию ВЗК им является С*03, к тяжелому течению БК – DQB1*03.

Впервые показано, что при наличии в генотипе групп аллелей А*26, В*38 возрастает вероятность развития рефрактерных к гормональной терапии форм ВЗК и ЯК, также характерными маркерами рефрактерности к гормональной терапии являются С*17 при ЯК и С*07 при ВЗК. Впервые установлено, что DRB1*07 является маркером протекции к развитию гормональной рефрактерности при ВЗК и ЯК, а С*06 – характерным маркером протекции к гормональной рефрактерности при ВЗК.

Впервые к маркерам восприимчивости к гормональной терапии отнесены В*52, В*56 и С*12 при ВЗК, В*52 и В*58 при ЯК, С*12 при БК. Впервые выявлен характерный маркер гормональной восприимчивости к терапии при ВЗК - DQB1*04. Установлено, что DQB1*02 отрицательно ассоциирована с развитием восприимчивых к гормональной терапии форм ЯК и ВЗК.

Впервые установлено, что развитие хронического непрерывного течения ВЗК и ЯК ассоциировано с А*26 и В*38, DRB1*14 является характерным маркером хронического непрерывного течения ЯК. Показано, что маркерами протекции к хроническому рецидивирующему течению ВЗК являются С*04 и DQB1*02, к данной форме БК - DQB1*02.

Маркером тотального колита при ЯК можно считать А*26 и В*38, характерным маркером левостороннего колита при ЯК – В*56.

Теоретическая и практическая значимость

На основании полученных в рамках представленного исследования данных установлены HLA-маркеры протекции и предрасположенности к возникновению как ЯК и БК, так и ВЗК в целом, которые будут способствовать более точному формированию групп риска, а также установлению диагноза на начальных стадиях соответствующего заболевания.

Иммуногенетические особенности, выявленные при разных клинических формах ВЗК, ЯК и БК позволят прогнозировать течение, степень тяжести заболевания, развитие рефрактерности к гормональной терапии с коррекцией тактики лечения пациентов.

При сравнении частоты групп аллелей HLA I и II класса в группах взрослых здоровых доноров и новорожденных Московского региона достоверных различий выявлено не было, что позволяет использовать образцы пуповинной крови в качестве контрольной группы при проведении генетических исследований HLA-системы взрослых пациентов.

Методология и методы диссертационного исследования

Для выявления иммуногенетических маркеров при язвенном колите и болезни Крона проводилось HLA-генотипирование методом SSO (Sequence Specific Oligonucleotides) с применением технологии LIFECODES и мультиплексного проточного анализатора Lumiplex. Образцы, при исследовании которых были получены двойные интерпретации при использовании метода SSO, были типированы методом ПЦП-SSP (Sequence Specific Primer). Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения Microsoft Excel, Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health («Open Epi»), версия 3.01 от 2013/04/06.

Положения, выносимые на защиту

1. Распределение аллельных групп генов HLA среди пациентов с ЯК, БК и ВЗК Московского региона отличается от их распределения среди здорового населения того же региона.

2. Изучение особенностей генетического полиморфизма HLA-системы у пациентов с ЯК, БК и ВЗК позволяет выявить генетические маркеры предрасположенности к указанным заболеваниям у славянского населения Московского региона.

3. Существует ряд иммуногенетических маркеров предрасположенности и протекции к развитию ЯК, БК и ВЗК у славянского населения Московского региона, зависящих от пола и возраста и ассоциированных с определенной клинической формой, течением, степенью тяжести заболевания, а также ответом на гормональную терапию.

4. При ВЗК имеются как общие для ЯК и БК иммуногенетические маркеры, так и специфичные для каждого заболевания.

Степень достоверности

Достоверность результатов исследования подтверждается объемом фактического материала (9685 исследований, 1937 образцов), применением современных технологий генотипирования и использованием методов статистической обработки данных, полностью соответствующих поставленным задачам.

Апробация результатов диссертации

Материалы диссертации доложены на VI научно-практической конференции «Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ» (Москва, 23 – 24 мая, 2013 г.), 27-ой Европейской конференции по иммуногенетике и гистосовместимости (The 27th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Poster Presentations, Маастрихт, Нидерланды, 11 – 14 мая, 2013 г.), заседаниях кафедры биологии и общей генетики медицинского института РУДН (2015 г.).

Внедрение результатов в практику

Результаты исследования внедрены в работу Государственного Бюджетного Учреждения здравоохранения «Банк стволовых клеток Департамента здравоохранения г. Москвы», реорганизованного 23.10.2013г. согласно приказу ДЗМ №327 от 27.03.2013г. в Государственное Бюджетное Учреждение здравоохранения «Станция переливания крови Департамента здравоохранения г. Москвы», и Центрального Научно-исследовательского института гастроэнтерологии г. Москвы (в настоящее время ГБУЗ Московский Клинический Научно-практический Центр).

Публикации результатов исследований

По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 5 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения и списка литературы. Работа

иллюстрирована 23 таблицами и 21 рисунком. Библиография включает 193 источника, из них 79 – отечественных и 114 – зарубежных.

Личный вклад автора

Автором лично выполнялись регистрация исследованных образцов, выделение ДНК и HLA-типирование; проводился анализ полученных из медицинской документации анамнестических, клинических и лабораторных данных пациентов с БК и ЯК; осуществлялись статистическая обработка и обобщение результатов исследования.

Материал исследования

В исследование были включены:

1. группа больных ЯК - 65 пациентов в возрасте от 20 до 73 лет (31 женщина и 34 мужчины, средний возраст составил $43,75 \pm 12,6$ лет) с установленным диагнозом ЯК. Диагноз ЯК был выставлен согласно рекомендациям по диагностике и лечению взрослых больных ЯК, основанным на международных стандартах, разработанных Европейским доказательным консенсусом по диагностике и лечению ЯК. Подгруппы сформированы согласно Монреальской классификации 2005 г., критериям Truelove-Witts, индексу активности ЯК или индексу Мейо (DAI).

Пациенты с ЯК были разделены в зависимости от:

- протяженности поражения кишечника на 3 подгруппы: с тотальным колитом - 37 пациентов (21 мужчина и 16 женщин); с левосторонним колитом - 25 пациентов, (13 женщин и 12 мужчин; с проктитом - 3 пациента (1 мужчина и 2 женщины).
- характера течения заболевания на 3 подгруппы: с острым течением - 6 пациентов (3 мужчин и 3 женщин); с хроническим непрерывным течением - 27 пациентов (13 женщин и 14 мужчин); с хроническим рецидивирующим течением - 32 пациента (17 мужчин и 15 женщин).
- тяжести течения заболевания на 3 подгруппы: с легким течением - 3 пациента (1 мужчина и 2 женщины); со среднетяжелым течением - 57 пациентов (31 мужчина и 26 женщин); с тяжелым течением - 5 пациентов (2 мужчины и 3 женщины).
- ответа на терапию глюкокортикоидами на 2 подгруппы: с восприимчивостью к гормональной терапии - 43 больных (20 мужчин и 23 женщины); с рефрактерностью к гормональной терапии - 22 человека (13 мужчин и 9 женщин), из них: 14 пациентов с гормональной зависимостью, 8 пациентов с гормональной резистентностью, у 6 из которых гормональная резистентность развилась на фоне гормональной зависимости.
- возраста установления диагноза на 2 подгруппы: младше 35 лет - 36 пациентов (23 мужчины и 13 женщин), диагноз был установлен в возрасте от 15 до 35 лет, средний возраст диагностирования заболевания составил $25,0 \pm 4,7$ лет; старше 35 лет - 29 больных (9 мужчин и 20 женщин), диагноз ЯК был установлен в возрасте от 36 до 66 лет, средний возраст диагностирования заболевания составил $49, 3 \pm 6,5$ лет.

2. группа больных БК – 53 пациента в возрасте от 19 лет до 70 лет (21 женщина и 32 мужчины, средний возраст составил $38,1 \pm 12,9$ лет) с установленным диагнозом БК. Диагноз БК был выставлен согласно международным стандартам, разработанным Европейским доказательным консенсусом по диагностике и лечению БК, учитывались критерии достоверного диагноза БК по Lennard-Jones. Подгруппы сформированы согласно Монреальской классификации 2005 г., критериям, разработанным Обществом по изучению ВЗК при Ассоциации колопроктологов России, индексу активности БК (индекс Беста; CDAI).

Пациенты с БК были разделены в зависимости от:

- локализации поражения кишечника на 3 подгруппы: с терминальным илеитом - 12 пациентов (7 мужчин и 5 женщин); с колитом - 16 пациентов (9 мужчин и 7 женщин); с илеоколитом - 25 человек (16 мужчин и 9 женщин).
- характера течения заболевания на 3 подгруппы: с острым течением - 2 пациента (мужчины); с хроническим непрерывным течением - 21 пациент (8 женщин и 13 мужчин); с хроническим рецидивирующим течением - 30 пациентов (17 мужчин и 13 женщин).
- тяжести течения заболевания на 3 подгруппы: с легким течением - 3 пациента (2 мужчин и 1 женщина); со среднетяжелым течением - 28 пациента (16 мужчин и 12 женщин); с тяжелым течением - 22 пациента (14 мужчин и 8 женщин).
- фенотипического варианта на 3 подгруппы: с нестриктурирующим, непенетрирующим типом - 24 пациента (17 мужчин и 7 женщин); со стриктурирующим типом - 24 пациента (14 мужчин и 10 женщин); с пенетрирующим типом - 5 пациентов (1 мужчина и 4 женщины).
- ответа на терапию глюкокортикоидами на 2 подгруппы: с рефрактерностью к гормональной терапии - 21 больной (14 мужчин и 7 женщин), в которую были объединены 14 пациентов с гормональной зависимостью, 7 пациентов с гормональной резистентностью, у 5 из которых гормональная резистентность развилась на фоне гормональной зависимости; с восприимчивостью к гормональной терапии - 32 пациента (18 мужчин и 14 женщин).
- возраста установления диагноза на 2 подгруппы: младше 35 лет - 37 пациентов (23 мужчины и 14 женщин), диагноз БК был установлен в возрасте от 9 до 34 лет, средний возраст диагностирования заболевания составил $23,5 \pm 4,5$ лет; старше 35 лет - 16 больных (9 мужчин и 7 женщин), диагноз БК был установлен в возрасте от 37 до 61 года, средний возраст диагностирования заболевания составил $49,8 \pm 6,4$ лет.

3. общая группа пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), включающая в себя все 118 пациентов с БК и ЯК, из них: 52 женщины и 66 мужчин, средний возраст составил $41,2 \pm 13,0$ лет.

Пациенты с ВЗК были разделены в зависимости от:

- течения заболевания на 3 подгруппы: с хроническим непрерывным течением ВЗК - 48 человек (21 женщина и 27 мужчин); с хроническим рецидивирующим течением - 62 пациента (34 женщины и 28 мужчин); с острым течением - 8 пациентов (5 мужчин и 3 женщины).
- тяжести течения заболевания на 3 подгруппы: со среднетяжелым течением - 85 пациентов (47 мужчин и 38 женщин); с тяжелым течением - 27 пациентов (16 мужчин и 11 женщин); с легким течением 6 пациентов (3 мужчины и 3 женщины).
- ответа на терапию глюкокортикоидами на 2 подгруппы: с рефрактерностью к гормональной терапии - 43 больных (27 мужчин и 16 женщин); с восприимчивостью к гормональной терапии - 75 пациентов (38 мужчин и 37 женщин).
- возраста установления диагноза на 2 подгруппы: младше 35 лет - 73 пациента (46 мужчин и 27 женщин), средний возраст установления диагноза составил $24,3 \pm 4,6$ лет; старше 35 лет - 45 больных (18 мужчин и 27 женщин), средний возраст установления диагноза составил $49,4 \pm 6,5$ лет.

Информация о диагнозе, клинической форме, степени тяжести, ответе на гормональную терапию пациентов БК и ЯК была получена при изучении медицинской документации.

Пациенты с ЯК и БК находились на лечении в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения «Центральный научно-исследовательский институт

гастроэнтерологии» (с июля 2013 г. – Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский клинический научно-практический центр» Департамента здравоохранения г. Москвы) в период с 2009 г. по сентябрь 2013 г. (главный врач – д.м.н. профессор Хатьков И.Е.).

В исследование были включены 2 контрольные группы:

- **Контрольная группа 1** – 1700 образцов пуповинной крови практически здоровых новорожденных, родившихся на 37–41 неделе гестации и внесенных в реестр неродственных доноров в г. Москве (HLA-типирование проводилось в 2004 - 2009 гг.).

- **Контрольная группа 2** – 119 образцов периферической крови практически здоровых доноров из числа взрослого населения Московского региона в возрасте от 20 до 72 лет (60 женщин и 59 мужчин), средний возраст которых составил $37,44 \pm 7,5$ лет (HLA-типирование осуществлялось в 2004 - 2013 гг.).

Все пациенты с заболеваниями ЯК, БК и доноры крови, вошедшие в контрольные группы, относились к славянам Московского региона.

Методы исследования

Забор периферической венозной крови у пациентов с ЯК, БК, здоровых взрослых доноров и пуповинной крови из пупочного канатика после отделения плаценты при физиологических и оперативных родах доношенных новорожденных (37–41 недель гестации, медиана – 40 недель) проводился с применением вакуумных систем для взятия крови в пробирки с антикоагулянтном ЭДТА при наличии информированного согласия и отсутствия стандартных противопоказаний к донорству.

Выделение ДНК из образцов крови проводилось автоматическим методом с использованием прибора для автоматического выделения нуклеиновых кислот NorDiag Argow и наборов реагентов Argow Blood DNA (Норвегия). После выделения изучали качество раствора ДНК с применением спектрофотометра SmartSpec Plus («Biorad», США). Все образцы ДНК соответствовали требуемым характеристикам: концентрации не ниже 15 нг/мкл и коэффициенту чистоты (A260/280) в пределах 1,7 – 1,9.

HLA-генотипирование выполнялось методом SSO с применением технологии LIFECODES и мультиплексного проточного анализатора Luminex. Метод основан на гибридизации одноцепочного продукта ПЦР (изучаемая ДНК) с аллель-специфичными олигонуклеотидными зондами (Sequence Specific Oligonucleotides, SSO). Работа прибора Luminex базируется на распознавании различных флуоресцирующих микросфер с фиксированными на них олигонуклеотидными зондами с идентификацией группы аллелей HLA в амплифицированном образце. Программное обеспечение системы Luminex выполняет детекцию и интерпретацию результатов. Заключение о результате представляется в виде отчета на электронном и бумажном носителе.

Процесс исследования состоял из нескольких последовательных этапов:

1. Амплификация ДНК методом ПЦР
2. Гибридизация
3. Анализ образца с использованием мультиплексного проточного анализатора Luminex.

HLA-генотипирование методом PCR-SSP с применением аллель-специфических праймеров. Образцы, при исследовании которых были получены двойные интерпретации при использовании метода SSO, были типированы методом PCR-SSP (Sequence Specific Primer, аллель-специфические праймеры). На первом этапе исследования выполнялась амплификация образцов ДНК. Следующим этапом исследования являлся электрофорез в 2% агарозном геле. Фотографирование и архивирование изображения осуществляли с помощью программного обеспечения «UPV»

гельдокументирующей системы «ДиДжиДок» (США). Проводилась интерпретация результатов с помощью компьютерной программы Helmsberg-SCORE™ или с использованием таблиц, прилагаемых к каждому набору реагентов Olerup SSP® HLA Typing Kits.

Всего было выполнено 9685 исследований.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения Microsoft Excel, Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health («Open Epi»), версия 3.01 от 2013/04/06.

Статистическая обработка результатов и оценка взаимосвязи между наличием групп аллелей HLA и развитием заболевания, а также оценка достоверности полученных данных выполнялись с использованием следующих показателей и критериев: частоты групп аллелей HLA в долях (f), критерия z с поправкой Йейтса на непрерывность, критерия χ^2 с поправкой Йейтса, точного двустороннего критерия Фишера, уровня достоверности p. Если различия долей групп аллелей HLA в опытной и контрольной группе оказывались статистически значимыми, вычислялся показатель «отношение шансов» (ОШ) с 95% «доверительным интервалом». При значении ОШ более 1 группа аллелей HLA положительно ассоциирована с развитием заболевания, если значение показателя колеблется в пределах от 0 до 1, группа аллелей HLA отрицательно ассоциирована с развитием заболевания.

Результаты и их обсуждение

Распределение групп аллелей HLA I и II классов в контрольных группах

На начальном этапе исследования было изучено распределение генов HLA I и II классов в контрольных группах. В связи с тем, что распределение групп аллелей HLA I и II класса статистически достоверно не различается у представителей разного пола и в разных возрастных группах, стало возможным объединить эти подгруппы в одну контрольную группу взрослых здоровых доноров Московского региона. Далее было проведено сравнение полученных данных с соответствующими показателями в группе здоровых новорожденных доноров пуповинной крови Московского региона (вторая контрольная группа). Статистически значимых отличий обнаружено не было, что позволяет использовать образцы пуповинной крови для формирования контрольной группы при проведении генетических исследований HLA-системы взрослых пациентов. В этой связи при проведении настоящего исследования в качестве контрольной группы была использована группа здоровых доноров пуповинной крови новорожденных.

У больных ЯК, БК и в контрольной группе были выявлены следующие группы аллелей HLA I класса (A*, B*, C*) и II класса (DRB1* и DQB1*): A*01, A*02, A*03, A*11, A*23, A*24, A*25, A*26, A*29, A*30, A*31, A*32, A*33, A*66, A*68, B*07, B*08, B*13, B*14, B*15, B*18, B*27, B*35, B*37, B*38, B*39, B*40, B*41, B*44, B*46, B*47, B*48, B*49, B*50, B*51, B*52, B*53, B*54, B*55, B*56, B*57, B*58, B*73, B*78, C*01, C*02, C*03, C*04, C*05, C*06, C*07, C*08, C*12, C*14, C*15, C*16, C*17, C*18, DRB1*01, DRB1*03, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*08, DRB1*09, DRB1*10, DRB1*11, DRB1*12, DRB1*13, DRB1*14, DRB1*15, DRB1*16, DQB1*02, DQB1*03, DQB1*04, DQB1*05, DQB1*06.

Особенности полиморфизма генов системы HLA при язвенном колите

Для более полной оценки генетических особенностей HLA-антигенов при ЯК исследование проводилось как в общей группе больных ЯК, так и в подгруппах,

сформированных в зависимости от протяженности поражения кишечника, тяжести, характера течения заболевания, ответа на гормональную терапию, пола пациентов и возраста установления диагноза.

В общей группе пациентов с ЯК было обнаружено, что частоты групп аллелей HLA A*26, В*38, В*58 и С*12 достоверно выше соответствующих показателей в контрольной группе (рис.1 и табл.1). В то же время при ЯК отмечалось достоверное снижение встречаемости групп аллелей В*15, С*04, DRB1*07 и DQB1*02.

Группы аллелей А*26, В*38, В*58 и С*12 можно отнести к маркерам предрасположенности к развитию ЯК. Шанс заболеть ЯК среди носителей данных групп аллелей составляет от 1,84 до 4,03. Группы аллелей В*15, С*04, DRB1*07, DQB1*02 ассоциированы с протективными свойствами по отношению к развитию ЯК. Минимальный риск развития заболевания наблюдается у носителей группы В*15 и составляет 0,13.

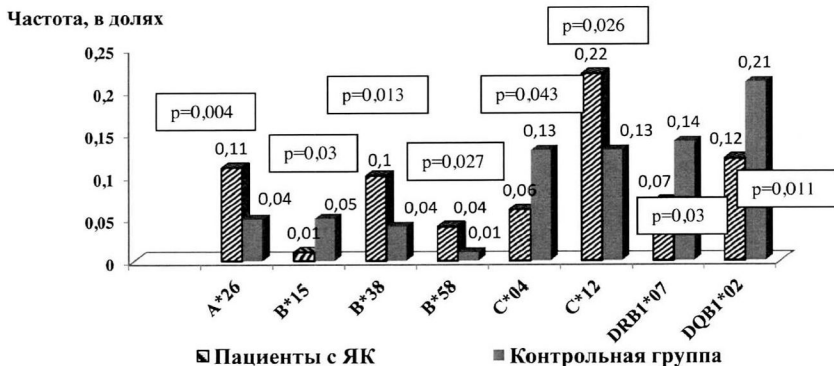


Рисунок 1. Частота групп аллелей HLA в группе больных ЯК и в контрольной группе

Таблица 1

HLA – маркеры предрасположенности и протекции к развитию ЯК в общей группе пациентов с ЯК (n=65)

Группа аллелей	p	ОШ	ДИ
A*26	0,004	2,583	1,397-4,775
B*15	0,031	0,132	0,018-0,954
B*38	0,013	2,391	1,248-4,58
B*58	0,027	4,033	1,521-10,69
C*04	0,043	0,444	0,21-0,94
C*12	0,026	1,847	1,106-3,083
DRB1*07	0,032	0,461	0,233-0,91
DQB1*02	0,011	0,459	0,26-0,82

При сравнении группы пациентов с тотальным поражением толстой кишки и контрольной группы у больных выявлена достоверно более высокая частота групп аллелей А*26 (ОШ=2,6, ДИ 1,166-5,778) и В*38 (ОШ=3,39, ДИ 1,571-7,335) (рис. 2).



Рисунок 2. Частота групп аллелей HLA в группах пациентов с тотальным поражением толстого кишечника, левосторонним поражением толстого кишечника при ЯК и в контрольной группе

Левосторонний ЯК ассоциирован с повышением частоты группы аллелей B*56 (ОШ=5,71, ДИ 1,639-19,91). A*26 и B*38 являются маркерами предрасположенности к тотальному поражению кишечника при ЯК (ОШ равно 2,6 и 3,4, соответственно). Группа пациентов с проктитом (n=3) не оценивалась ввиду ее малочисленности.

Проведенное исследование показало, что достоверные отличия в характере распределения групп аллелей HLA между пациентами с хроническим рецидивирующим течением и контрольной группой отсутствуют. Группа пациентов с острым течением ЯК не оценивалась в связи с ее малочисленностью (n = 6). Значимые отклонения изучаемых показателей от контроля наблюдались лишь в подгруппе больных с хроническим непрерывным течением ЯК (рис. 3).

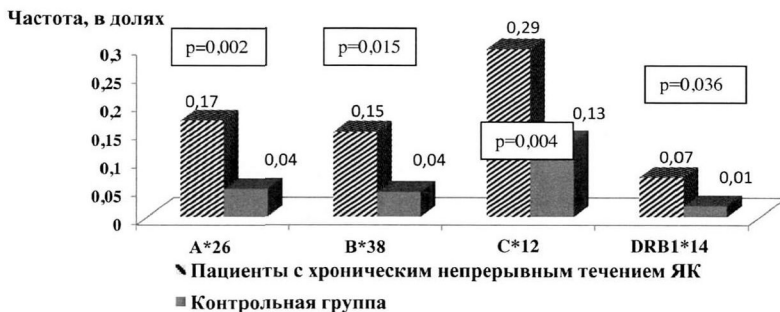


Рисунок 3. Частота групп аллелей HLA в группе пациентов с хроническим непрерывным течением ЯК и в контрольной группе

Группы аллелей A*26, B*38, C*12 и DRB1*14 у пациентов с хроническим непрерывным течением заболевания встречались достоверно чаще и являлись маркерами предрасположенности к данной форме заболевания с ОШ более 3, причем наличие в генотипе A*26 повышает данную величину до 4,7 (табл.2).

Подгруппы пациентов с тяжелым (n=5) и легким (n=3) течением заболевания в связи с их малочисленностью не анализировались. Частота A*26 в группе пациентов со среднетяжелым течением оказалась достоверно выше, чем в контрольной группе, в то время как группы аллелей DRB1*07 и DQB1*02 у больных встречались значимо реже (рис.4).

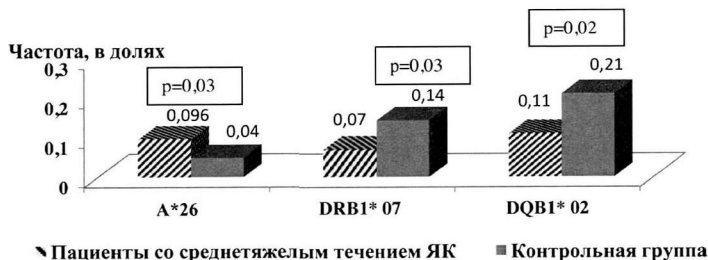


Рисунок 4. Частота групп аллелей HLA в группе пациентов со среднетяжелым течением ЯК и в контрольной группе

При сравнении показателей в подгруппах больных с различным ответом на гормональную терапию с контрольными значениями выявлено возрастание шансов возникновения ЯК с гормональной рефрактерностью при наличии в генотипе A*26 до 6,5, C*17 – до 4,6, B*38 – до 4,9, и уменьшение шансов при наличии DRB1*07 до 0,1 (рис. 5 и табл. 2). Группы аллелей B*52 и B*58, как показал статистический анализ результатов исследования, ассоциированы с восприимчивостью к гормональной терапии ЯК, в то время как DQB1*02 в этой подгруппе пациентов встречается достоверно реже.

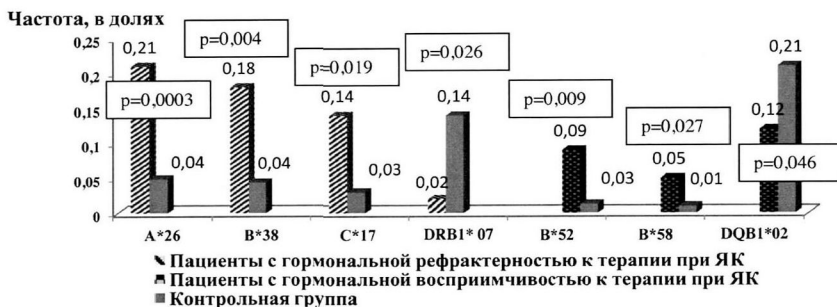


Рисунок 5. Частота групп аллелей HLA в группе больных ЯК с гормональной рефрактерностью, гормональной восприимчивостью и в контрольной группе

У женщин с ЯК группы аллелей A*26, B*38 и C*12 встречались достоверно чаще, чем в контрольной группе. Безусловный интерес представляет тот факт, что у мужчин с данным заболеванием группа аллелей B*15 отсутствовала (рис. 6).

Частота, в долях

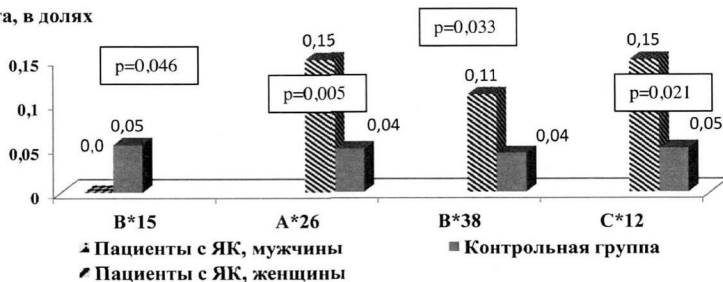


Рисунок 6. Частота групп аллелей HLA у пациентов разного пола и в контрольной группе

Исходя из полученных данных можно полагать, что V*15 является маркером протекции к возникновению ЯК у мужчин (ОШ=0, ДИ – 0), а у женщин наличие в генотипе A*26, V*38 и C*12 повышает вероятность развития ЯК в 2,4 – 3,8 раз (табл. 2).

При сравнении встречаемости HLA-антигенов среди пациентов с ЯК младше 35 лет с соответствующими показателями контрольной группы были выявлены высокая частота группы аллелей V*52 и низкая – DQB1*02 (рис. 7). Эти маркеры можно считать, соответственно, положительно и отрицательно ассоциированными с возникновением ЯК в возрасте младше 35 лет.

Частота, в долях

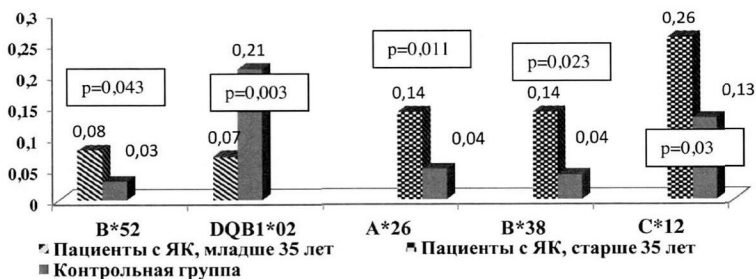


Рисунок 7. Частота групп аллелей HLA в группах пациентов с диагностикой ЯК в возрасте старше 35 лет, младше 35 лет и в контрольной группе

Диагностика ЯК после 35-летнего возраста коррелирует со значимым повышением частоты групп аллелей HLA A*26, V*38 и C*12, причем наличие C*12 увеличивает риск заболеть ЯК в 2,4 раза, V*38 – в 3,3, A*26 – в 3,5 раз по сравнению с контрольной группой.

Обобщенные данные по HLA-маркерам предрасположенности и протекции к ЯК в исследованных группах приведены в таблице 2.

HLA – маркеры предрасположенности и протекции к ЯК в исследованных группах

Группа аллелей HLA	ОШ										
	Общая группа с ЯК n= 65	Тотальный колит n= 37	Левосторонний колит n= 25	Непрерывное течение ЯК n= 27	Среднетяжелое течение ЯК n= 57	Рефрактерные к гормональной терапии при ЯК n= 22	Восприимчивые к гормональной терапии при ЯК n= 43	Мужчины n= 34	Женщины n= 31	Младше 35 лет n= 36	Старше 35 лет n= 29
A*26	2,58	2,59	-	4,70	2,25	6,51	-	-	3,85	-	3,58
B*15	0,13	-	-	-	-	-	-	0,0	-	-	-
B*38	2,39	3,39	-	3,69	-	4,93	-	-	3,08	-	3,36
B*52	-	-	-	-	-	-	3,57	-	-	3,13	-
B*56	-	-	5,71	-	-	-	-	-	-	-	-
B*58	4,03	-	-	-	-	-	4,96	-	-	-	-
C*04	0,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C*12	1,85	-	-	3,18	-	-	-	-	2,43	-	2,40
C*17	-	-	-	-	-	4,63	-	-	-	-	-
DRB1*07	0,46	-	-	-	0,41	0,12	-	-	-	-	-
DRB1*14	-	-	-	4,56	-	-	-	-	-	-	-
DQB1*02	0,46	-	-	-	0,45	-	0,46	-	-	0,25	-

Общими иммуногенетическими маркерами предрасположенности к развитию ЯК у женщин старше 35 лет, а также к хроническому непрерывному течению ЯК являются группы аллелей A*26, B*38, C*12. Маркерами предрасположенности к развитию ЯК является также B*58, а у населения в возрасте младше 35 лет – B*52. Иммуногенетическими маркерами предрасположенности к тотальному поражению кишечника и к гормональной рефрактерности при ЯК выступают A*26 и B*38. Характерным маркером предрасположенности к хроническому непрерывному течению ЯК является DRB1*14, к гормональной рефрактерности при ЯК – C*17. С поражением при ЯК левых отделов ободочной кишки ассоциирована B*56, со среднетяжелым течением – A*26, с восприимчивостью к гормональной терапии – B*52 и B*58. Маркерами протекции к ЯК являются B*15, C*04, DRB1*07, DQB1*02; у мужчин – B*15; у населения в возрасте младше 35 лет – DQB1*02; к среднетяжелому течению заболевания – DRB1*07 и DQB1*02; к гормональной рефрактерности – DRB1*07 и к ЯК с восприимчивостью к гормональной терапии – DQB1*02.

Особенности полиморфизма генов системы HLA при болезни Крона

Проведенные исследования показали, что группа аллелей C*12 встречается достоверно чаще у пациентов с БК, чем в контрольной группе (рис.8), увеличивая вероятность развития заболевания в 2,2 раза (ДИ 1,301-3,946).



Рисунок 8. Частота групп аллелей HLA в группе пациентов с БК и в контрольной группе

При сравнении встречаемости групп аллелей HLA у пациентов с илеоколитом при БК и в контрольной группе статистически значимых отличий выявлено не было. Группы пациентов с колитом (n=16) и терминальным илеитом (n=12) не оценивались по причине их малочисленности.

Достоверных отличий от контроля в подгруппе больных с хроническим непрерывным течением БК не обнаружено. Группу пациентов с острым течением БК не оценивали в связи с ее малочисленностью (n=2). У пациентов с хроническим рецидивирующим течением заболевания значимо чаще, чем в контроле встречается группа C*12 (ОШ=2,96, ДИ 1,43-6,098), в то время как DQB1*02 – достоверно реже (ОШ=0,38, ДИ 0,16-0,94) (рис. 9).

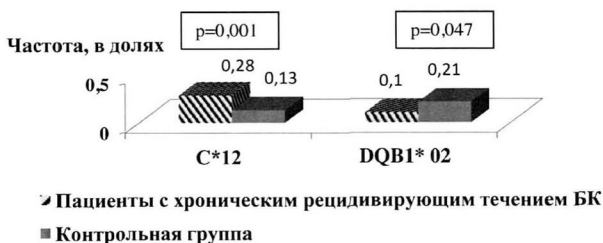


Рисунок 9. Частота групп аллелей HLA в группе пациентов с хроническим рецидивирующим течением БК и в контрольной группе

Подгруппа пациентов с легким течением БК не оценивалась в связи с ее малочисленностью (n = 3). Для тяжелого течения БК характерна достоверно более низкая частота DQB1*03 (ОШ=0,35, ДИ 0,14-0,86). Отмечена низкая встречаемость A*03, однако доверительный интервал отношения шансов проходит через 1 (0,019-1,06), что не позволяет использовать нам данный показатель (рис.10). У пациентов со среднетяжелым течением БК значимо чаще встречалась группа аллелей C*12 (ОШ=2,56, ДИ 1,21-5,43), следовательно, наличие в генотипе указанной группы аллелей может служить маркером предрасположенности к соответствующей форме течения заболевания.



Рисунок 10. Частоты групп аллелей HLA в группах пациентов со среднетяжелым, тяжелым течением БК и в контрольной группе

При изучении генетических особенностей HLA-антигенов у пациентов с БК в зависимости от фенотипического варианта заболевания выявлено, что у больных со

стриктурирующим типом БК достоверно чаще встречаются группы аллелей А*11, В*38 и С*12, увеличивая шансы возникновения данного типа заболевания в 2,5 (при С*12), 3,0 и 3,5 раза (при А*11 и В*38, соответственно) (рис. 11 и табл.3). При нестриктурирующем, непенетрирующем типе БК частота групп аллелей В*56, С*12 и С*14 статистически значимо выше, в частности, при наличии в генотипе В*56 и С*14 риск возникновения именно данного фенотипического варианта заболевания составляет 5,9 и 5,8, соответственно. Подгруппа пациентов с пенетрирующим типом БК не оценивалась в виду ее малочисленности (n = 5).

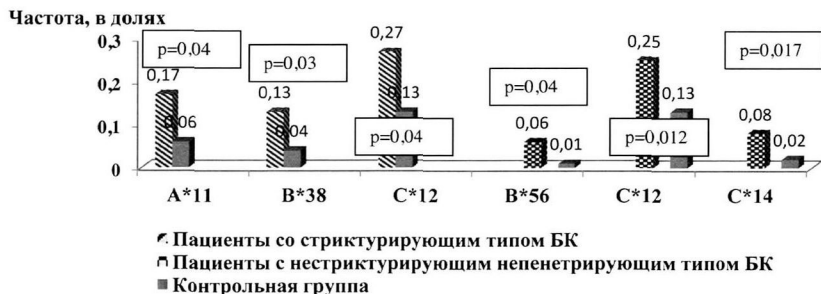


Рисунок 11. Частота групп аллелей HLA в группе пациентов в зависимости от фенотипического варианта БК и в контрольной группе

При сравнении показателей в группе пациентов с рефрактерностью к гормональной терапии при БК и контрольной группе статистически значимых отличий не выявлено.

В группе пациентов с гормональной восприимчивостью достоверно чаще встречается группа аллелей С*12 (ОШ=2,95, ДИ 1,464-5,963), которая, соответственно, ассоциирована с предрасположенностью к данной форме заболевания (рис. 12).

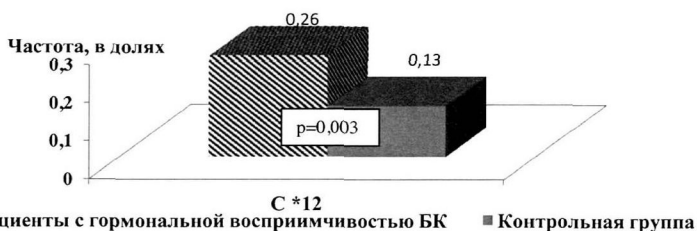


Рисунок 12. Частота групп аллелей HLA в группе пациентов с восприимчивостью к гормональной терапии при БК и в контрольной группе

Сравнительная оценка встречаемости групп аллелей HLA у больных БК мужчин и женщин и в контрольной группе показала, что группа аллелей С*14 ассоциирована с развитием БК у мужчин (ОШ=4,18, ДИ 1,42-12,35), а С*12 - у женщин (ОШ=2,69, ДИ 1,13-6,37) (рис. 13).

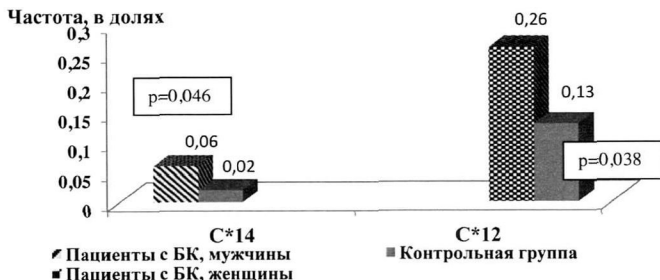


Рисунок 13. Частота групп аллелей HLA у мужчин с БК, у женщин с БК и в контрольной группе

При изучении характера распределения групп аллелей HLA в подгруппе пациентов с возрастом установления диагноза младше 35 лет статистически значимых отличий от контроля обнаружено не было. Группа пациентов с возрастом установления диагноза старше 35 лет не изучалась по причине ее малочисленности.

Обобщенные данные по HLA-маркерам предрасположенности и протекции к БК в исследованных группах приведены в таблице 3.

Таблица 3

HLA-маркеры предрасположенности и протекции к БК в исследованных группах

Группа аллелей HLA	ОШ								
	Общая группа с БК n= 53	Рецидивирующее течение БК n= 30	Тяжелое течение БК n= 22	Средне-тяжелое течение БК n= 28	Стриктурирующий тип БК n= 24	Нестриктурирующий, непенетрирующий тип БК n= 24	Восприимчивые к гормональной терапии при БК n= 32	Мужчины n= 32	Женщины n= 21
A*11	-	-	-	-	3,05	-	-	-	-
B*38	-	-	-	-	3,52	-	-	-	-
B*56	-	-	-	-	-	5,99	-	-	-
C*12	2,26	2,96	-	2,56	2,5	2,96	2,95	-	2,69
C*14	-	-	-	-	-	5,85	-	4,18	-
DQB1*02	-	0,38	-	-	-	-	-	-	-
DQB1*03	-	-	0,35	-	-	-	-	-	-

Как видно из представленных данных, общим иммуногенетическим маркером предрасположенности к развитию БК у женщин Московского региона является C*12. Эта же группа аллелей ассоциирована с БК со среднетяжелым и хроническим рецидивирующим течением, стриктурирующим, нестриктурирующим, непенетрирующим типами заболевания, восприимчивостью к гормональной терапии. Характерными маркерами предрасположенности к развитию БК стриктурирующего типа являются B*38 и A*11, нестриктурирующего, непенетрирующего типа - B*56. C*14 выступает одновременно маркером предрасположенности к неструктурирующему, непенетрирующему типу заболевания, и к БК у мужчин Московского региона. Характерными маркерами протекции к развитию хронического рецидивирующего течения и тяжелого течения БК являются DQB1*02 и DQB1*03, соответственно.

Особенности полиморфизма генов системы HLA при воспалительных заболеваниях кишечника

Как известно, язвенный колит и болезнь Крона относятся к воспалительным заболеваниям кишечника (ВЗК), сопровождающимся комплексным расстройством организма, в связи с чем для выявления иммуногенетических маркеров ВЗК нами было изучено распределение групп аллелей HLA в общей группе пациентов.

К ВЗК в целом выявлены маркеры предрасположенности и протекции, наблюдаемые при каждом заболевании в отдельности, однако исчезла достоверная значимость для группы аллелей В*58, которая наблюдалась при ЯК. В противоположность этому появились новые ассоциации, достигшие в общей группе статистической достоверности. В*52 и В*56 являются маркерами предрасположенности, а С*03 – маркером протекции к данной группе заболеваний (рис. 14 и в табл. 4).

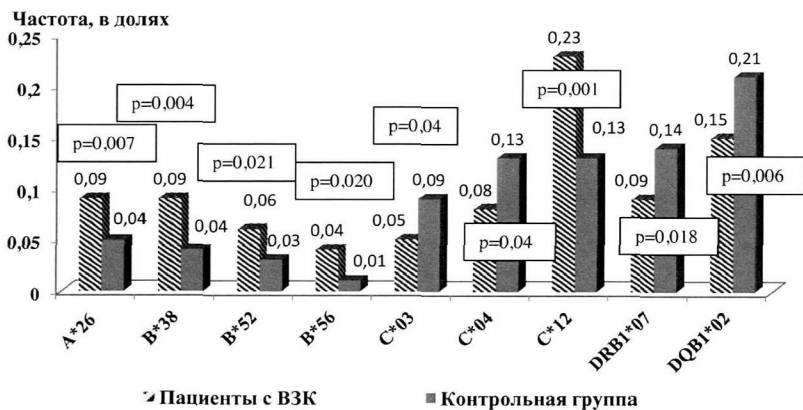


Рисунок 14. Частота групп аллелей HLA при ВЗК и в контрольной группе

При изучении генетических особенностей HLA-антигенов при ВЗК в зависимости от характера течения заболевания данные пациентов с острым течением ВЗК не использовались ввиду малочисленности данной подгруппы (n=8). При сравнении частоты групп аллелей HLA в подгруппе пациентов с хроническим непрерывным течением с соответствующими показателями в контрольной группе было выявлено, что у больных достоверно выше встречаемость А*26, В*38 и С*12. (рис. 15 и табл. 4). При хроническом рецидивирующем течении ВЗК выявлены только маркеры протекции к данной форме заболевания – группы аллелей С*04 и DQB1*02.

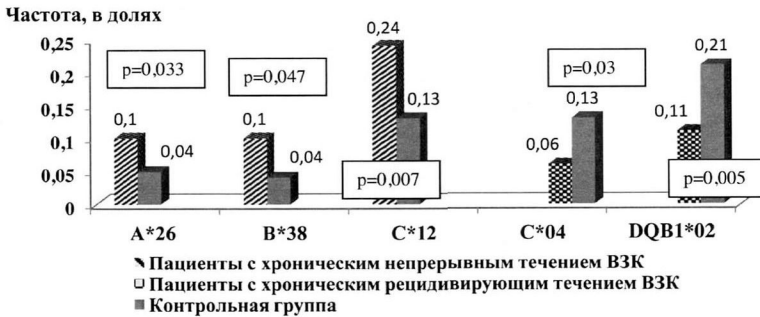
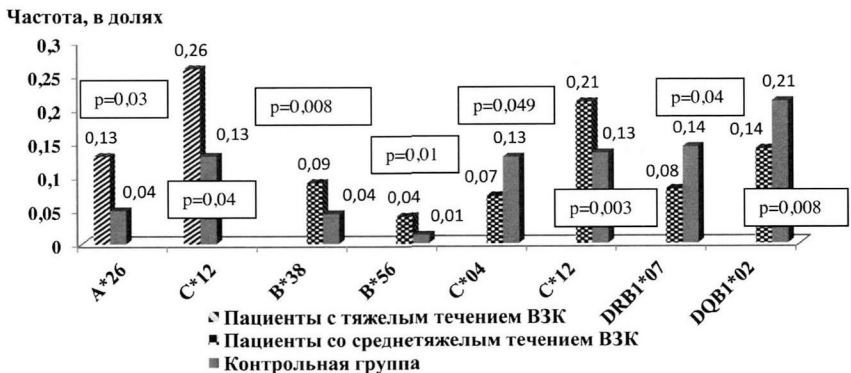


Рисунок 15. Частота групп аллелей HLA с хроническим непрерывным течением, с хроническим рецидивирующим течением ВЗК и в контрольной группе

Среди пациентов с тяжелым течением ВЗК A*26 встречается достоверно чаще, чем в контрольной группе, следовательно, группа аллелей A*26 ассоциирована с предрасположенностью к ВЗК с тяжелым течением. Установлено, что B*38 и B*56 ассоциированы с предрасположенностью, а C*04, DRB1*07 и DQB1*02 – с протекцией к ВЗК со среднетяжелым течением. Частота группы аллелей C*12 статистически значимо повышена в обеих подгруппах пациентов, что обусловлено, по-видимому, тем, что предрасположенность к ВЗК в целом ассоциирована с наличием в генотипе C*12 (рис. 16, табл. 4).



При сравнении данных, полученных в подгруппе пациентов с рефрактерностью к гормональной терапии ВЗК с контролем выявлено, что у больных группы аллелей A*26, B*38 и C*07 встречается достоверно чаще, в то время как группы аллелей C*06 и DRB1*07 – реже (рис.17).

Группы аллелей B*52, B*56, C*12 и DQB1*04 могут быть отнесены к маркерам предрасположенности к гормональной восприимчивости, а DQB1*02 – к маркерам протекции.

Частота, в долях

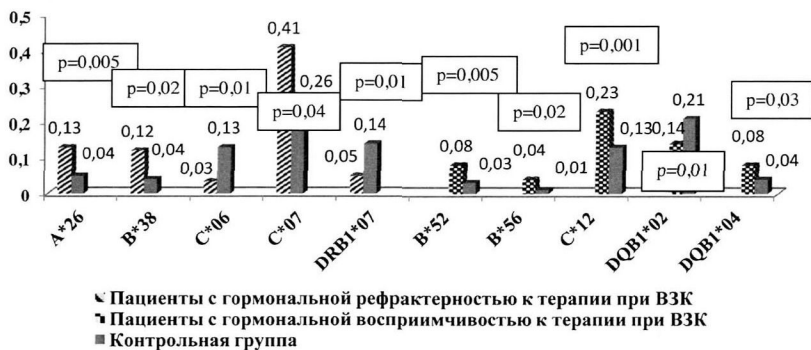


Рисунок 17. Частота групп аллелей HLA в подгруппах пациентов с гормональной рефрактерностью, с гормональной восприимчивостью и в контрольной группе

Исследование генетических особенностей HLA-антигенов при ВЗК в зависимости от пола пациентов показало, что у мужчин маркерами предрасположенности к ВЗК служат В*52, протекции – DRB1*07 и DQB1*02, в то время как у женщин обнаружены только маркеры предрасположенности, которыми являются А*26, В*38 и С*12 (рис. 18 и в табл. 4).

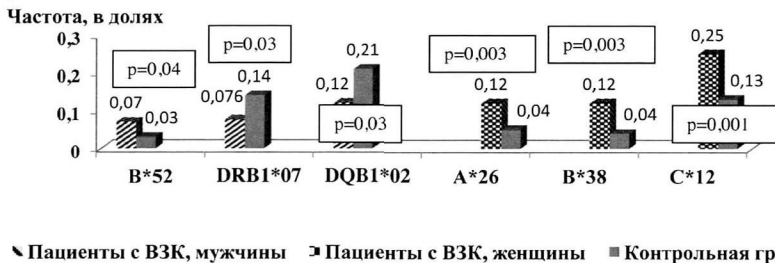


Рисунок 18. Частота групп аллелей HLA при ВЗК у мужчин, женщин и в контрольной группе

При сравнении встречаемости групп аллелей HLA в подгруппе пациентов с диагностикой ВЗК до 35 лет и в контрольной группе установлено, что у больных значимо чаще встречается В*52, и достоверно реже – DQB1*02 (рис. 19).

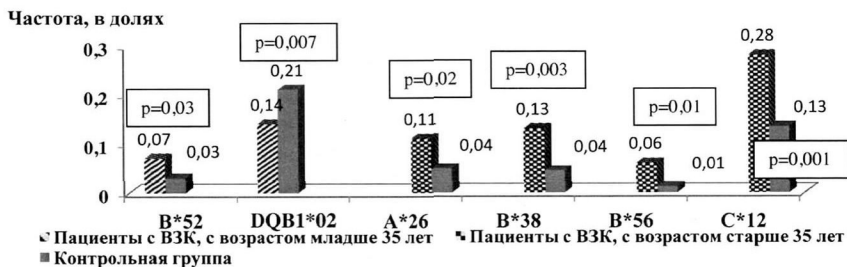


Рисунок 19. Частота групп аллелей HLA при ВЗК с возрастом установления диагноза младше 35 лет, старше 35 лет и в контрольной группе

В подгруппе пациентов с выявлением ВЗК в возрасте старше 35 лет обнаружено, что А*26, В*38, В*56 и С*12 встречаются достоверно чаще и, следовательно, являются маркерами предрасположенности к более позднему развитию заболевания.

Обобщенные данные по HLA-маркерам предрасположенности и протекции к ВЗК в исследованных группах приведены в таблице 4.

В рамках настоящего исследования установлен ряд иммуногенетических маркеров предрасположенности к развитию ВЗК. К их числу относятся группы аллелей А*26, В*38, С*12, которые чаще обнаруживаются у женщин с ВЗК с более поздним развитием заболевания, а также при хроническом непрерывном течении ВЗК; В*52 и В*56, которые также маркируют восприимчивость к гормональной терапии; В*52, встречающийся чаще у мужчин с ранним установлением диагноза; В*56, выступающий одновременно маркером среднетяжелого течения болезни и развития заболевания в старшем возрасте. Маркерами предрасположенности к тяжелому течению ВЗК являются А*26 и С*12; к среднетяжелому течению – В*38 и С*12; к гормональной рефрактерности – А*26, В*38 и С*07, являющийся характерным маркером рефрактерности к гормональной терапии при ВЗК; к гормональной восприимчивости – С*12 и характерный маркер данной формы ВЗК - DQB1*04. Маркерами протекции к развитию ВЗК выступают С*03, С*04, DRB1*07, DQB1*02, причем С*03 является характерным маркером протекции к ВЗК; к хроническому рецидивирующему течению заболевания – С*04 и DQB1*02; к среднетяжелому течению – С*04, DQB1*02 и DRB1*07; к гормональной рефрактерности – DRB1*07 и С*06, являющийся характерным маркером протекции к данной форме заболевания; к гормональной восприимчивости – DQB1*02. Маркеры протекции к ВЗК для мужчин – DQB1*02 и DRB1*07; для населения в возрасте младше 35 лет – DQB1*02.

Таблица 4

HLA-маркеры предрасположенности и протекции к ВЗК в исследованных группах

Группа аллелей HLA	ОШ										
	Общая группа с ВЗК n= 118	Непрерывное течение ВЗК n= 48	Рецидивирующее течение ВЗК n= 62	Тяжелое течение ВЗК n= 27	Среднетяжелое течение ВЗК n= 85	Рефрактерные к гормональной терапии при ВЗК n= 43	Восприимчивые к гормональной терапии при ВЗК n= 75	Мужчины n= 66	Женщины n= 52	Младше 35 лет n= 72	Старше 35 лет n= 45
A*26	2,04	2,48		3,29		3,23			2,82		2,69
B*38	2,16	2,44			2,26	2,80			3,17		3,42
B*52	2,10						2,98	2,47		2,48	
B*56	3,05				3,76		3,64				5,24
C*03	0,50										
C*04	0,57		0,40		0,52						
C*06						0,23					
C*07						1,98					
C*12	2,03	2,30		2,36	1,97		2,32		2,53		2,83
DRB1*07	0,57				0,54	0,26		0,45			
DQB1*02	0,54		0,41		0,50		0,48	0,53		0,46	
DQB1*04							2,22				

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что определенные группы аллелей HLA тесно ассоциированы с патогенезом ЯК, БК и ВЗК у взрослого славянского населения Московского региона. Выявлены иммуногенетические факторы предрасположенности и протекции к возникновению заболевания в целом, а также зависящие от пола и возраста, клинической формы и эффективности лечения. Наличие некоторых групп аллелей HLA в генотипе может увеличивать риск заболевания у пациентов определенного возраста и пола, при этом не оказывая влияния на другое население Московского региона. Полученные результаты позволяют рассматривать патогенез ЯК, БК и ВЗК у населения Московского региона с позиции иммуногенетических механизмов, а различие показателей у пациентов разных этнических групп указывает на необходимость проведения исследований полиморфизма генов HLA-системы в различных популяциях. Представленные данные о HLA-маркерах предрасположенности и протекции к ЯК, БК и ВЗК могут представлять значительный научный и практический интерес при проведении медико-генетического консультирования, разработке дополнительных критериев диагностики ЯК и БК, прогнозировании течения заболеваний и возможного ответа на лечение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования позволяют подвести *следующие итоги*:

1. При исследовании различных подгрупп пациентов с ВЗК, ЯК и БК, разделенных по полу, возрасту возникновения заболеваний, характеру и тяжести течения заболеваний, распространенности поражения и ответу на проводимую терапию, и контрольной группы обнаружены различия в частоте групп аллелей HLA.
2. Группы аллелей HLA A*26, B*38 и C*12 являются общими маркерами предрасположенности к ЯК у женщин старше 35 лет. Среди указанных групп аллелей

обнаружены маркеры предрасположенности к хроническому непрерывному течению заболевания, к тотальному колиту и рефрактерности к гормональной терапии при ЯК (А*26 и В*38). В*58, являющийся маркером предрасположенности к ЯК, и В*52 отнесены к маркерам восприимчивости к гормональной терапии, В*56 – характерный маркер левостороннего колита, В*52 ассоциирован с развитием ЯК в возрасте до 35 лет. Также выявлены характерные маркеры предрасположенности к хроническому непрерывному течению заболевания (DRB1*14), и к рефрактерности к гормональной терапии при ЯК (С*17).

3. Маркерами протекции к развитию ЯК являются группы аллелей В*15, С*04, DRB1*07 и DQB1*02, причем В*15 выступает характерным маркером протекции к развитию ЯК у мужчин, DQB1*02 – у лиц младше 35 лет, DRB1*07 – к рефрактерности к гормональной терапии.
4. С развитием БК у женщин и с восприимчивостью к гормональной терапии при данном заболевании ассоциирована группа аллелей С*12. К характерным маркерам стриктурирующего типа БК относятся В*38 и А*11. Маркерами нестриктурирующего, непенетрирующего типа являются группы аллелей В*56 и С*14, причем С*14 также ассоциирована с риском развития БК у мужчин. Характерными маркерами протекции к развитию БК с хроническим рецидивирующим течением и тяжелым течением являются DQB1*02 и DQB1*03, соответственно.
5. Группы аллелей А*26, В*38 и С*12 определены как маркеры предрасположенности к ВЗК у женщин в возрасте старше 35 лет. Выявлены маркеры предрасположенности к хроническому непрерывному течению заболевания (А*26 и В*38), рефрактерности (А*26, В*38) и восприимчивости (В*52, В*56, С*12) к гормональной терапии. В*52 ассоциирован с развитием ВЗК у мужчин в возрасте до 35 лет. С развитием ВЗК у лиц старше 35 лет ассоциирована группа аллелей В*56. Характерными маркерами рефрактерности и восприимчивости к гормональной терапии при ВЗК являются С*07 и DQB1*04, соответственно.
6. Группа аллелей DRB1*07 отрицательно ассоциирована с развитием ВЗК у мужчин и с рефрактерностью к гормональной терапии при ВЗК, DQB1*02 – с развитием ВЗК у мужчин младше 35 лет. С*04 и DQB1*02 выступают маркерами протекции к ВЗК с хроническим рецидивирующим течением, С*03 является характерным маркером протекции к ВЗК, С*06 – характерным маркером протекции к развитию рефрактерности к гормональной терапии при ВЗК.

Практические рекомендации

1. При установлении иммуногенетических маркеров ЯК, БК и ВЗК необходимо учитывать популяционную принадлежность пациента.
2. Пациентов, у которых выявлены генетические HLA-маркеры предрасположенности к возникновению ВЗК, и, в частности, к ЯК и БК, рекомендуется относить к группе риска развития соответствующего заболевания при генетическом прогнозировании.
3. Генотип по генам HLA у больных ВЗК в общем, БК и ЯК в частности, рекомендуется учитывать при прогнозировании течения заболевания, возможного развития рефрактерности или восприимчивости к гормональной терапии с коррекцией тактики ведения пациентов.
4. Полученные данные распределения иммуногенетических HLA-маркеров у пациентов с ВЗК, ЯК и БК характерны для славянского населения Московского региона и могут быть рекомендованы для использования при проведении подобных исследований в медицинских учреждениях Российской Федерации.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ИЗДАНИЯХ:

1. Кобзева, И.В. Алгоритм работы Московского банка-регистра стволовых клеток / И.В. Кобзева, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева, Е.Э. Карпова, Я.А. Круглова, Н.К. Шахпазян, А.Е. Гомзяков, Л.Л. Лебедева, Т.В. Пухликова, А.А. Чумак, Д.С. Ставцев, Е.В. Боякова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2013. - Т.8. - №2. - С. 69-74.
2. Ставцев, Д.С. Значение иммуногенетических HLA маркеров в развитии язвенного колита / Д.С. Ставцев, Т.А. Астрелина, О.В. Князев, Т.В. Пухликова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2014. - № 6. - С. 22-26.
3. Ставцев, Д.С. Иммуногенетические маркеры при язвенном колите у взрослого населения московского региона / Д.С. Ставцев, О.А. Майорова, В.Ю. Зинкин, Л.Л. Лебедева, Т.В. Пухликова, А.А. Чумак, Т.А. Астрелина, М.М. Азова, О.В. Князев // Вестник РУДН, серия Медицина. - 2014. - № 3. - С.53-59.
4. Ставцев, Д.С. Иммуногенетические маркеры при болезни Крона у взрослого населения московского региона / Д.С. Ставцев, Т.А. Астрелина, М.М. Азова, Л.Л. Лебедева, Т.В. Пухликова, А.А. Чумак, О.В. Князев, И.И. Еремина, И.Р. Гильмутдинова, К.В. Котенко // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2014. - Т. 10. - № 4. - С. 743 - 749.
5. Ставцев, Д.С. Значение иммуногенетических факторов в развитии болезни Крона / Д.С. Ставцев, Т.А. Астрелина, О.В. Князев, Т.В. Пухликова // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2015. - Т. 25. - № 3. - С. 70 - 77.

РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ДРУГИХ ИЗДАНИЯХ:

1. Пухликова, Т.В. Генетический полиморфизм HLA системы в московской популяции здоровых детей / Т.В. Пухликова, Л.Л. Лебедева, Т.Н. Потапова, Д.С. Ставцев, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева // Сборник материалов XV Конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии», Москва, 14-17 февраля 2011г. - № 497. - С. 498.
2. Lebedeva, L.L. HLA-A, -B, -C haplotype frequencies in Russians of Moscow region / L.L. Lebedeva, T.V. Pukhlikova, A.A. Chumak, D.S. Stavcev, T.A. Astrelina, M.V. Yakovleva // Tissue Antigens. - 2013. - 81(№5). - P176. - P. 370.
3. Stavtsev, D.S. Association between HLA and development of inflammatory bowel diseases in adults in Moscow region / D.S. Stavtsev, L.L. Lebedeva, T.V. Pukhlikova, A.A. Chumak, T.A. Astrelina, M.V. Yakovleva // Tissue Antigens. - 2013. - 81(№5). - P202. - P. 381.
4. Лебедева, Л.Л. Распределение HLA-гаплотипов в славянской популяции Московского региона / Л.Л. Лебедева, Т.В. Пухликова, А.А. Чумак, Д.С. Ставцев, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева // Материалы VI научно-практической конференции «Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ». Тезисы докладов. - Москва. - 2013. - С. 22-23.
5. Ставцев, Д.С. Взаимосвязь антигенов HLA системы с развитием хронических воспалительных заболеваний кишечника у взрослых в Московском регионе / Д.С. Ставцев, Л.Л. Лебедева, Т.В. Пухликова, А.А. Чумак, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева, О.В. Князев // Материалы VI научно-практической конференции «Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ». Тезисы докладов. - Москва. - 2013. - С. 37-38.
6. Ставцев, Д.С. Особенности HLA антигенов при хронических воспалительных заболеваниях кишечника у взрослых в Московском регионе / Д.С. Ставцев, Т.А. Астрелина, О.В. Князев, Т.В. Пухликова, Л.Л. Лебедева, А.А. Чумак // Материалы XXXX научной сессии ЦНИИ Гастроэнтерологии МКНЦ ДЗМ «Дискуссионные вопросы в гастроэнтерологии», Москва, 5-6 марта. - 2014. - С. 141.
7. Ставцев, Д.С. Особенности генетического полиморфизма HLA-антигенов при болезни Крона у взрослого населения Московского региона / Д.С. Ставцев, Т.А. Астрелина, М.М. Азова, Л.Л. Лебедева, Т.В. Пухликова, А.А. Чумак, О.В. Князев // Материалы XV Юбилейного съезда Научного общества гастроэнтерологов России и 17-го Международного медицинского Славяно-Балтийского научного форума «Санкт-Петербург – Гастро-2015»,

Санкт – Петербург, 25–27 мая. - 2015. - 89. - Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2015. - № 1-2. – С. М28.

8. Ставцев, Д.С. Иммуногенетические маркеры ВЗК у взрослого населения московского региона / Д.С. Ставцев, Т.А. Астрелина, М.М. Азова, Л.Л. Лебедева, Т.В. Пухликова, А.А. Чумак, О.В. Князев // Материалы XV Юбилейного съезда Научного общества гастроэнтерологов России и 17-го Международного медицинского Славяно-Балтийского научного форума «Санкт-Петербург – Гастро-2015», Санкт – Петербург, 25–27 мая. - 2015. - 90. - Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2015. - № 1-2. – С. М28.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БК – болезнь Крона

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДИ – доверительный интервал

ОШ – отношение шансов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЯК – язвенный колит

HLA – человеческие лейкоцитарные антигены (Human leukocyte antigen)

МНС – главный комплекс гистосовместимости (Major histocompatibility complex)

SSO – Sequence Specific Oligonucleotides

SSP – Sequence Specific Primer

СТАВЦЕВ ДМИТРИЙ СЕРГЕЕВИЧ (Российская Федерация)

Иммуногенетические маркеры при язвенном колите и болезни Крона у
взрослого населения Московского региона

В работе представлены результаты изучения полиморфизма генов HLA (МНС, главного комплекса гистосовместимости) I и II классов у взрослых пациентов с язвенным колитом (ЯК), болезнью Крона (БК) и в общей группе больных воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) славян, проживающих в Московском регионе. Исследовано распределение генов HLA I и II классов в группах пациентов с ЯК, БК и ВЗК в зависимости от клинической формы, тяжести течения заболевания, ответа на гормональную терапию, возраста и пола больных. Выявлены HLA-маркеры предрасположенности и протекции к развитию заболеваний, а также к возникновению различных форм течения ЯК, БК и ВЗК. Определены маркеры чувствительности и устойчивости к терапии, позволяющие прогнозировать течение заболеваний.

STAVTSEV DMITRY SERGEEVICH (Russian Federation)

Immunogenetic Markers in Ulcerative Colitis and Crohn's disease in Adults of
Moscow Region

The research shows the results of the study of HLA class I and class II gene polymorphism (MHC, major histocompatibility complex) in adult patients with ulcerative colitis (UC), Crohn's disease (CD) and in the total group of patients of Slav population with inflammatory bowel disease (IBD) living in the Moscow region. Distribution of HLA class I and class II genes in groups of patients with UC, CD and IBD depending on a clinical form, severity of a disease, response to steroid therapy, age and sex of patients has been studied. HLA-markers of predisposition and protection to disease development, as well as to various forms of UC, CD and IBD have been revealed. Markers of sensitivity and resistance to therapy, which make it possible to predict the course of disease, have been identified.

Подписано в печать: 21.03.2016

Заказ № 4584 Тираж - 100 экз.

Печать цифровая

Типография «Сору King»

ИНН 773165048765

121609, Москва, Осенний бульвар, 21

(499) 726-65-61