

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ВАСКУЛОЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА VEGFA –634G/C (RS 2010963) НА ПРОГРЕССИРОВАНИЕ ЯЗВЕННОГО КОЛИТА

Третьякова Ю.И.¹, Булатова И.А.¹, Щёктова А.П.¹, Кривцов А.В.²

¹ ФГБОУ ВО Пермский Государственный медицинский университет имени ак. Е.А. Вагнера Минздрава РФ (614990, г. Пермь, Россия)

² ФБУН Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровья населения Роспотребнадзора (г. Пермь, Россия)

THE IMPACT OF POLYMORPHISM OF THE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENE VEGFA –634G/C (RS 2010963) ON THE PROGRESSION OF ULCERATIVE COLITIS

Tretyakova Y.I.¹, Bulatova I.A.¹, Shchekotova A.P.¹, Krivtsov A.V.²

¹ E. A. Vagner Perm State Medical University (614990, Perm, Russia)

² Federal Research Center of preventive health management health risk Rospotrebnadzor (Perm, Russia)

Для цитирования: Третьякова Ю. И., Булатова И. А., Щёктова А. П., Кривцов А. В. Влияние полиморфизма гена васкулоэндотелиального фактора роста VEGFA –634G/C (rs 2010963) на прогрессирование язвенного колита. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018;156(8): 78–82. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-156-8-78-82

For citation: Tretyakova Y.I., Bulatova I.A., Shchekotova A.P., Krivtsov A.V. The impact of polymorphism of the vascular endothelial growth factor gene VEGFA –634G/C (rs 2010963) on the progression of ulcerative colitis. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2018;156(8): 78–82.

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-156-8-78-82

Третьякова Юлия Игоревна

Tretyakova Yuliya I.

tretyakovay@gmail.com

Третьякова Юлия Игоревна — к.м.н., доцент кафедры поликлинической терапии

Булатова И.А. — д.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФДПО

Щёктова А.П. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики ФДПО

Кривцов А.В. — к.м.н., заведующий лабораторией иммуно-генетики

Tretyakova Yuliya Igorevna — Candidate of Medical Sciences, assistant professor of the department of internal medicine and outpatient therapy

Bulatova I.A. — Doctor of Medical Sciences, assistant professor of the Department of clinical laboratory diagnostics

Shchekotova A.P. — Doctor of Medical Science, professor, head of the department of clinical laboratory diagnostics

Krivtsov A.V. — Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Immunogenetics

Резюме

Цель. Оценить функциональную значимость полиморфизма –634G/C гена васкулоэндотелиального фактора роста VEGFA (rs 2010963) в прогрессировании язвенного колита (ЯК) у больных в Пермском крае.

Материалы и методы. Обследованы 70 больных ЯК в активную фазу заболевания и 50 здоровых доноров. Исследовали уровень VEGF в сыворотке крови и полиморфизм гена VEGFA в регионе –634G/C.

Результаты. У больных ЯК в активную стадию заболевания было отмечено значимое увеличение васкулоэндотелиального фактора роста VEGF, концентрация которого составила 239,40 (137,70–554,30) пг/мл, что было в 2,8 раза выше, чем в контрольной группе. Выявлена значимая взаимосвязь между уровнем VEGF в сыворотке крови и степенью тяжести атаки ЯК и индексом эндоскопической активности (ИЭА) ($r=0,39$ и $r=0,45$ соответственно).

При распределении генотипов и аллелей региона –634G/C гена VEGFA в позиции rs 2010963 значимых различий у пациентов с ЯК и здоровых лиц в Пермском крае выявлено не было. Однако, при оценке встречаемости аллельных вариаций гена VEGFA при разной эндоскопической активности (ЭА) ЯК установлены минорный аллель С и неблагоприятная гомозигота СС, ассоциированные с тяжелым прогрессирующим течением ЯК.

Выводы: риск развития неблагоприятного течения ЯК, склонного к рецидивам и прогрессированию, ассоциирован с носительством аллеля С и гомозиготы СС гена VEGFA –634G/C, что должно учитываться при прогнозировании характера течения заболевания и выборе стратегии лечения.

Ключевые слова: язвенный колит, васкулоэндотелиальный фактор роста, полиморфизм гена васкулоэндотелиального фактора роста

Summary

Objective. To assess the functional significance of the –634G/C polymorphism of the vascular endothelial growth factor gene VEGFA (rs 2010963) in the progression of ulcerative colitis (UC) in patients in the Perm Krai.

Materials and methods. 70 patients with UC in the active phase of the disease and 50 healthy donors were examined. The level of serum VEGF and the polymorphism of the VEGFA gene in the –634G/C region were studied.

Results. The significant increase of vascular endothelial growth factor VEGF, whose concentration was 239,40 (137,70–554,30) pg/ml was determined; it was 2.8 times higher than in the control group. A significant relationship between the level of VEGF in the serum and the severity of the attack of the UC and the index of endoscopic activity (IEA) ($r = 0.39$ and $r = 0.45$, respectively) was revealed.

The distribution of genotypes and alleles of the –634G/C region of the VEGFA gene at position rs 2010963 did not reveal significant differences in patients with UC and healthy individuals in the Perm Krai. However, in assessing the occurrence of allelic variations of the VEGFA gene with different endoscopic activity of the UC, a minor allele C and an unfavorable homozygote CC associated with severe progressive UC flow are established.

Conclusions. The risk of developing an unfavorable course of the UC, prone to relapse and progression, is associated with the carriage of allele C and homozygotes CC of the VEGFA –634 G/C gene, which should be taken into account in predicting the course of the disease and choosing a treatment strategy.

Key words: ulcerative colitis, vascular endothelial growth factor, polymorphism of the vascular endothelial growth factor gene

Введение

Актуальность проблемы язвенного колита (ЯК) обусловлена широкой распространенностью заболевания среди лиц молодого возраста, развитием серьезных осложнений, приводящих к ранней инвалидизации [1,2]. В основе патогенеза ЯК лежат генетическая предрасположенность, нарушение иммунологической реактивности, а также влияние экзогенных факторов и кишечной микрофлоры. При этом наименее изученной остаётся роль сосудистого эндотелия в патогенезе заболевания [3].

Большое внимание в настоящее время уделяется изучению ростовых факторов, одним из которых является фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), который относится к семейству белков стимулирующих рост и пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов (ангиогенез) [4,5].

При ЯК физиологический ангиогенез превращается в патологический неоангиогенез на ранних стадиях заболевания. Кишечная микроциркуляция играет решающую роль в ангиогенезе при ЯК [6]. Alkim et al. продемонстрировали наличие повышенной плотности микрососудов в ткани толстой кишки у пациентов с ЯК при иммуногистохимическом исследовании, что коррелировало с активностью заболевания и экспрессией VEGF [7].

VEGF может быть вовлечен в патогенетические механизмы ЯК, так как он является не только мощным ангиогенным фактором, но также действует как провоспалительный цитокин, увеличивая проницаемость эндотелия и индуцируя хемокины

и молекулы адгезии, которые связывают лейкоциты с эндотелиальными клетками. VEGF способствует выработке провоспалительных цитокинов TNF- и IL-6 [5,8]. Разрабатываются терапевтические стратегии с применением моноклональных антител к VEGF [6].

В последнее время активно изучаются взаимосвязи функционального полиморфизма гена VEGF с уровнем спонтанной продукции одноименного фактора. Продолжается поиск генов предрасположенности к ЯК [9]. Результаты исследований полиморфизма гена VEGFA при ЯК противоречивы. Для полиморфизма в позиции –634G/C (rs2010963) промоторного гена VEGFA у больных ЯК установлено влияние на экспрессию гена, а аллели –634C ассоциированы с высоким уровнем экспрессии VEGF [10]. В то же время Ferrante et al. обнаружили, что полиморфизм гена VEGFA не влияет на восприимчивость к ВЗК и на уровни VEGF в сыворотке [11].

В литературе практически отсутствуют данные, оценивающие вклад полиморфизма гена VEGF в прогрессирование иммунного воспаления в толстой кишке при ЯК, недостаточно сведений о взаимосвязи со степенью тяжести атаки ЯК и эндоскопическими изменениями, что определило цель нашего исследования.

Цель исследования – оценить функциональную значимость полиморфизма –634G/C гена васкулоэндотелиального фактора роста VEGFA (rs 2010963) в прогрессировании ЯК у больных в Пермском крае.

Материал и методы исследования

Обследовано 70 больных ЯК в фазе активного воспаления. Средний возраст составил $36,21 \pm 11,69$ лет, 34 мужчины и 36 женщин (48% и 52% соответственно). Продолжительность заболевания в среднем составила $7,24 \pm 6,56$ лет. Пациенты обследованы

на базе отделений гастроэнтерологии и хирургии ГБУЗ КМСЧ № 1, ГКБ № 2 (г. Пермь). Диагноз ЯК устанавливали на основании клинических рекомендаций по диагностике и лечению пациентов с ЯК [12]. Для определения степени тяжести атаки

(СТА) ЖК использовали критерии Truelove-Witts; оценивали степень эндоскопической активности (ЭА) и индексы клинической и эндоскопической активности (ИКА и ИЭА) по B. Rachmilewits (1989) [12].

Контрольная группа состояла из 50 практически здоровых лиц, которые были сопоставимы по возрасту и полу.

Концентрацию VEGF в сыворотке крови обследуемых лиц определяли методом ИФА. Для выявления однонуклеотидных полиморфизмов гена VEGF в регионе -634G/C у пациентов с ЖК и здоровых доноров методом ПЦР-РВ суммарную ДНК выделяли из образцов цельной венозной крови, предварительно стабилизированной ЭДТА, используя набор «ДНК-Сорб-В» (ООО «ИнтерЛаб-Сервис», г. Москва). Исследование полиморфизма -634G/C гена VEGF проводили на амплификаторе «CFX-96» («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) с использованием аллель-специфической ПЦР «SNP-Скрин» (ЗАО «Синтол», г. Москва) и детекцией продуктов в режиме реального времени.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы

Statistica 7.0 (StatSoft). Проверку распределения результатов проводили по критерию Колмогорова-Смирнова. Для описания полученных количественных признаков данные представляли в виде медианы (Me) и 25 и 75 перцентилей. Для оценки значимости различий независимых групп использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Количественная оценка линейной связи между двумя независимыми величинами определялась с использованием коэффициента ранговой корреляции по Спирмену (r). Для описания соотношения частот генотипов и аллелей исследуемых генов использовался метод χ^2 . Отношение шансов (OR) определяли как отношение вероятности того, что событие произойдет, к вероятности того, что событие не произойдет. Определение зависимости между изучаемыми качественными признаками проводилось по таблице сопряженности (кросстабуляции) [13]. Сила связи признаков измерялась коэффициентом сопряженности (информативности) Пирсона (K_i). Различия между выборками считались достоверными при значении для $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

У больных ЖК в активную стадию заболевания было отмечено значимое увеличение фактора роста VEGF, концентрация которого составила 239,40 (137,70–554,30) пг/мл и в 2,8 раза превышала уровень данного показателя в контрольной группе (85,0 (4,20–187,40); $p=0,0003$). У 88,5% (62 чел.) больных был повышен средний показатель данного фактора по сравнению с референсными значениями.

Стимуляция продукции VEGF, по-видимому, обусловлена повреждением эндотелия толстой кишки с развитием нарушений микроциркуляции в виде ишемии, ведущей к усилению процессов ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции, что в свою очередь приводит к прогрессированию воспаления в стенке толстой кишки у больных ЖК [6].

При корреляционном анализе была выявлена значимая умеренная прямая взаимосвязь между уровнем фактора VEGF в сыворотке крови и степенью тяжести атаки ЖК ($r=0,39$; $p=0,0003$), ИКА ($r=0,37$; $p=0,006$), ИЭА ($r=0,45$; $p=0,002$) и протяженностью эрозивно-язвенного процесса в толстой кишке ($r=0,4$; $p=0,04$). То есть фактор роста сосудистого эндотелия адекватно оценивает степень и распространенность воспаления в толстой кишке. Оценка уровня сывороточного уровня VEGF может быть использована для стратификации тяжести атаки ЖК, определения степеней ЭА и обсуждения вопросов коррекции терапии, что подтверждает данные некоторых исследователей [3,7].

При изучении распространенности генотипов и аллелей полиморфизма гена VEGFA -634G/C в позиции rs 2010963 мы не выявили статистически значимых различий между сравниваемыми группами пациентов с ЖК и здоровых лиц в Пермском

крае (рис. 1). Значимых различий в частоте встречаемости гомозиготы CC (15,71% и 12,35% соответственно; $\chi^2=1,02$; $p=0,6$; QR=1,32) и минорного аллеля C гена VEGFA -634G/C (36,43% и 37,04% соответственно; $\chi^2=0,01$; $p=0,913$; QR=0,97) в исследуемых группах не было найдено, что согласуется с данными других исследователей [11].

Для сравнительного анализа уровня фактора VEGF и для оценки функциональной значимости полиморфизма гена VEGFA в регионе -634G/C в прогрессировании ЖК больные были разделены на две подгруппы с учетом степени тяжести атаки и степени ЭА по данным PPC и КФС. В I подгруппу ($n=37$) были включены пациенты с ЖК с легкой и среднетяжелой атакой с редкими рецидивами заболевания и 1–2 степенью ЭА. Во II подгруппу ($n=33$) вошли больные с тяжелым непрерывным и часто рецидивирующим течением ЖК и 3–4 степенью ЭА.

Уровни VEGF у больных ЖК с 3–4 степенью ЭА достоверно превышали значения, полученные у лиц с ЭА 1–2 степени ($p=0,00009$) (табл. 1).

При оценке встречаемости аллельных вариаций гена VEGFA -634G/C (rs 2010963) при разной эндоскопической активности ЖК мажорный аллель G и аллельная пара GG значимо чаще обнаруживались в группе пациентов с легкой и среднетяжелой атакой и 1–2 степенью ЭА ($p=0,000$). Минорный аллель C, напротив, значимо чаще встречался в группе больных с 3–4 степенью ЭА и тяжелой атакой ЖК – в 59,01% ($\chi^2=25,76$; $p=0,000$; QR=0,15).

Неблагоприятная гомозигота CC значимо чаще была найдена в группе лиц с высокой ЭА, чем у пациентов с низкой степенью ЭА: 33,33% против 2,7% ($\chi^2=22,8$; $p=0,000$; QR=0,06) (см. табл. 2). Следовательно, наличие аллели C и гомозиготы

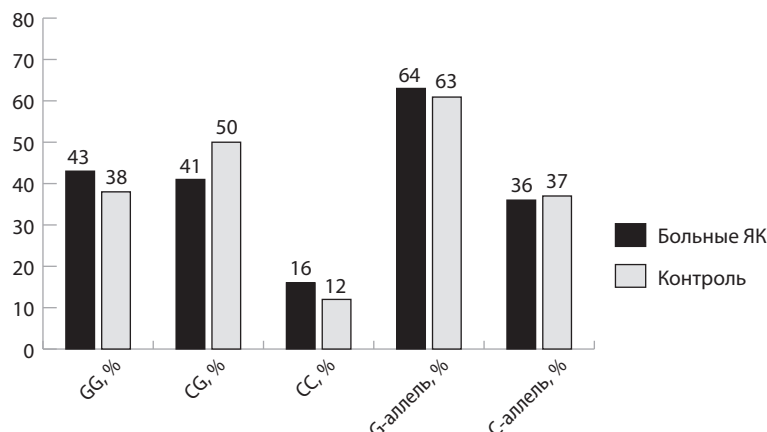


Рисунок 1.
Частота обнаружения аллельных вариантов гена VEGFA – 634G/C (rs 2010963) в анализируемых когортах здоровых и больных ЯК.

Примечание:
По оси ординат: количество больных, выраженное в процентах.
По оси абсцисс: генотипы и аллели гена VEGFA.

Фактор/генотип/аллели		ЯК, n=70		OR QR(95%CI)	p
		СТА (1–2) и ЭА I–II ст.; (n=37); %±m	СТА (3–4) и ЭА III–IV ст.; (n=33); %±m		
VEGF, пг/мл		183,70(92,30–239,40)	648,25(540,55–730,45)	-	0,00009
VEGFA (–634G/C)	GG,%	67,57±7,7	15,15±6,24	11,67(3,6–37,76)	0,000
	GC,%	29,73±7,51	51,52±8,7	0,40(0,15–1,06)	0,000
	CC,%	2,7±2,66	33,33±8,21	0,06(0,01–0,46)	0,000
Аллели	G-аллель,%	82,43±4,42	40,91±6,05	6,78(3,13–14,7)	0,000
	C-аллель,%	17,57±4,42	59,09±6,05	0,15(0,07–0,32)	0,000

Таблица 1
Уровень фактора VEGF и частота встречаемости аллельных вариантов гена VEGFA-634G/C у пациентов с ЯК в зависимости от степени тяжести атаки и степени ЭА
Примечание:
VEGF – васкулоэндотелиальный фактор роста, OR– отношение шансов, QR (95CI%) – значение и доверительный интервал для OR, p – значимость различий.

СС гена VEGFA –634G/C является предиктором тяжелого течения ЯК со склонностью к прогрессированию.

При определении зависимости между изучаемыми качественными признаками по таблице сопряженности (кросстабуляции) в группе больных ЯК была установлена выраженная ассоциация полиморфизма промоторного региона –634G/C гена VEGFA с увеличением выработки одноименного фактора VEGF ($K_i=0,79$; $p=0,000$), а также зависимость средней силы с ИКА и ИЭА ($K_i=0,46$; $p=0,019$; $K_i=0,43$; $p=0,032$ соответственно) и с количеством α_2 -глобулинов в крови, являющимися белками острой фазы ($K_i=0,42$; $p=0,036$).

Таким образом, установленная ассоциация полиморфизма промоторного региона –634G/C гена VEGFA с повышенной экспрессией VEGF в крови у больных ЯК может вносить вклад в активацию патологического неоваскулогенеза, ведущего к сосудистой перестройке и нарушению микроциркуляции в стенке толстой кишки в группе носителей; наши результаты подтверждают данные других исследователей [6, 7, 8]. Выявленная взаимосвязь полиморфизма данного гена с ИЭА, а также значимая частота патологического аллеля С и гомозиготы СС у больных с высокой степенью ЭА и тяжелыми обострениями, может свидетельствовать о вкладе полиморфизма гена VEGFA в предрасположенность к неблагоприятному течению ЯК.

Закключение

У больных ЯК в период активного воспаления выявлен высокий уровень VEGF в крови по сравнению с контрольной группой. При этом концентрация васкулоэндотелиального фактора роста была значимо выше у пациентов с тяжелым течением и частыми рецидивами болезни и высокой степенью ЭА, что может быть использовано для стратификации степени тяжести атаки ЯК и определения степеней ЭА.

При распределении генотипов и аллелей региона –634G/C гена VEGFA в позиции rs 2010963 статистически значимых различий между сравниваемыми группами пациентов с ЯК и здоровых лиц

в Пермском крае выявлено не было. Однако, при оценке встречаемости аллельных вариаций гена VEGFA при разной эндоскопической активности ЯК установлены минорный аллель С и неблагоприятная гомозигота СС, ассоциированные с тяжелым прогрессирующим течением ЯК.

Следовательно, риск развития неблагоприятного течения ЯК, склонного к частым рецидивам и прогрессированию, ассоциирован с носительством аллеля С и гомозиготы СС гена VEGFA –634G/C, что должно учитываться при прогнозировании характера течения заболевания и выборе стратегии лечения.

Литература | Reference

1. Shimshoni E., Yablecovitch D., Liran Baram, Dotan I., Sagi I. ECM remodelling in IBD: innocent bystander or partner in crime? The emerging role of extracellular molecular events in sustaining intestinal inflammation. *Gut*, 2015, vol. 64, no. 3, pp. 367–372. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308048
2. Akbari S., Hosseini M., Rezaei-Tavirani M., Rezaei-Tavirani M. et al. Common and differential genetically pathways between ulcerative colitis and colon adenocarcinoma. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2017, vol. 10, no. 1, pp. 93–101.
3. Стёпина Е.А., Хлынова О.В., Туев А.В. Диагностическая и прогностическая значимость маркеров эндотелиальной дисфункции у пациентов с язвенным колитом // Казанский медицинский журнал. – 2016. – Т. 97, № 2. С. 187–191.
Stepina E. A., Khlynova O. V., Tuv A. V. Diagnosticheskaya i prognosticheskaya znachimost' markerov endotelial'noy disfunktsii u patsientov s yazvennym kolitom [Diagnostic and prognostic significance of markers of endothelial dysfunction in patients with ulcerative colitis]. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal* – [Kazan Medical Journal], 2016, vol. 97, no. 2, pp. 187–191 (in Russian).
4. Kajdaniuk D., Marek B., Borgiel -Marek H., Kos-Kudla B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in physiology and pathophysiology. *Polish Journal of Endocrinology*, 2011, vol. 62, no. 5, pp. 444–455.
5. Zdravkovic N. D., Jovanovic I. P., Radosavljevic G. D., Arsenijevic A. N. et al. Potential Dual Immunomodulatory Role of VEGF in Ulcerative Colitis and Colorectal Carcinoma. *Int J Med Sci*, 2014, vol. 11, no 9, pp. 936–947. doi: 10.7150 / ijms.8277
6. Alkim C., Alkim H., Koksai A., Boga S. et al. Angiogenesis in Inflammatory Bowel Disease. *Int J Inflam*, 2015: 970890. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4709626/> (Accessed 29 December 2015). doi: 10.1155/2015/970890
7. Alkim C., Savas B., Ensari A. Expression of p53, VEGF, microvessel density, and cyclin-D1 in noncancerous tissue of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 2009, vol. 54, no. 9, pp. 1979–1984. doi: 10.1007/s10620-008-0554-x
8. Cromer W. E., Mathis J. M., Granger D. N., Chaitanya G. V. et al. Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 2011, vol. 17, no. 5, pp. 578–593. doi: 10.3748 / wjg.v17.i5.578
9. McGovern D.P., Gardet A., Törkvist L., Goyette P. et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet*, 2010, vol. 42, no. 4, pp. 332–7. doi: 10.1038/ng.549
10. Шевченко А.В., Коненков В.И. Функциональный полиморфизм генов семейства VEGF // Цитокины и воспаление. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 14–20.
Shevchenko A. V., Konenkov V. I. Funktsional'nyy polimorfizm genov semeystva VEGF [Functional polymorphism of genes of the VEGF family] *Tsitokiny i vospalenie* – [Cytokines and inflammation], 2012, vol. 11, no. 4, pp. 14–20 (in Russian).
11. Ferrante M., Pierik M., Henckaerts L. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2006, vol. 12, no. 9, pp. 870–878. doi: 10.1097/01.mib.0000235095.01608.10.
12. Ивашкин В.Т., Шелыгин Ю.А., Халиф И.Л. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению язвенного колита // Колопроктология. – 2017. – Т. 59, № 1. – С. 6–30.
Ivashkin V. T., Shelygin Yu. A., Khalif I. L. et al. Klinicheskie rekomendatsii Rossiyskoy gastroenterologicheskoy assotsiatsii i assotsiatsii koloproktologov Rossii po diagnostike i lecheniyu yazvennogo kolita [Clinical recommendations of the Russian gastroenterological association and association of coloproctologists of Russia on the diagnosis and treatment of ulcerative colitis]. *Koloproktologiya* – [Coloproctology], 2017, vol. 59, no. 1, pp. 6–30 (in Russian).
13. Шелудько В.С., Подлужная М.Я. Теоретические основы медицинской статистики. – Пермь, 2001. – 36 с.
Shelud'ko V.S., Podluzhnaya M. Ya. Teoreticheskie osnovy meditsinskoy statistiki [Theoretical bases of medical statistics]. Perm, 2001. 36 p. (in Russian).