

В ПОИСКАХ ОПТИМАЛЬНОЙ ПАНЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЙ ОДИНОЧНЫХ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ (SNP) ПРИ СИНДРОМЕ РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА

Семенова Е. В.¹, Иванов А. В.^{2*}

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт»;

²Университетская клиника Санкт-Петербургского Государственного Университета (ФГБУ «СПМЦ» Минздрава России)

TOWARD THE OPTIMAL SNP RESEARCH PANEL IN IRRITABLE BOWEL SYNDROME

Semenova E. V.¹, Ivanov A. V.^{2*}

¹SFBI "Petersburg Nuclear Physics Institute";

²University Hospital of Saint-Petersburg State University (SFBI "Petersburg Multiprofile Medical Center")

Иванов

Андрей Владимирович

Ivanov Andrei V.

anivanov@omrb.pnpi.spb.ru

Семенова Елена Вячеславовна, к.б.н., научный сотрудник Отдела молекулярной и радиационной биологии

Иванов Андрей Владимирович, к.б.н., заведующий отделом генетики

Резюме

Генетическая составляющая развития мультифакторных заболеваний, к которым относится синдром раздраженного кишечника (СРК), представлена, как правило, одиночными нуклеотидными полиморфизмами (SNP). Выявление ассоциаций полиморфизмов генов с различными патологиями, даже если они не являются этиологическими факторами, исключительно важно, поскольку может быть использовано в диагностических целях и при разработке лекарственной терапии.

Всего было обследовано 94 пациента с различными СРК. Контрольную группу из 31 человека составили жители Санкт-Петербурга без СРК и воспалительных заболеваний кишечника в анамнезе.

Все пациенты заполнили информированное согласие на предоставление биологических образцов для анонимных научных исследований.

Определение аллелей SNP проводилось с использованием метода минисеквенирования с последующим масс-спектрометрическим анализом продукта

Анализ отдельных полиморфизмов не обнаружил их однозначной связи с предрасположенностью к СРК. Вероятно, несколько генетических факторов риска совместно с воздействием окружающей среды вызывают синергический эффект, приводящий к возникновению СРК определенного фенотипа. В данной работе представлена панель исследований из пяти SNP, являющихся наследственными факторами нарушения процессов врожденного иммунитета: CD14–159 C>T (rs2569190); TNF-α –308 G>A (rs1800629); IL17A –197 G>A (rs2275913); TLR2 Arg753Gln G>A (rs5743708); TLR4 Asp299Gly A>G (rs4986790).

Результаты свидетельствуют о генетически детерминированной предрасположенности к СРК при увеличении количества «редких» аллелей в исследуемых областях генов CD14, TNF-α и TLR4. Носительство гетерозиготного генотипа GA полиморфизма IL17A –197 G>A также является фактором риска развития СРК в обследованной популяции. Напротив, носительство «редкого» аллеля полиморфизма Arg753Gln G>A гена TLR2 обладает протективными, а нормального — предиктивными свойствами в контексте развития СРК.

Ключевые слова: одиночный нуклеотидный полиморфизм; синдром раздраженного кишечника; цитокины; toll-подобные рецепторы

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2016; 132 (8): 30–39

Summary

The genetic component of multifactorial diseases which include irritable bowel syndrome (IBS) is provided by single nucleotide polymorphisms (SNP) as usual. It is essential to detect the associations of polymorphisms with various pathologies, even if they are not causative factors. It can be used for diagnostic purposes and the development of drug therapies. Analyses of individual polymorphisms have not found their unique relationship with susceptibility to IBS. Possibly, several genetic risk factors, together with the influence of the environment cause a synergistic effect leading to the appearance of IBS certain phenotype. This paper presents a research panel of five SNP, which are hereditary factors for violations processes of innate immunity: CD14–159 C>T (rs2569190); TNF-α –308 G>A (rs1800629); IL17A –197 G>A (rs2275913); TLR2 Arg753Gln G>A (rs5743708); TLR4 Asp299Gly A>G (rs4986790).

Results indicate genetically determined predisposition to IBS as the number of "rare" alleles in the test regions of genes CD14, TNF-α and TLR4. Carriage heterozygous genotype GA polymorphism IL17A –197 G>A is also a risk factor for IBS in the population studied. On the contrary, carriage of "rare" allele polymorphism Arg753Gln G>A TLR2 gene has to be protective, but normal — predictive properties in the context of the development of IBS.

Keywords: cytokines; irritable bowel syndrome; single nucleotide polymorphism; toll-like receptors

Experimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya 2016; 132 (8): 30–39

Вступление

Синдром раздраженного кишечника (СРК) в настоящее время считается наиболее распространенным функциональным расстройством желудочно-кишечного тракта [1], сопровождающимся висцеральной гиперчувствительностью [2], повышенной реактивностью кишечника [3], а также измененными реакциями центральной нервной системы в ответ на различные раздражители [4]. Важную роль в патофизиологии СРК играет так называемая «ось мозг — кишечник». Сюда можно отнести процессы коммуникации между кишечником и мозгом посредством эндокринной и нервной систем с подключением систем врожденного и адаптивного иммунитета [5]. Активный участник кишечно-мозговой оси является кишечная микрофлора, влияющая не только на функции желудочно-кишечного тракта, но и на психосоматическое состояние.

Распространенность СРК в мире колеблется в диапазоне 7%–21% от общей численности популяции [6]. В соответствии с характером и частотой стула СРК делится на три основных подтипа — СРК с преобладанием запора (С-СРК), СРК с преобладанием диареи (D-СРК) и смешанный тип СРК (M-СРК). Это клинический диагноз, поскольку патофизиология и основные молекулярные механизмы СРК остаются во многом неясными. Факторами риска считается повышенная чувствительность кишечника, измененная моторика кишечника, воспаление, стресс и неблагоприятная экологическая среда [6]. Как и у подавляющего большинства различных мультифакторных заболеваний, логично предположить наличие генетической составляющей в этиологии СРК. Широкий спектр исследований, включающий анализ наследственной предрасположенности и тестирование полиморфизмов различных генов, был проведен с целью выявления генетических факторов риска развития СРК. Свыше трети пациентов с СРК являются членами семей, потомственно страдающих этой патологией, и только у 2-х%, обратившихся к врачу, СРК диагностирован впервые среди членов их семей ($p < 0,0001$) [7]. Более высокий риск развития СРК характерен для родственников пациентов, страдающих этой патологией, первой, второй и даже третьей степени родства (OR для родственников первой степени: 1.75–1.90; для второй степени родства: 1.10–1.78 и для третьей степени родства: 1.11) [8]. Дети родителей, страдающих СРК, обращались за медицинской помощью по той-же причине на 20% чаще, чем дети родителей без СРК ($p = 0,0001$) и на 50% чаще по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0001$) [9]. Подобных примеров описано достаточно много [8,9] и все они поддерживают концепцию генетической предрасположенности к СРК.

Основная цель генетических исследований заключается в выявлении генетических вариантов в конкретных генах, которые могли бы изменять гомеостаз и увеличивать восприимчивость к болезни. Генетическая составляющая развития мультифакторных заболеваний представлена, как правило, одиночными нуклеотидными полиморфизмами (SNP, single nucleotide polymorphism). Одной из

особенностей SNP является достаточно высокое, не менее 1%, распространение в популяции патологических аллелей. Данное свойство четко отделяет заболевания, одной из причин которых являются патологические аллели SNP генов, от достаточно редких моногенных наследственных заболеваний.

В результате растущего интереса к полиморфизму генов изучено несколько возможно значимых для патогенеза СРК полиморфизмов. Однако полученные данные во многом противоречивы. Анализ отдельных полиморфизмов представляет слабые доказательства их связи с предрасположенностью к СРК. По-видимому, развитие СРК обусловлено аддитивными генетическими эффектами. Поэтому необходим комплексный подход, объединяющий результаты тестирования нескольких функционально значимых генов одновременно.

Исследования последних лет показали, что полиморфизмы генов определенных цитокинов и нейрпептидов, возможно, вовлечены в этиологию и влияют на клинические проявления СРК: частоту появлений и тяжесть симптомов, а также определяют терапевтические реакции при его лечении. К сожалению, ранее полученные результаты позволяют с уверенностью говорить лишь о незначительном вкладе каждого из проанализированных генов в патофизиологию СРК. Вероятно, несколько генетических факторов риска совместно с воздействием окружающей среды вызывают синергический эффект, приводящий к возникновению СРК определенного фенотипа. Поэтому для диагностики данного заболевания и определения стратегии лечения необходимо разработать оптимальную панель, включающую небольшое число SNP, имеющих наибольшее клиническое значение в конкретной популяции. Перспективным с точки зрения комплексной оценки генетической предрасположенности к СРК нам представляется анализ генов, связанных с врожденной иммунной реакцией и взаимодействием с бактериальной флорой. Эпителий ЖКТ является активным участником иммунного ответа посредством экспрессии провоспалительных генов, секреции цитокинов и привлечения провоцирующих воспаление клеток в ответ на патогенные бактерии и их продукты [10]. Изучение цитокинов в качестве маркеров субклинического воспаления играет исключительно важную роль при анализе СРК в конкретных этносах, так как отсутствие остроого воспаления снижает ценность гистологических показателей кишечника тракта. Кроме того, учитывая генетическую предрасположенность к измененной иммунной регуляции у больных СРК, безусловного внимания в качестве потенциальных факторов риска СРК заслуживают Toll-подобные рецепторы (TLR) и CD14, распознающие патогенные детерминанты и активирующие сигнальные пути врожденного иммунитета.

В настоящей работе представлена панель исследований из пяти SNP, являющихся наследственными факторами нарушения процессов врожденного иммунитета: CD14–159 C>T (rs2569190); TNF- α –308 G>A (rs1800629); IL17A –197 G>A (rs2275913); TLR2 Arg753Gln G>A (rs5743708); TLR4 Asp299Gly A>G (rs4986790).

Материалы и методы исследования

Клинические группы наблюдения и выделение ДНК

Исследовались образцы венозной крови пациентов, обратившихся в Университетскую клинику Санкт-Петербургского Государственного Университета (Санкт-Петербургский многопрофильный центр МЗ РФ, ранее СПКК НМХЦ МЗ РФ). Всего было обследовано 94 пациента с различными СРК. Контрольную группу из 31 человека составили жители Санкт-Петербурга без СРК и ВЗК в анамнезе.

Все пациенты заполнили информированное согласие на предоставление биологических образцов для анонимных научных исследований.

ДНК из венозной крови выделялась с использованием набора реактивов Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Метод минисеквенирования с последующим масс-спектрометрическим анализом. Определение аллелей SNP проводилось с использованием метода минисеквенирования с последующим масс-спектрометрическим анализом продукта (Костин и др., 2008). Принцип метода: сначала производилась амплификация участка исследуемого гена с анализируемым SNP (амплификатор T-100,

Bio-Rad, Великобритания), далее к продуктам амплификации после очистки от олигонуклеотидов и дидезоксиоснований добавлялись олигонуклеотидные зонды, ферментативно достраиваемые в ходе реакции минисеквенирования на несколько нуклеотидных оснований в зависимости от нуклеотидного состава в районе анализируемого SNP. Длина получавшегося достраиваемого зонда зависела от аллели SNP и определялась остановкой синтеза за счет включения комплементарного дидезоксиоснования. Аликвоты реакций минисеквенирования после очистки кристаллизовались в присутствии 3'-гидроксипиколиновой кислоты (Fluka, Германия) на планшете AnchorChip 600 мкм (Bruker Daltonics, Германия). Анализ проводился на времяпролетном масс-спектрометре MALDI-TOF Reflex IV (Bruker Daltonics, Германия). Анализ и обработка масс-спектров осуществлялась с использованием программного обеспечения FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Германия). Все реактивы и данные об эталонных значениях масс-спектров длин продуктов реакции получены от НПО «Литех», Москва.

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программ Statistica 10, Microsoft Excel и «Калькулятора для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль», предоставляемым сайтом Государственного Научного Центра Российской Федерации «ГосНИИ генетика» (<http://www.gen-expert.ru>).

Статистический анализ заключался в сравнении двух выборок по одному признаку. Под признаком понималось наличие (отсутствие) определенного аллеля, генотипа, или их сочетание в нескольких генах.

Статистическую оценку достоверности различий в распределении частот полиморфных аллелей и генотипов между исследованными выборками

с целью выявления ассоциаций генотипа с развитием заболевания проводили с помощью аддитивной модели наследования (тест Кохрана-Армитаджа для линейных трендов). За достоверность различий принимался уровень $p < 0,05$. Для каждого полиморфизма рассчитывалось собственное значение коэффициента соотношения шансов OR. Соотношение шансов указано с 95% интервалом.

OR=1 рассматривали как отсутствие ассоциации; OR>1 — как положительную ассоциацию (повышенный риск развития патологии); OR<1 — как отрицательную ассоциацию аллеля или генотипа с заболеванием (пониженный риск развития патологии).

Результаты исследования

В состав представленной панели исследований вошло пять SNP:

- CD14-159 C>T (rs2569190)
- TNF- α -308 G>A (rs1800629)
- IL17A -197 G>A (rs2275913)
- TLR2 Arg753Gln G>A (rs5743708)

TLR4 Asp299Gly A>G (rs4986790)

Выбор данных полиморфизмов обусловлен наличием значительного количества сообщений об их участии в регуляции активности белков, задействованных в каскадных реакциях врожденного иммунитета.

Анализ полиморфизма CD14-159 C>T (rs2569190)

Результаты исследования частот полиморфных вариантов гена CD14 в выборке пациентов с СРК и контрольной выборке представлены в Таблице 1. Наблюдаемое распределение частот генотипов по

исследованному локусу гена CD14 в контрольной выборке соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди — Вайнберга ($p = 0,82$).

Таблица 1
Распределение аллелей и генотипов полиморфизма -159 C>T (rs2569190) гена CD14 у пациентов с СРК и в контрольной группе

Группы	Частота генотипов, абс./отн.				Частота аллелей, абс./отн.		
	CC	CT	TT	Всего	C	T	Всего
СРК	20/0,213	52/0,553	22/0,234	94/1	92/0,49	96/0,51	188/1
Контроль	9/0,29	16/0,516	6/0,194	31/1	34/0,548	28/0,452	62/1

Анализ распределения аллелей полиморфизма -159 C>T (rs2569190) гена CD14 выявил статистически достоверный рост частоты встречаемости «патологического» аллеля T среди пациентов с СРК — 96/188 (51%) (OR = 1,27, 95% CI: 0,71–2,25) по сравнению со здоровыми лицами 28/62 (45,2%) (Таблица 1).

Частота генотипов CT и TT также достоверно выше в группе пациентов, страдающих СРК (OR =

1,16, 95% CI: 0.51–2.62 и OR = 1,27, 95% CI: 0.46–3.50 соответственно), по сравнению с контрольной группой.

Результаты свидетельствуют о генетически детерминированной предрасположенности к СРК при увеличении количества аллелей T в промоторной области -159 гена CD14.

Анализ полиморфизма TNF-α -308 G>A (rs1800629)

Результаты исследования частот полиморфных вариантов гена TNF-α в выборке пациентов с СРК и контрольной выборке представлены в Таблице 2. Наблюдаемое распределение частот генотипов по

исследованному локусу гена TNF-α в контрольной выборке соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди — Вайнберга (p = 0,44).

Группы	Частота генотипов, абс./отн.				Частота аллелей, абс./отн.		
	GG	GA	AA	Всего	G	A	Всего
СРК	62/0,66	25/0,266	7/0,074	94/1	149/0,79	39/0,21	188/1
Контроль	24/0,774	6/0,194	1/0,032	31/1	54/0,87	8/0,13	62/1

Таблица 2

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма -308 G>A (rs1800629) гена TNF-α у пациентов с СРК и в контрольной группе

Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма rs1800629 гена TNF-α среди больных СРК и доноров выявил статистически значимые изменения частот встречаемости «редкого» аллеля A (OR = 1,77, 95% CI: 0,78–4,02) и гетерозиготного и гомозиготного по «редкому» аллелю

A генотипов GA и AA (OR = 1,51, 95% CI: 0.55–4.11 и OR = 2,41, 95% CI: 0.29–20.43 соответственно). Можно предположить, что носительство гетерозиготного GA и гомозиготного AA генотипов промоторной области -308 TNF-α способствует развитию СРК.

Анализ полиморфизма IL17A -197 G>A (rs2275913)

Результаты исследования частот полиморфных вариантов гена IL17A -197 G>A (rs2275913) в выборке пациентов с СРК и контрольной выборке представлены в Таблице 3. Наблюдаемое распределение

частот генотипов по исследованному локусу гена IL17A в контрольной выборке не соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди — Вайнберга (p = 0,02).

Группы	Частота генотипов, абс./отн.				Частота аллелей, абс./отн.		
	GG	GA	AA	Всего	G	A	Всего
СРК	42/0,447	34/0,362	18/0,191	94/1	118/0,63	70/0,37	188/1
Контроль	16/0,516	8/0,258	7/0,226	31/1	40/0,65	22/0,35	62/1

Таблица 3

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма -197 G>A (rs2275913) гена IL17A у пациентов с СРК и в контрольной группе

Частота гетерозиготного генотипа GA достоверно повышена у больных СРК (OR = 1,63, 95% CI: 0.66–4.04) по сравнению с контролем (36, 2% vs 25,8%), частота встречаемости мутантного аллеля A повышена на уровне тенденции (OR = 1,08, 95% CI: 0,59–1,96). Подобное близкое к единице значение OR говорит об отсутствии достоверного влияния генотипа по данному полиморфизму на

риск развития СРК в исследованной группе. Тем не менее, представленные в Таблице 3 результаты свидетельствуют о наличии тенденции к повышению степени ассоциации генотипа полиморфизма IL17A -197 G>A (rs2275913) с риском развития СРК при увеличении в генотипе количества аллелей A. Носительство гетерозиготного генотипа GA является генетическим фактором риска развития СРК.

Анализ полиморфизма TLR2 Arg753Gln G>A (rs5743708)

Результаты исследования частот полиморфных вариантов гена TLR2 Arg753Gln G>A (rs5743708) в выборке пациентов с СРК и контрольной выборке представлены в Таблице 4. Наблюдаемое распределение частот генотипов по исследованному локусу гена TLR2 в контрольной выборке соответствует

теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди — Вайнберга (p = 0,85).

Исследование частоты встречаемости однонуклеотидной замены Arg753Gln G>A (rs5743708) гена TLR2 показало, что наличие «редкого» аллеля A достоверно снижено у пациентов с СРК по сравнению

Группы	Частота генотипов, абс./отн.				Частота аллелей, абс./отн.		
	GG	GA	AA	Всего	G	A	Всего
СРК	78/0,83	13/0,14	3/0,03	94/1	169/0,9	19/0,1	188/1
Контроль	20/0,645	10/0,323	1/0,032	31/1	50/0,81	12/0,19	62/1

Таблица 4

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма Arg753Gln G>A (rs5743708) гена TLR2 у пациентов с СРК и в контрольной группе

с контрольной группой (OR = 0,47, 95% CI: 0.21–1.03). Гомозиготный по «редкому» аллелю генотип AA практически не влияет на предрасположенность к СРК (OR = 0,99, 95% CI: 0.10–9.87), в то время как гетерозиготный генотип GA значительно чаще встречается у здоровых по этому показателю людей (14% vs 32.3%). Результаты свидетельствуют о статистически достоверной предрасположенности к СРК у носителей гомозиготного генотипа

по нормальному аллелю GG полиморфизма TLR2 Arg753Gln G>A (rs5743708) в обследованной нами популяции (OR = 2,68, 95% CI: 1.08–6.67).

Таким образом, можно предположить, что носительство мутантного аллеля полиморфизма Arg753Gln G>A гена TLR2 обладает протективными, а нормального — предиктивными свойствами в контексте развития синдрома раздраженного кишечника.

Анализ полиморфизма TLR4 Asp299Gly A>G (rs4986790)

Результаты исследования частот полиморфных вариантов гена TLR4 Asp299Gly A>G (rs4986790) в выборке пациентов с СРК и контрольной выборке представлены в Таблице 5. Наблюдаемое

распределение частот генотипов по исследованному локусу гена TLR4 в контрольной выборке соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди — Вайнберга ($p = 0,44$).

Таблица 5

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма Asp299Gly A>G (rs4986790) гена TLR4 у пациентов с СРК и в контрольной группе

Группы	Частота генотипов, абс./отн.			Всего	Частота аллелей, абс./отн.		
	AA	AG	GG		A	G	Всего
СРК	69/0,734	10/0,106	15/0,16	94/1	148/0,79	40/0,21	188/1
Контроль	24/0,774	6/0,194	1/0,032	31/1	43/0,69	19/0,31	62/1

Установлено статистически значимое изменение частоты встречаемости «редкого» аллеля G в группе пациентов с СРК по сравнению со здоровыми донорами (OR = 1,82, 95% CI: 0,80–4,14). Отмечается преимущественное нахождение нормального аллеля A в гомозиготном состоянии и у пациентов, страдающих СРК (73,4%), и в контрольной группе (77,4%). Гомозиготное и гетерозиготное состояние «редкого» аллеля G у больных СРК встречается

почти в 2 раза реже, чем у обследованных из контрольной группы (16% vs 32% и 10,6% vs 19,4% соответственно). Наблюдается достоверное увеличение риска развития СРК у носителей гомозиготного генотипа GG полиморфизма TLR4 rs5743708 (OR = 5,70, 95% CI: 0.72–45.03). По-видимому, носительство мутантного аллеля G SNP TLR4 Asp299Gly A>G (rs4986790) является фактором предрасположенности к СРК в нашей популяции.

Обсуждение полученных результатов

В соответствии с современными воззрениями СРК является результатом взаимодействия нескольких биологических, психологических и социальных факторов, каждый из которых вносит свой вклад в этиологию и развитие СРК [11].

Существует гипотетическая схема развития и поддержания СРК, включающая два механизма, обуславливающие на начальном этапе особенности клинической картины заболевания и состояние основных гомеостабилизирующих систем организма [12,13]. Первый из механизмов, названный авторами «моментальный», проявляясь непосредственно сразу после воздействия дестабилизирующего воздействия, реализуется посредством выброса нейромедиаторов (катехоламины, кортикостероиды, серотонин, гамма-аминомасляная кислота, мотилин и т.д.). При этом клинические проявления СРК напрямую зависят от характеристик дестабилизирующего воздействия («стрессора»). Изменения тонуса и моторики толстой кишки приводят к нарушению в кишечном биоценозе, в первую очередь, состава химуса, от которого в определенной степени зависят состояние слизистой оболочки (секреция слизи, трофика слизистой оболочки) и соотношение аллохтонной и аутохтонной микрофлоры. При хроническом характере неблагоприятного нейropsychического воздействия уже непосредственно сам кишечный биоценоз выступает как фактор, провоцирующий нарушение тонуса

и моторики толстой кишки и способствующий развитию психосоматических отклонений личности. В соответствие с этим проанализировано несколько генов, предположительно связанных с СРК. К ним относятся, в частности, гены рецепторов и транспортеров серотонина и гены адоренорецепторов.

Второй описанный механизм, «отсроченный» подразумевает возникновение СРК в ответ на нарушения питания, медикаментозные средства, неблагоприятные средовые воздействия и т.д. Ключевую роль здесь играют выраженные процессы разбалансировки кишечного биоценоза, нередко сопровождающиеся локальными, слабоактивными субклиническими воспалениями [14]. По всей видимости, в реализации именно данного механизма участвуют патологические аллели генов некоторых поверхностных рецепторов и провоспалительных цитокинов [6].

Действительно, предварительные данные указывают на генетическую предрасположенность к аномальной иммунной регуляции у больных СРК. Конкретные генетические изменения, в частности, определенные варианты аллелей (полиморфизм) гена, присутствующие в значительной части популяции, могут влиять на предрасположенность к болезни и ее клинические проявления. Подход с использованием функциональных полиморфизмов облегчает интерпретацию основных

биологических механизмов, основанных на анализе уровня экспрессии гена или активности белка. Кроме того, полиморфизмы различных генов могут существенно менять эффекты воздействия окружающей среды [15].

В последние годы все больше исследователей склоняются к мысли, что для разработки диагностических методов и терапевтических стратегий необходим комплексный анализ нескольких генетических вариантов. Учитывая все вышесказанное, мы сосредоточили свое внимание на анализе SNP пяти генов, участвующих в распознавании патогенов и вовлеченных в реакции врожденного иммунитета: CD14–159 C>T (rs2569190); TNF- α –308 G>A (rs1800629); IL17A –197 G>A (rs2275913); TLR2 Arg753Gln G>A (rs5743708); TLR4 Asp299Gly A>G (rs4986790).

При выборе именно этого набора полиморфизмов, мы руководствовались следующими соображениями: несмотря на многочисленные различия, по-видимому, существуют некоторые перекрывающиеся механизмы, сближающие две наиболее распространенные патологии кишечника — воспалительное заболевание кишечника и синдром раздраженного кишечника. На это указывают данные последних лет: объяснение дисфункции при ВЗК нарушением коммуникации мозг-желудок; установление важной роли провоспалительных цитокинов в патогенезе ВЗК и СПК; доказательства влияния микробиоты на функции всего организма; выявление воспалительных процессов при СПК; развитие симптомов СПК у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника в стадии ремиссии [16]. Все анализируемые нами полиморфизмы хорошо изучены и по данным многочисленных исследований являются факторами риска развития ВЗК — болезни Крона (БК) и язвенного колита (ЯК).

В частности, в ряде исследований показано, что полиморфизм промотора гена бактериального рецептора CD14–159C/T указывает на предрасположенность к ВЗК. Частота встречаемости Т аллеля и ТТ генотипа полиморфизма CD14–159 C>T (rs2569190) у пациентов с ВЗК значительно выше, чем у здоровых людей [17–21].

У представителей белой расы в большей степени это характерно для БК, чем для ЯК [22,23]. Функциональный полиморфизм промотора гена рецептора бактериальных липополисахаридов CD14–159C/T указывает на предрасположенность к БК также у саудитов [24]. Однако, в японской и китайской популяциях –159 ТТ CD14 генотип, напротив, ассоциируется с ЯК, но не с БК [20]. У корейцев полиморфизм промотора гена CD14–159C/T коррелирует и с ЯК и с БК [21]. Интересно отметить, что совместные мутации в TLR4 и CD14 генах указывают на повышенную склонность к развитию БК по сравнению с ЯК, а также предрасположенность к БК и ЯК по сравнению со здоровыми лицами [21].

Приведенные данные указывают на неоднозначность роли этого полиморфизма CD14 в этиологии подтипов ВЗК в различных этнических группах, отражая плейотропное действие генов в патогенезе ВЗК и/или результат взаимодействия различных генетических или экологических факторов.

В нашем исследовании мы получили доказательство того, что полиморфизм гена CD14–159C/T является перспективным маркером предрасположенности к СПК. Частота встречаемости мутантного аллеля Т в промоторной области –159 гена CD14 была значительно выше в группе пациентов, страдающих СПК, по сравнению с контрольной группой. Известно, что наличие варианта аллеля CD14–159Т сопровождается повышенной транскрипционной активностью и усилением воспалительных реакций [25]. Аномальная экспрессия CD14 может привести к определенным изменениям слизистой оболочки кишечника, характерным для СПК. Поэтому вывод о том, что у носителей аллеля Т повышен риск развития СПК, представляется вполне логичным и согласуется с результатами других исследователей [26]. Выявленные нами частоты аллелей полиморфизма –159 C>T гена CD14 в контрольной группе достаточно точно совпали с аналогичными показателями, выявленными в популяции г. Новосибирска [26]. Показатели составили для аллели С 54,8% и для аллели Т 45,2% в популяции Санкт-Петербурга против 53,8% и 46,2% соответственно в популяции Новосибирска.

Цитокины — важные медиаторы воспалительных и иммунных реакций. Про- и противовоспалительные цитокины в значительной степени могут влиять на различные функции ЖКТ: моторику, эпителиальную проницаемость и висцеральную чувствительность [27]. Многочисленные исследования подтверждают наличие полиморфных аллелей в генах цитокинов у пациентов с СПК [28–30]. Что касается провоспалительного цитокина TNF- α , то неоднократно сообщалось об увеличении его плазменных и/или кишечных уровней при СПК [27,31]. В частности, у пациентов с постинфекционным СПК, как правило, наблюдаются высокие уровни этого провоспалительного цитокина [32]. Однако генетические исследования не выявили четкой картины возможной ассоциации полиморфизмов гена TNF- α и СПК.

Генотип низкого уровня TNF- α (–308G/G) коррелирует с повышенным риском развития СПК, а генотип TNF- α (–308G/A) снижает риск развития СПК в азиатской популяции [27]. При этом генотип TNF- α (–308G/A) более распространен у европейских пациентов с СПК по сравнению с контрольной группой [29]. Никаких изменений в частоте встречаемости полиморфизма TNF- α не обнаружено при СПК в Южной Корее [33], Индии [30] и Мексике [34]. Не выявлено каких-либо различий по этому параметру между пациентами с постинфекционным СПК и пациентами, у которых в анамнезе заболевания не обнаружены желудочно-кишечные инфекции [34,35]. По-видимому, предположение о желудочно-кишечных инфекциях как о пусковом факторе развития СПК по-прежнему носит дискуссионный характер.

Выбранные нами в качестве потенциальных генов восприимчивости к СПК полиморфизмы провоспалительных цитокинов TNF- α –308 G>A (rs1800629) и IL17A –197 G>A (rs2275913) активно изучаются и в связи с ВЗК. Даже небольшие различия в уровнях цитокинов в результате генетических вариантов могут иметь существенное влияние на

воспалительную реакцию и на патофизиологию различных заболеваний. Концентрация TNF- α увеличивается в сыворотке крови, кале, слизи оболочке и других тканях кишечника у пациентов с воспалительными процессами в желудочно-кишечном тракте [36,37]. Полиморфизм TNF- α -308 G>A (rs1800629) считается одним из основных факторов риска ВЗК и СРК с позиционной и функциональной точек зрения [37]. Несмотря на то, что в относительно большой выборке опубликованных работ не найдено каких-либо существенных различий в частоте встречаемости -308 мутантных аллелей TNF- α у больных ВЗК по сравнению со здоровыми людьми [38–40], многочисленные исследования связывают этот полиморфизм с предрасположенностью к ВЗК. В частности, генетически обусловленная повышенная экспрессия гена TNF- α -308 G>A снижает риск развития БК [41,42] и ЯК [42–44]. В японской популяции наблюдалось четырехкратное увеличение частоты аллеля А среди пациентов с ЯК по сравнению с контролем [45]. У европейцев генотип AA TNF- α -308 также существенно повышает риск развития ЯК (OR, 2,041; 95% CI: 1.261–3.301) и БК (OR, 1,730; 95% CI: 1.168–2.564). В то же время, генотип GA TNF- α -308 в значительной степени повышает риск развития ЯК у азиатов (OR, 2.360; 95% CI: 1.269–4.390) [46].

Представленные в Таблице 2 результаты нашего анализа полиморфизма TNF- α (rs1800629) показывают, что носительство гетерозиготного GA и гомозиготного AA по мутантному аллелю А генотипов промоторной области -308 TNF- α , свидетельствующее о повышенных уровнях экспрессии этого провоспалительного цитокина, способствует развитию СРК, что согласуется с ранее опубликованными данными [32].

Второй, выбранный нами цитокин, интерлейкин-17 (IL-17), объединяет врожденные и адаптивные компоненты иммунной системы. Он обладает сильными провоспалительными свойствами, стимулируя продуцирование фибробластами и эпителиальными клетками провоспалительных медиаторов, в том числе хемокинов, цитокинов и металлопротеиназ [47]. По-видимому, IL-17 участвует в регуляции противоопухолевого иммунитета и играет важную роль в реакциях иммунного ответа при бактериальных инфекциях. Так уровень IL-17 увеличивается при инфицировании *Helicobacter pylori* [48], в ответ на бактериальную ДНК *S. dublin* и *L. Plantarum* у пациентов, страдающих БК [49].

При язвенном колите и болезни Крона обнаруживаются повышенные уровни мРНК IL-17 в кишечнике [50].

Нам не удалось выявить четкой ассоциации полиморфизма -197 G>A (rs2275913) гена IL17A с предрасположенностью к СРК. Тем не менее, полученные результаты свидетельствуют, что увеличение в генотипе количества аллелей А полиморфизма IL17A -197 G>A (rs2275913) сопряжено с риском развития СРК на уровне тенденции. Однако носительство гетерозиготного генотипа GA статистически достоверно указывает на предрасположенность к СРК (OR = 1,63, 95% CI: 0.66–4.04). По-видимому, сам по себе этот полиморфизм гена IL17A вносит умеренный вклад в этиологию СРК, но в сочетании

с другими факторами риска он, возможно, значительно повысит точность прогноза.

Среди различных полиморфизмов, рассматриваемых в качестве генетических факторов риска возникновения и развития ВЗК, полиморфизмы Toll-подобных рецепторов (TLR) привлекают все большее внимание в последние годы. Несомненный интерес, по нашему мнению, представляют они и в связи с восприимчивостью к СРК, поскольку анализ SNP генов, участвующих в распознавании патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP — pathogen-associated molecular pattern), существенен для понимания индивидуальных иммунных ответов на бактериальную инфекцию.

Toll-подобные рецепторы (TLRs) — члены эволюционно-консервативного суперсемейства трансмембранных белков, экспрессируемых, как правило, антиген-представляющими клетками. TLRs играют существенную роль в пищеварительной системе. Они важны для реакций иммунного ответа, участвуя в узнавании и связывании с молекулярными компонентами патогенных микроорганизмов и активации сигнальных путей антимикробных генов [51]. Однако, устойчивая гиперактивация TLR может привести к хроническим воспалениям. Предположительно патогенез ВЗК связан с ростом уровня TLRs и нарушениями в их сигнальных путях [52].

Сегодня описано более десятка членов семейства TLR, распознающих различные болезнетворные микроорганизмы независимо друг от друга или в кооперации. TLR2 и TLR4 наиболее часто упоминаются в связи с риском развития ВЗК.

TLR2 распознает бактериальные липопротеины и липотейхоевые кислоты, содержащиеся в большом количестве в клеточных стенках грамположительных бактерий, и стимулирует секрецию провоспалительных цитокинов [53]. TLR4 — поверхностный рецептор для липополисахаридов — структурных компонентов мембран грамотрицательных бактерий [54]. В норме TLR2 и TLR4 слабо экспрессируются эпителиальными клетками кишечника [55]. Однако уровни экспрессии TLR2 и TLR4 в нижней части желудочно-кишечного тракта у пациентов с ВЗК весьма значительны, и это может стимулировать чрезмерный иммунный ответ [56].

Несмотря на то, что ассоциации TLR2 и TLR4 полиморфизмов с ВЗК существенно отличаются у различных этнических групп, подтверждая предположение, что популяционная генетическая гетерогенность играет важнейшую роль в предрасположенности к ВЗК, в ряде исследований зафиксирована связь выбранных нами полиморфизмов TLRs с риском развития ВЗК. В бельгийской популяции частота встречаемости полиморфизма гена TLR4 A299G (rs498679) оказалась значительно выше при ЯК и БК по сравнению с контрольной группой [57]. Полиморфизмы генов TLR2 Arg753Glu и TLR4 Asp299Gly не связаны с ВЗК у китайцев, напротив, в популяции кавказцев генотип TLR4 299 G сопряжен со значительным риском развития БК и ЯК [58].

В нашем исследовании анализ полиморфизма TLR4 Asp299Gly A>G (rs4986790) оказался более информативным по сравнению с полиморфизмом

Arg753Gln G>A (rs5743708) гена TLR2 с точки зрения предрасположенности к СРК. В обследованной группе пациентов, страдающих СРК, носительство «редкого» аллеля G в анализируемой области гена TLR4 и гомозиготного по «редкому» аллелю генотипа GG указывает на статистически значимый рост риска развития СРК (OR = 1,82, 95% CI: 0,80–4,14 и OR = 5,70, 95% CI: 0,72–45,03 соответственно); носительство мутантного аллеля A полиморфизма Arg753Gln гена TLR2 обладает протективными, а нормального аллеля G — предиктивными свойствами в контексте развития СРК. При этом наши результаты свидетельствуют о статистически достоверной предрасположенности к СРК у носителей гомозиготного генотипа по нормальному аллелю GG полиморфизма TLR2 Arg753Gln G>A (rs5743708) (OR = 2,68, 95% CI: 1.08–6.67). Таким образом, несмотря на обнаружение незначительных воспалений в слизистой оболочке толстой кишки у пациентов с СРК (увеличенное количество лимфоцитов в эпителии, тучных клеток и/или энтерохромаффинных клеток) [59], низкие частоты встречаемости мутантного аллеля A полиморфизма TLR2 Arg753Gln G>A (rs5743708) у больных СРК, по-видимому, подтверждает общепринятое мнение, что СРК не является истинно воспалительным заболеванием.

Учитывая различия микробиоты у больных СРК по сравнению с контрольной группой [60], включение этих двух SNP TLRs в панель исследований СРК представляется нам необходимым.

Выводы

1. Представлена панель исследований из пяти SNP, являющихся наследственными факторами нарушения процессов врожденного иммунитета: CD14–159 C>T (rs2569190); TNF- α –308 G>A (rs1800629); IL17A –197 G>A (rs2275913); TLR2 Arg753Gln G>A (rs5743708); TLR4 Asp299Gly A>G (rs4986790).
2. Показано, что увеличение количества «редких» аллелей в исследуемых областях генов CD14,

Выявление ассоциаций полиморфизмов генов с различными заболеваниями, даже если они не являются этиологическими факторами, исключительно важно, поскольку может быть использовано в диагностических целях и при разработке терапевтических стратегий. Совместный анализ двух SNP в генах может показать статистически значимое увеличение риска развития ВЗК, при этом анализ полиморфизма каждого гена в отдельности не позволяет рассматривать их в качестве факторов предрасположенности [61]. Это утверждение в равной степени может относиться и к СРК. Предлагаемая нами панель исследования из пяти SNP позволит более точно оценить вклад генетической составляющей в этиологию СРК и, как следствие, улучшит прогноз клинических проявлений болезни.

Факторы окружающей среды, инфекции ЖКТ и психологический стресс участвуют в патогенезе СРК. Представляется необходимым анализ взаимодействия психологических и экологических последствий и функциональных полиморфизмов при СРК. Кроме того, эпигенетические исследования, возможно, помогут ответить на некоторые вопросы, связанные со сложной патофизиологией СРК. Следует учитывать также гендерные и этнические различия. По-видимому, только такой комплексный анализ поможет объяснить основные симптомы СРК (повышенная чувствительность к боли, стресс-реактивность, нарушение иммунной регуляции).

TNF- α и TLR4 ассоциировано с предрасположенностью к СРК.

3. Носительство гетерозиготного генотипа GA полиморфизма IL17A –197 G>A является фактором риска развития СРК в обследованной популяции.
4. Носительство «редкого» аллеля полиморфизма Arg753Gln G>A гена TLR2 обладает протективными, а нормального — предиктивными свойствами в контексте развития СРК.

Литература

1. Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology*. 2006;130(5):1377–90.
2. Bouin M, Plourde V, Boivin M, Riberdy M, Lupien F, Laganiere M, et al. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: sensitivity, specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology*. 2002;122(7):1771–7.
3. Fukudo S, Nomura T, Hongo M. Impact of corticotropin-releasing hormone on gastrointestinal motility and adrenocorticotrophic hormone in normal controls and patients with irritable bowel syndrome. *Gut*. 1998;42(6):845–9.
4. Mertz H, Morgan V, Tanner G, Pickens D, Price R, Shyr Y, et al. Regional cerebral activation in irritable bowel syndrome and control subjects with painful and nonpainful rectal distention. *Gastroenterology*. 2000;118(5):842–8.
5. Fukudo S, Nomura T, Muranaka M, Taguchi F. Brain-gut response to stress and cholinergic stimulation in irritable bowel syndrome. A preliminary study. *J Clin Gastroenterol*. 1993;17(2):133–41.
6. Makker J, Chilimuri S, Bella JN. Genetic epidemiology of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(40): 11353–11361.
7. Whorwell PJ, McCallum M, Creed FH, Roberts CT. Non-colonic features of irritable bowel syndrome. *Gut*. 1986;27:37–40.
8. Waehrens R, Ohlsson H, Sundquist J, Sundquist K, Zöller B. Risk of irritable bowel syndrome in first-degree, second-degree and third-degree relatives of affected individuals: a nationwide family study in Sweden. *Gut*. 2015;64:215–221.
9. Levy RL, Whitehead WE, Von Korff MR, Feld AD. Intergenerational transmission of gastrointestinal illness behavior. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:451–456.

10. De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A, Bitton A, Cohen A, Langelier D, Belaiche J, Vermeire S, Farwell L, Goris A, et al. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun.* 2007;8:387–397.
11. van Tilburg MA, Whitehead WE. New Paradigm for Studying Genetic Contributions to Irritable Bowel Syndrome. *Dig Dis Sci.* 2012; 57(10): 2484–2486.
12. Костенко МБ, Ливзан МА. Механизмы развития синдрома раздраженного кишечника. *Сибирский журнал гастроэнтерологии и гепатологии.* 2000;10:32–35.
13. Мартынов АИ, Шилов АМ, Макарова ИА. Синдром раздраженного кишечника — патогенетические механизмы. *Лечащий врач,* 2010;5:52–56.
14. Ohman L, Simren M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 163–73; Bashashati M, Rezaei N, Andrews CN et al. Cytokines and irritable bowel syndrome: where do we stand? *Cytokine* 2012; 57: 201–9.
15. Perera FP, Weinstein IB. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis.* 2000;21:517–524.
16. Barbara G, Cremon C, Stanghellini V. Inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: similarities and differences. *Curr Opin Gastroenterol.* 2014;30(4):352–8/
17. Leung E, Hong J, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Abbott WG, Krissansen GW. Polymorphisms of CARD15/NOD2 and CD14 genes in New Zealand Crohn's disease patients. *Immunol Cell Biol.* 2005;83:498–503.
18. Guo QS, Xia B, Jiang Y, Morré SA, Cheng L, Li J, Crusius JB, Peia AS. Polymorphisms of CD14 gene and TLR4 gene are not associated with ulcerative colitis in Chinese patients. *Postgrad Med J.* 2005;81:526–529.
19. Peters KE, O'Callaghan NJ, Cavanaugh JA. Lack of association of the CD14 promoter polymorphism: 159C/T with Caucasian inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2005;40:194–197.
20. Wang F, Tahara T, Arisawa T, Shibata T, Nakamura M, Fujita H, Iwata M, Kamiya Y, Nagasaka M, Takahama K, Watanabe M, Hirata I, Nakano H. Genetic polymorphisms of CD14 and Toll-like receptor-2 (TLR2) in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22:925–929.
21. Kim EJ, Chung WC, Lee KM, Paik CN, Jung SH, Lee BI, Chae HS, Choi KY. Association between toll-like receptors/CD14 gene polymorphisms and inflammatory bowel disease in Korean population. *J Korean Med Sci.* 2012;27(1):72–7.
22. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonomopoulos J, Gorgoulis VG. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol.* 2005;11:681–685.
23. Griga T, Klein W, Epplen JT, Hebler U, Stachon A, May B. CD14 expression on monocytes and soluble CD14 plasma levels in correlation to the promoter polymorphism of the endotoxin receptor CD14 gene in patients with inactive Crohn's disease. *Hepatology* 2005;52(63):808–11.
24. Azzam N, Nounou H, Alharbi O, Aljebreen A, Shalaby M. CARD15/NOD2, CD14 and toll-like 4 receptor gene polymorphisms in Saudi patients with Crohn's Disease. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4268–80.
25. Türe-Ozdemir F, Gazouli M, Tzivras M, Panagos C, Bovaretos N, Petraki K, Giannakopoulos A, Korkolopoulou P, Mantzaris GJ. Association of polymorphisms of NOD2, TLR4 and CD14 genes with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Anticancer Res.* 2008;28(6A):3697–700.
26. Валуйских ЕЮ, Светлова ИО, Курилович СА, Осипенко МФ, Максимов ВН, Воевода МИ. Клинико-генетические аспекты воспалительных заболеваний кишечника. *РЖГГК.* 2008;18: 68–74.
27. Bashashati M, Rezaei N, Bashashati H, Shafieyoum A, Daryani NE, Sharkey KA, Storr M. Cytokine gene polymorphisms are associated with irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterol Motil.* 2012 Dec;24(12):1102–e566.
28. Barkhordari E, Rezaei N, Mahmoudi M et al. T-helper 1, T-helper 2, and T-regulatory cytokines gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Inflammation* 2010; 33: 281–6.
29. van der Veek PP, van den Berg M, de Kroon YE, Verspaget HW, Masclee AA. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2510–6.
30. Santhosh S, Dutta AK, Samuel P, Joseph AJ, Ashok KJ, Kurian G. Cytokine gene polymorphisms in irritable bowel syndrome in Indian population — a pilot case control study. *Trop Gastroenterol* 2010; 31: 30–34.
31. Scully P, McKernan DP, Keohane J et al. Plasma cytokine profiles in females with irritable bowel syndrome and extra-intestinal co-morbidity. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 2235–43.
32. Liebrechts T, Adam B, Bredack C et al. Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007; 132: 913–20.
33. Lee HJ, Lee SY, Choi JE, Kim JH, Sung IK, Park HS, et al. G protein beta3 subunit, interleukin-10, and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in Koreans with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:758–63.
34. Schmulson M, Pulido-London D, Rodríguez Ó, Morales-Rochlin N, Martínez-García R, Gutiérrez-Ruiz MC, López-Alvarenga JC, Gutiérrez-Reyes G. IL-10 and TNF-alpha polymorphisms in subjects with irritable bowel syndrome in Mexico. *Rev Esp Enferm Dig.* 2013;105(7):392–9.
35. Villani AC, Lemire M, Thabane M et al. Genetic risk factors for post-infectious irritable bowel syndrome following a waterborne outbreak of gastroenteritis. *Gastroenterology* 2010; 138: 1502–13.
36. Komatsu M, Kobayashi D, Saito K, Furuya D, Yagihashi A, Araake H, et al. Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clin Chem.* 2001;47:1297–301.
37. Chaparro M, Guerra I, Muñoz-Linares P, Gisbert JP (2012). Systematic review: antibodies and anti-TNF-α levels in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;35(9): 971–986.
38. Naderi N, Farnood A, Dadaei T, Habibi M, Balaii H, Firouzi F, Mahban A, Soltani M, Zali M. Association of Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Polymorphisms with Inflammatory Bowel Disease in Iran. *Iran J Public Health.* 2014; 43(5): 630–636.
39. Zipperlen K, Peddle L, Melay B, Hefferton D, Rahman P. Association of TNF-α polymorphisms in Crohn disease. *Hum Immunol.* 2005; 66(1):56–59.
40. Mittal RD, Manchanda PK, Bid HK, Ghoshal UC. Analysis of polymorphisms of tumor necrosis factor-α and polymorphic xenobiotic metabolizing enzyme in inflammatory bowel disease: Study from northern India. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22(6):920–924.
41. Louis E, Peeters M, Franchimont D, Seidel L, Fontaine F, Demolin G, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene

- polymorphism in Crohn's Disease (CD): influence on disease behaviour. *Clin Exp Immunol.* 2000;119:64–8.
42. Gonzalez S, Rodrigo L, Martinez-Borra J, et al. TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:1101–1106.
 43. Ferguson LR, Huebner C, Petermann I, Gearry RB, Barclay ML, Demmers P, McCulloch A, Han DY. Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk. *World J Gastroenterol.* 2008;14(29):4652–61.
 44. Bank S, Skytt Andersen P, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J, Ydegaard Turino S, Brodersen JB, Rashid S, Kaiser Rasmussen B, Avlund S, Bastholm Olesen T, Jürgen Hoffmann H, Kragh Thomsen M, Ostergaard Thomsen V, Frydenberg M, Andersen Nexø B, Sode J, Vogel U, Andersen V. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort. *PLoS One.* 2014;9(6): e98815.
 45. Sashio H, Tamura K, Ito R, Yamamoto Y, Bamba H, Kosaka T, et al. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics.* 2002;53:1020–7.
 46. Fan W, Maoqing W, Wangyang C, Fulan H, Dandan L, Jiaojiao R, Xinshu D, Binbin C, Yashuang Z. Relationship between the polymorphism of tumor necrosis factor- α -308 G>A and susceptibility to inflammatory bowel diseases and colorectal cancer: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(4):432–7.
 47. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004;21:467–476.
 48. Lizza F, Parrello T, Monteleone G, Sebkova L, Romano M, Zarrilli R, Imeneo M, Pallone F. Up-Regulation of IL-17 Is Associated with Bioactive IL-8 Expression in Helicobacter pylori-Infected Human Gastric Mucosa. *J Immunol.* 2000;165:5332–5337.
 49. Hotte NS, Salim SY, Tso RH, Albert EJ, Bach P, Walker J, Dieleman LA, Fedorak RN, Madsen KL. Patients with Inflammatory Bowel Disease Exhibit Dysregulated Responses to Microbial DNA. *PLoS One.* 2012;7(5): e37932.
 50. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, et al. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut.* 2008;57:1682–1689.
 51. Seitz M. Toll-like receptors: sensors of the innate immune system. *Allergy.* 2003;58(12):1247–9.
 52. Wang Z, Hu J, Fan R, Zhou J, Zhong J. Association between CD14 Gene C-260T Polymorphism and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2012;7(9): e45144.
 53. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999;11(4):443–51.
 54. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 2000;406(6797):782–7.
 55. Singh JC, Cruickshank SM, Newton DJ, Wakenshaw L, Graham A, Lan J, et al. Toll-like receptor-mediated responses of primary intestinal epithelial cells during the development of colitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2005;288(3): G514–24.
 56. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spottl T, Andus T, et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology.* 2002;122(7):1987–2000.
 57. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Devière J, Rutgeerts P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut.* 2004;53:987–992.
 58. Cheng Y, Zhu Y, Huang X, Zhang W, Han Z, Liu S. Association between TLR2 and TLR4 Gene Polymorphisms and the Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015; 10(5): e0126803.
 59. Schmulson M, Chey WD. Abnormal immune regulation and lowgrade inflammation in IBS: Does one size fit all? *Am J Gastroenterol* 2012;107:273–5.
 60. Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011;141:1792–801.
 61. Petermann I, Huebner C, Browning BL, Gearry RB, Barclay ML, Kennedy M, Roberts R, Shelling AN, Philpott M, Han DY, Ferguson LR. Interactions among genes influencing bacterial recognition increase IBD risk in a population-based New Zealand cohort. *Hum Immunol.* 2009;70(6):440–6.