



Молекулярно-генетическая диагностика воспалительных заболеваний кишечника

Кузнецова Д.А.^{1,2} • Разумов А.С.¹ • Мерзляков М.В.² • Вавин Г.В.² • Репникова Р.В.¹

Кузнецова Дарья Александровна – аспирант кафедры патологической физиологии, медицинской и клинической биохимии¹, врач клинической лабораторной диагностики иммунологической лаборатории²

✉ 650066, г. Кемерово, Октябрьский пр-т, 22, Российская Федерация. Тел.: +7 (923) 497 21 10. E-mail: lariwar@mail.ru

Разумов Александр Сергеевич – д-р мед. наук, профессор кафедры патологической физиологии, медицинской и клинической биохимии¹

Мерзляков Михаил Валерьевич – канд. мед. наук, заведующий отделением эндоскопии²

Вавин Григорий Валерьевич – канд. мед. наук, заместитель главного врача по лабораторной диагностике²

Репникова Рената Витальевна – д-р мед. наук, профессор кафедры факультетской терапии, профессиональных болезней и эндокринологии¹

Актуальность. В последние два десятилетия все больше внимания уделяется разработке и внедрению молекулярно-генетических технологий диагностики и прогнозирования риска развития и течения воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). Однако опубликованные данные об их диагностической ценности весьма противоречивы и неоднозначны, что может быть обусловлено особенностями частоты встречаемости, различиями в патогенетической и клинико-диагностической значимости генетических полиморфизмов в разных странах и регионах. **Цель** – оценить частоту встречаемости, клинико-диагностическую и прогностическую значимость нуклеотидных полиморфизмов 3020insC и G2722C гена *CARD15* (*NOD2*) при болезни Крона (БК) и язвенном колите (ЯК) в Кемеровской области Российской Федерации.

Материал и методы. В исследование включены 144 пациента с ВЗК (из них 58 – с БК, 86 – с ЯК) и 44 пациента контрольной группы без патологии желудочно-кишечного тракта. Определяли частоту встречаемости аллелей 3020insC и 2722C гена *CARD15*. Все пациенты принадлежали к русской этнической группе и на момент обследования проживали на территории Кемеровской области. **Результаты.** Среди пациентов с БК частота встречаемости аллеля 3020insC гена *CARD15* была статистически значимо выше по сравнению с таковой у больных ЯК (16 против 3%, $p < 0,001$) и пациентов контрольной группы (5%, $p = 0,04$). Гомозиготный генотип 3020insC/insC встречался только у пациентов с БК. Носительство аллеля 3020insC увеличивало в среднем в 3,5 раза вероятность развития БК (отношение шансов (ОШ) 3,6; 95% доверительный интервал (ДИ) 1,3–10,3) и не

было ассоциировано с увеличением риска развития ЯК (ОШ 0,6; 95% ДИ 0,1–2,5). Частота встречаемости аллеля 3020insC была статистически значимо выше в объединенной группе пациентов с осложненными вариантами БК (стриктурирующими и пенетрирующими) по сравнению с люминальными (79 против 21%, $p = 0,03$) и у пациентов с пенетрирующими формами БК по сравнению с люминальными (50 против 21%, $p = 0,05$). Носительство аллеля 3020insC у пациентов с БК в 3,3 раза увеличивало риск развития пенетрирующих форм заболевания (ОШ 3,3; 95% ДИ 1,8–6,1) и в 14 раз – общий риск развития осложненных вариантов БК (ОШ 14,1; 95% ДИ 7,1–27,9). Частота встречаемости аллеля 2722C у пациентов с БК, ЯК и в контрольной группе не имела статистически значимых различий.

Заключение. Выявление аллеля 3020insC гена *CARD15* среди жителей Кемеровской области Российской Федерации целесообразно для ранней диагностики БК, оценки прогноза риска развития фенотипических вариантов БК, а также при проведении дифференциальной диагностики БК и ЯК.

Ключевые слова: ген *CARD15*, полиморфизм, генетическое тестирование, прогноз, болезнь Крона, язвенный колит

Для цитирования: Кузнецова ДА, Разумов АС, Мерзляков МВ, Вавин ГВ, Репникова РВ. Молекулярно-генетическая диагностика воспалительных заболеваний кишечника. Альманах клинической медицины. 2017;45(5):408–15. doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-5-408-415.

Поступила 11.02.2017; принята к публикации 10.07.2017

¹ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России; 650029, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а, Российская Федерация

² ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С.В. Беляева»; 650066, г. Кемерово, Октябрьский пр-т, 22, Российская Федерация



В первые десятилетия XXI века наблюдается прогрессивное увеличение распространенности воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) во всем мире, в большей степени – в развитых странах и среди молодого трудоспособного населения [1]. При этом до сих пор нет ясного и однозначного представления о патогенезе, эффективных методах ранней диагностики и прогнозирования риска развития и особенностей клинического течения болезни Крона (БК) и язвенного колита (ЯК). Как следствие, пациенты не получают своевременно патогенетически обоснованного лечения, что приводит к глубокой инвалидизации и критическому снижению качества жизни [1, 2].

Традиционные клинические, эндоскопические, гистологические и рентгенологические методы диагностики позволяют, как правило, подтвердить или опровергнуть диагноз, определить степень активности, локализацию и распространенность воспалительного процесса, осуществлять контроль за течением заболевания и эффективностью проводимого лечения, то есть они достаточно объективны и информативны только на стадии развития выраженной клинимо-морфологической картины заболевания, когда многие терапевтические мероприятия оказываются малоэффективными и часто требуется оперативное лечение [3, 4]. Недостаточно информативны для ранней диагностики, дифференциальной диагностики или прогнозирования развития ВЗК и такие инструментальные методы, как ультразвуковое исследование, компьютерная и магнитно-резонансная томография [2].

В последние годы в клиническую практику гастроэнтерологических отделений было внедрено определение серологических биомаркеров – перинуклеарных антинейтрофильных цитоплазматических антител (pANCA) и антител к пекарским дрожжам *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) [5], но и это не способствовало сколько-нибудь значимому улучшению ранней диагностики БК и ЯК, прогнозирования особенностей их клинического течения и эффективности проводимой терапии. Эти исследования действительно обладают достаточно высокой чувствительностью и специфичностью: pANCA определяются в 50–70% случаев при ЯК и 10–25% при БК. Однако метод был разработан и показан в первую очередь для диагностики различных геморрагических васкулитов и других аутоиммунных заболеваний. Его использование для ранней диагностики и прогнозирования развития ВЗК пока весьма проблематично и имеет в основном

вспомогательный характер. То же относится и к определению ASCA, которые встречаются при БК и ЯК в 55–70 и 10–15% случаев соответственно (для сравнения: у здоровых людей – в 1–2% случаев) [5, 6].

Принципиально новый подход к разработке методов ранней диагностики и прогнозирования развития ВЗК наметился после расшифровки генома человека и последовавшего за этим бурного развития функциональной и клинической геномики. Были выявлены более 1500 нуклеотидных полиморфизмов генов (*CARD15*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *CARD9*, *TNF- α* , *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *IL-10*, *IL-4*, *MST1*, *IL-18RAP*, *TGFB1*, *IL-23R*, *STAT3*, *JAK2*, *IL-12 DEFB1*, *VDR*, *TFF1-3*, *MUC2*, *MUC3*, *MUC4*, *ATG16L1*, *IRGM*, *CALCOCO2/NDP52* и др.), ассоциированных с различными звеньями патогенеза БК и ЯК, особенностями их клинического течения и ответом на терапию [7]. В частности, установлено, что из более 60 полиморфизмов гена *CARD15* (*NOD2*) наибольшую диагностическую и прогностическую значимость в развитии БК имеют полиморфизмы G2722C (rs2066845) и 3020insC (rs5743293) [8]. При этом кроме ассоциации с высоким риском развития БК полиморфизм G2722C связан со стриктурирующим вариантом течения БК, требующим оперативного вмешательства, а полиморфизм 3020insC – с острым началом заболевания в молодом возрасте, локализацией воспалительного процесса в подвздошной кишке или в подвздошной кишке в сочетании с толстой, развитием стенозов, пенетраций, ранней необходимостью хирургического лечения и высокой частотой рецидивов [8–10].

Тем не менее многие врачи относятся к проведению генетического тестирования весьма скептически. Это согласуется с позицией Европейской организации по изучению болезни Крона и колита (European Crohn's and Colitis Organisation – ECCO) и Американской гастроэнтерологической ассоциации (American Gastroenterological Association – AGA), которые не рекомендуют использование генетических маркеров в рутинной диагностике и прогнозировании развития БК и ЯК [11–14]. Основная причина – неоднозначность, а нередко и противоречивость данных об ассоциации генетических факторов с развитием ВЗК. Так, полиморфизмы 3020insC и G2722C гена *CARD15* в большинстве стран Европы и Америки ассоциированы с развитием только БК, а в индийской популяции еще и с развитием ЯК. У жителей Японии, Китая и Южной Кореи ассоциации этих полиморфизмов с ВЗК практически отсутствуют [8–10, 15–17]. Более того, популяционные



особенности выявляются не только между странами, но и регионами одной страны. Показано, что носительство аллелей 2722C и 3020insC гена *CARD15* у жителей города Москвы ассоциировано с высоким риском развития БК и ее осложненными вариантами [18], тогда как для жителей Северо-Западного региона России данная ассоциация установлена только для аллеля 3020insC [19]. Таким образом, популяционные особенности генетических полиморфизмов необходимо учитывать при разработке и внедрении молекулярно-генетических методов диагностики и прогнозирования развития БК и ЯК в клиническую практику разных стран, регионов одной страны и даже в пределах одного региона.

В этой связи целью исследования было оценить частоту встречаемости, клинико-диагностическую и прогностическую значимость нуклеотидных полиморфизмов 3020insC и G2722C гена *CARD15* при БК и ЯК в одном из регионов Юго-Западной Сибири – Кемеровской области Российской Федерации.

Материал и методы

В исследование включены 144 пациента основной группы с ВЗК (58 человек с БК и 86 – с ЯК), которые были госпитализированы в гастроэнтерологическое отделение ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница им. С.В. Беляева» в период с января 2014 по июль 2016 года. Контрольную группу составили 44 пациента разных отделений этой больницы (30% – гинекологического отделения, 30% – урологического, 20% – оториноларингологического, 15% – нейрохирургического, 5% – других отделений), у которых на основании анамнеза и клинико-лабораторных исследований полностью исключалась патология желудочно-кишечного тракта. Все пациенты принадлежали к русской этнической группе и на момент обследования проживали на территории Кемеровской области.

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

систематизацию, хранение и использование персональных данных.

Забор крови для генотипирования выполнялся из локтевой вены в одноразовые вакуумные пробирки BD Vacutainer с антикоагулянтом K₃EDTA. ДНК выделяли из лейкоцитов с помощью реагента ДНК-ЭКСПРЕСС-кровь (НПФ «ЛИТЕХ», Россия) согласно инструкции производителя. Полиморфные аллели выявляли методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции (амплификатор BIORAD C1000, США) с использованием наборов SNP-экспресс (НПФ «ЛИТЕХ», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Детекция продуктов амплификации осуществлялась методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле с 1% раствором бромистого этидия с последующей визуализацией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и STATISTICA v.6.1 (Statsoft Inc., США), онлайн-калькуляторов VassarStats (<http://www.vassarstats.net/odds2x2.html>) и Hardy-Weinberg Equilibrium Calculator for 2 Alleles (<http://www.had2know.com/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-2-alleles.html>). В основной и контрольной группах рассчитывали соответствие соотношения частот аллелей равновесию Харди – Вайнберга с помощью критерия χ^2 , отношение шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ). Критическим уровнем статистической значимости принимали значение $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Распределение аллелей и генотипов полиморфизмов 3020insC и G2722C гена *CARD15* в обеих группах соответствовало уравнению Харди – Вайнберга. Частота встречаемости аллеля 3020insC гена *CARD15* среди пациентов с БК была в среднем в 3,2 раза выше, а у пациентов с ЯК – в 1,7 раза ниже по сравнению с контрольной группой (табл. 1). При этом у пациентов с БК частота аллеля 3020insC была в 5,3 раза выше, чем у больных с ЯК, а гомозиготный генотип 3020insC/insC встречался только среди пациентов с БК.

Установлено, что носительство аллеля 3020insC у жителей Кемеровской области практически в 3,5 раза повышает риск развития БК (16 и 5% соответственно, ОШ 3,6; 95% ДИ 1,3–10,3), при этом значимо не ассоциировано с увеличением риска развития ЯК (3 и 5% соответственно, ОШ 0,6; 95% ДИ 0,1–2,5). Полученные результаты

**Таблица 1.** Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфизмов 3020insC и G2722C гена *CARD15* в Кемеровской области Российской Федерации

Полиморфизм	Частота встречаемости, n (%)			Значение <i>p</i>		
	БК (n=58)	ЯК (n=86)	К (n=44)	БК и К	ЯК и К	БК и ЯК
3020insC						
генотип						
-/-	44 (76)	81 (94)	40 (91)	0,02	0,3	< 0,001
-/3020insC	9 (15,5)	5 (6)	4 (9)	0,2	0,3	0,04
3020insC/3020insC	5 (8,5)	0	0	0,03	0,5	< 0,001
аллели						
-	97 (84)	167 (97)	84 (95)	0,04	0,3	< 0,001
3020insC	19 (16)	5 (3)	4 (5)			
G2722C						
генотип						
G/G	58 (100)	86 (100)	42 (95,5)	0,06	0,06	0,5
G/C	0	0	2 (4,5)	0,06	0,06	0,5
C/C	0	0	0	0,5	0,5	0,5
аллели						
G	116 (100)	172 (100)	86 (98)	0,1	0,09	0,5
C	0	0	2 (2)			

БК – пациенты с болезнью Крона, ЯК – пациенты с язвенным колитом, К – пациенты контрольной группы

Таблица 2. Гендерные особенности распространенности аллеля 3020insC гена *CARD15* в популяции Кемеровской области Российской Федерации

Группы	Общая группа, n (%)			Носители аллеля 3020insC, n (%)			Значение <i>p</i> *
	ж	м	всего	ж	м	всего	
Болезнь Крона	29 (50)	29 (50)	58 (100)	9 (64)	5 (36)	14 (24)	0,1
Язвенный колит	48 (56)	38 (44)	86 (100)	2 (40)	3 (60)	5 (6)	0,5
Контроль	23 (52)	21 (48)	44 (100)	2 (50)	2 (50)	4 (9)	0,5

ж – женщины, м – мужчины

* Статистическая значимость различий между женщинами и мужчинами в группе с носительством аллеля 3020insC гена *CARD15*

свидетельствуют о клиничко-патогенетической значимости носительства данного аллеля в развитии БК. При наличии полиморфизма 3020insC, обусловленного вставкой цитидилового нуклеотида в положение 3020 гена *CARD15*, происходит

сдвиг рамки считывания, образование преждевременного стоп-кодона и синтез укороченного на 33 аминокислотных остатка функционально неактивного белка *CARD15* [20]. В результате снижается эффективность распознавания

**Таблица 3.** Частота встречаемости полиморфизма 3020insC гена *CARD15* в зависимости от фенотипического варианта болезни Крона

Фенотипический вариант	Частота встречаемости полиморфизма 3020insC, n (%)	
	нет носительства (n = 44)	носители (n = 14)
V1 (люминальный)	19 (43)	3 (21)
V2 (стриктурирующий)	15 (34)	4 (29)
V3 (пенетрирующий)	10 (23)	7 (50)*
V2 + V3 (осложненная форма)	25 (57)	11 (79)**

*p = 0,05 при сравнении между пенетрирующей и люминальной формами болезни Крона

**p = 0,03 при сравнении между осложненной и люминальной формами болезни Крона

рецептором NOD2 бактериальных патогенов, что влечет за собой уменьшение резистентности местного иммунитета кишечника к собственной микрофлоре, снижение внутриклеточной бактерицидности, возникновение хронической внутриклеточной инфекции и в конечном итоге – развитие БК [20, 21]. Наряду с этим при наличии полиморфизма 3020insC в сочетании с другими генетическими и определенными средовыми факторами формируются дополнительные звенья патогенеза БК, в частности, снижается противовоспалительная активность цитокина IL-10 и эффективность аутофагии, особенно при наличии полиморфизма T300A гена *ATG16L1* [22].

Схожие результаты были получены Ю.А. Насыховой и соавт. для жителей Северо-Западного региона России. Однако в этой популяции частота встречаемости аллеля 3020insC гена *CARD15* у пациентов с БК и в контрольной группе была почти вдвое меньше (8,8 и 2,9% соответственно), чем в Кемеровской области, а у пациентов с ЯК носительство аллеля 3020insC не выявлено [19].

На основании этих данных можно заключить, что в отдельных регионах России, несмотря на их географическую разобщенность и различную распространенность аллеля 3020insC гена *CARD15*, его носительство имеет диагностическую и прогностическую значимость при БК и не обладает таковой при ЯК.

Статистически значимых различий частоты встречаемости аллеля 3020insC гена *CARD15* среди мужчин и женщин с ЯК и БК нами не выявлено (табл. 2). Тем не менее при БК отмечена тенденция к увеличению распространенности данного

аллеля среди женщин: в среднем вдвое выше, чем у мужчин (64 и 36% соответственно, $p = 0,1$). Для определения наличия/отсутствия связи данного показателя с полом необходимо большее число наблюдений.

Как видно из данных табл. 3, носительство аллеля 3020insC гена *CARD15* ассоциировано с особенностями клинического течения БК, а именно с развитием ее осложненных форм. Частота встречаемости аллеля 3020insC была в 3,7 раза выше в объединенной группе пациентов с осложненными вариантами (стриктурирующими и пенетрирующими) по сравнению с пациентами с люминальными формами БК ($p = 0,03$). При этом частота аллеля 3020insC у пациентов с пенетрирующими вариантами БК была в 2,5 раза выше, чем у больных с люминальными формами ($p = 0,05$) и статистически значимо не отличалась от таковой у пациентов со стриктурирующими вариантами БК (50 и 29% соответственно). Носительство аллеля 3020insC у пациентов с БК в 3,3 раза увеличивало риск развития пенетрирующих форм заболевания (ОШ 3,3; 95% ДИ 1,8–6,1) и в 14 раз – общий риск развития осложненных вариантов БК (ОШ 14,1; 95% ДИ 7,1–27,9). Среди пациентов, не имеющих аллель 3020insC, стриктурирующие и пенетрирующие варианты БК встречались соответственно в 1,3 и 1,9 раза реже по сравнению с люминальными, что, с одной стороны, свидетельствует о патогенетической значимости аллеля 3020insC в развитии по крайней мере некоторых вариантов БК, а с другой – о генетической гетерогенности фенотипических вариантов болезни Крона.

Среди пациентов с ЯК статистически значимых различий между носительством аллеля 3020insC гена *CARD15* и особенностями клинического течения заболевания не обнаружено.

Аллель 2722C гена *CARD15* у пациентов с БК и ЯК – жителей Кемеровской области – не выявлен, хотя в данной выборке он встречался у двух пациентов контрольной группы (см. табл. 1). Возможно, это связано с тем, что носительство аллеля 2722C, обусловленное миссенс-мутацией с заменой глицина на аргинин в 908-м положении белка, приводит только к снижению функциональной активности белка *CARD15*, в отличие от носительства аллеля 3020insC, когда синтезируется функционально неактивный белок [20–22]. Принимая во внимание, что аналогичные результаты были получены для Северо-Западного региона России, а также для Японии, Китая и Южной Кореи, можно заключить: аллель 2722C не обладает клинико-диагностической



и прогностической значимостью в развитии ВЗК в странах восточно-азиатского региона и в некоторых российских регионах, а значит, включение его в список полиморфизмов для ранней диагностики и прогнозирования развития ВЗК в данных популяциях можно признать необоснованным.

Заключение

Частота встречаемости, клинико-диагностическая и прогностическая значимость различных полиморфизмов – 3020insC и G2722C – одного и того же гена *CARD15* в Кемеровской области Российской Федерации имеют существенные различия. Носительство аллеля 3020insC, особенно гомозиготное, ассоциировано с высоким риском развития БК, включая осложненные варианты течения заболевания, в особенности пенетрирующие формы, и не влияет на риск развития и клиническое течение ЯК. Выявление аллеля 3020insC гена *CARD15* среди жителей Кемеровской области представляется целесообразным для ранней диагностики БК, оценки прогноза риска развития фенотипических вариантов БК, а также при проведении дифференциальной диагностики БК и ЯК.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Носительство аллеля 2722C гена *CARD15* не ассоциировано с риском развития и особенностями клинического течения БК и ЯК, вследствие чего его выявление для оценки различных аспектов развития ВЗК среди жителей Кемеровской области представляется не обоснованным.

В согласительных документах ECCO и AGA по диагностике ВЗК использование генотипирования в клинической практике пока не рекомендовано по причине недостаточной доказательной базы, тем не менее мы считаем перспективным дальнейшее изучение особенностей распространенности и прогностической значимости полиморфизмов 3020insC и G2722C гена *CARD15*, а также других нуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с ВЗК. Полученная в ходе таких исследований информация может быть использована для создания международных генетических баз данных о популяционных особенностях частоты встречаемости, патогенетической, клинико-диагностической и прогностической значимости полиморфизмов, ассоциированных с ВЗК, что позволит в дальнейшем разработать способы повышения объективности и информативности диагностики и прогнозирования развития БК и ЯК с применением молекулярно-генетических технологий. ©

Литература

- Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(12):720–7. doi: 10.1038/nrgastro.2015.150.
- Tontini GE, Vecchi M, Pastorelli L, Neurath MF, Neumann H. Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: state of the art and future perspectives. *World J Gastroenterol.* 2015;21(1):21–46. doi: 10.3748/wjg.v21.i1.21.
- Lee JM, Lee KM. Endoscopic diagnosis and differentiation of inflammatory bowel disease. *Clin Endosc.* 2016;49(4):370–5. doi: 10.5946/ce.2016.090.
- Magro F, Langner C, Driessen A, Ensari A, Geboes K, Mantzaris GJ, Villanacci V, Becheanu G, Borralho Nunes P, Cathomas G, Fries W, Jouret-Mourin A, Mescoli C, de Petris G, Rubio CA, Shepherd NA, Vieth M, Eliakim R; European Society of Pathology (ESP); European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis.* 2013;7(10):827–51. doi: 10.1016/j.crohns.2013.06.001.
- Mokhtarifar A, Ganji A, Sadrneshin M, Bahari A, Esmailzadeh A, Ghafarzadegan K, Nikpour S. Diagnostic Value of ASCA and atypical p-ANCA in differential diagnosis of inflammatory bowel disease. *Middle East J Dig Dis.* 2013;5(2):93–7.
- Savidge J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, Hagen EC, Jayne D, Jennette JC, Paspaliaris B, Pollock W, Pusey C, Savage CO, Silvestrini R, van der Woude F, Wieslander J, Wiik A. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol.* 1999;111(4):507–13.
- Liu TC, Stappenbeck TS. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Pathol.* 2016;11:127–48. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044152.
- Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2002;122(4):854–66. doi: https://doi.org/10.1053/gast.2002.32413.
- Nasir BF, Griffiths LR, Nasir A, Roberts R, Barclay M, Geary RB, Lea RA. An envirogenomic signature is associated with risk of IBD-related surgery in a population-based Crohn's disease cohort. *J Gastrointest Surg.* 2013;17(9):1643–50. doi: 10.1007/s11605-013-2250-1.
- Serbati N, Badre W, Diakite B, Nadifi S. NOD2/CARD15 gene influences disease behaviour but not IBD susceptibility in a Moroccan population. *Turk J Gastroenterol.* 2014;25 Suppl 1:122–8. doi: 10.5152/tjg.2014.3870.
- Gomollón F, Dignass A, Anness V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, Peyrin-Biroulet L, Cullen GJ, Daperno M, Kucharzik T, Rieder F, Almer S, Armuzzi A, Harbord M, Langhorst J, Sans M, Chowers Y, Fiorino G, Juillerat P, Mantzaris GJ, Rizzello F, Vavricka S, Gionchetti P; ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis.* 2017;11(1):3–25.
- Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, Burisch J, Gecse KB, Hart AL, Hindryckx P, Langner C, Limdi JK, Pellino G, Zagórowicz E, Raine T, Harbord M, Rieder F; European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO]. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis.* 2017;11(6):649–70. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx008.



13. Sandborn WJ. Crohn's disease evaluation and treatment: clinical decision tool. *Gastroenterology*. 2014;147(3):702–5. doi: 10.1053/j.gastro.2014.07.022.
14. Dassopoulos T, Cohen RD, Scherl EJ, Schwartz RM, Kosinski L, Regueiro MD. Ulcerative colitis care pathway. *Gastroenterology*. 2015;149(1):238–45. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.036.
15. Pugazhendhi S, Santhanam S, Venkataraman J, Creveaux I, Ramakrishna BS. NOD2 gene mutations associate weakly with ulcerative colitis but not with Crohn's disease in Indian patients with inflammatory bowel disease. *Gene*. 2013;512(2):309–13. doi: 10.1016/j.gene.2012.10.015.
16. Guo QS, Xia B, Jiang Y, Qu Y, Li J. NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in Chinese patients of Han nationality. *World J Gastroenterol*. 2004;10(7):1069–71. doi: 10.3748/wjg.v10.i7.1069.
17. Kim ES, Kim WH. Inflammatory bowel disease in Korea: epidemiological, genomic, clinical, and therapeutic characteristics. *Gut Liver*. 2010;4(1):1–14. doi: 10.5009/gnl.2010.4.1.1.
18. Лоранская ИД, Степанова ЕВ, Халиф ИЛ, Михайлова ТЛ, Щагина ОА, Кадникова ВА, Поляков АВ. Клинико-генетическая ассоциация болезни Крона и полиморфных вариантов гена NOD2/CARD15. *Медицинская генетика*. 2008;7(9):40–4.
19. Насыхова ЮА, Семенов НВ, Харитонов АГ, Иващенко ТЭ, Барановский АЮ, Баранов ВС. Анализ полиморфизма генов NOD2/CARD15 и TNF-а у пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями желудочно-кишечного тракта. *Молекулярная медицина*. 2010;(3):32–7.
20. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):599–603. doi: 10.1038/35079107.
21. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):603–6. doi: 10.1038/35079114.
22. Biswas A, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS. Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(1):15–24. doi: 10.1007/s00109-011-0802-y.

References

1. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(12):720–7. doi: 10.1038/nrgastro.2015.150.
2. Tontini GE, Vecchi M, Pastorelli L, Neurath MF, Neumann H. Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: state of the art and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 2015;21(1):21–46. doi: 10.3748/wjg.v21.i1.21.
3. Lee JM, Lee KM. Endoscopic diagnosis and differentiation of inflammatory bowel disease. *Clin Endosc*. 2016;49(4):370–5. doi: 10.5946/ce.2016.090.
4. Magro F, Langner C, Driessen A, Ensari A, Geboes K, Mantzaris GJ, Villanacci V, Becheanu G, Borralho Nunes P, Cathomas G, Fries W, Joret-Mourin A, Mescoli C, de Petris G, Rubio CA, Shepherd NA, Vieth M, Eliakim R; European Society of Pathology (ESP); European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2013;7(10):827–51. doi: 10.1016/j.crohns.2013.06.001.
5. Mokhtarifar A, Ganji A, Sadrinesh M, Bahari A, Esmailzadeh A, Ghafarzadegan K, Nikpour S. Diagnostic Value of ASCA and atypical p-ANCA in differential diagnosis of inflammatory bowel disease. *Middle East J Dig Dis*. 2013;5(2):93–7.
6. Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, Hagen EC, Jayne D, Jennette JC, Paspaliaris B, Pollock W, Pusey C, Savage CO, Silvestrini R, van der Woude F, Wieslander J, Wiik A. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol*. 1999;111(4):507–13.
7. Liu TC, Stappenbeck TS. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Pathol*. 2016;11:127–48. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044152.
8. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122(4):854–66. doi: https://doi.org/10.1053/gast.2002.32413.
9. Nasir BF, Griffiths LR, Nasir A, Roberts R, Barclay M, Gearty RB, Lea RA. An envirogenomic signature is associated with risk of IBD-related surgery in a population-based Crohn's disease cohort. *J Gastrointest Surg*. 2013;17(9):1643–50. doi: 10.1007/s11605-013-2250-1.
10. Serbati N, Badre W, Diakite B, Nadifi S. NOD2/CARD15 gene influences disease behaviour but not IBD susceptibility in a Moroccan population. *Turk J Gastroenterol*. 2014;25 Suppl 1:122–8. doi: 10.5152/tjg.2014.3870.
11. Gomollón F, Dignass A, Anness V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, Peyrin-Biroulet L, Cullen GJ, Daperno M, Kucharzik T, Rieder F, Almer S, Armuzzi A, Harbord M, Langhorst J, Sans M, Chowers Y, Fiorino G, Juillerat P, Mantzaris GJ, Rizzello F, Vavricka S, Gionchetti P; ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis*. 2017;11(1):3–25.
12. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, Burisch J, Gecse KB, Hart AL, Hindryckx P, Langner C, Limdi JK, Pellino G, Zagórowicz E, Raine T, Harbord M, Rieder F; European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO]. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis*. 2017;11(6):649–70. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx008.
13. Sandborn WJ. Crohn's disease evaluation and treatment: clinical decision tool. *Gastroenterology*. 2014;147(3):702–5. doi: 10.1053/j.gastro.2014.07.022.
14. Dassopoulos T, Cohen RD, Scherl EJ, Schwartz RM, Kosinski L, Regueiro MD. Ulcerative colitis care pathway. *Gastroenterology*. 2015;149(1):238–45. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.036.
15. Pugazhendhi S, Santhanam S, Venkataraman J, Creveaux I, Ramakrishna BS. NOD2 gene mutations associate weakly with ulcerative colitis but not with Crohn's disease in Indian patients with inflammatory bowel disease. *Gene*. 2013;512(2):309–13. doi: 10.1016/j.gene.2012.10.015.
16. Guo QS, Xia B, Jiang Y, Qu Y, Li J. NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in Chinese patients of Han nationality. *World J Gastroenterol*. 2004;10(7):1069–71. doi: 10.3748/wjg.v10.i7.1069.
17. Kim ES, Kim WH. Inflammatory bowel disease in Korea: epidemiological, genomic, clinical, and therapeutic characteristics. *Gut Liver*. 2010;4(1):1–14. doi: 10.5009/gnl.2010.4.1.1.
18. Лоранская ИД, Степанова ЕВ, Халиф ИЛ, Михайлова ТЛ, Щагина ОА, Кадникова ВА, Поляков АВ. Clinical genetic association of Crohn's



- disease with NOD2/CARD 15 gene variants. *Medical Genetics*. 2008;7(9):40–4. Russian.
19. Nasykhova YuA, Semenov NV, Kharitonov AG, Ivashchenko TE, Baranovsky AY, Baranov VS. Analysis of polymorphism of NOD2/CARD15 and TNFA genes in patients with chronic inflammatory bowel diseases. *Molecular medicine*. 2010;(3):32–7. Russian.
20. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Mo-

- rain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):599–603. doi: 10.1038/35079107.
21. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM,

- Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):603–6. doi: 10.1038/35079114.
22. Biswas A, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS. Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(1):15–24. doi: 10.1007/s00109-011-0802-y.

Molecular and genetic diagnostics of inflammatory bowel diseases

Kuznetsova D.A.^{1,2} • Razumov A.S.¹ • Merzlyakov M.V.² • Vavin G.V.² • Repnikova R.V.¹

Background: In the last two decades, more attention has been paid to the development and implementation of molecular and genetic technologies for the diagnosis and prediction of the development and course of inflammatory bowel diseases (IBD). However, the published evidence on their diagnostic significance are rather controversial and equivocal that may be explained by some characteristics of their frequencies, differences in pathogenetic, clinical and diagnostic values of the genetic polymorphisms in various countries and regions. **Aim:** To evaluate the frequency, clinical, diagnostic, and prognostic significance of the 3020insC and G2722C nucleotide polymorphisms of the *CARD15* (*NOD2*) gene in Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) in the Kemerovo Region of the Russian Federation. **Materials and methods:** The study included 144 patients with IBD (58 with CD, 86 with UC), and 44 patients without any gastrointestinal tract disorders in the control group. The 3020insC and 2722C allelic frequencies of the *CARD15* gene were determined. All patients were of the Russian ethnicity and were living in the territory of the Kemerovo Region at the time of the study. **Results:** The frequency of the 3020insC allele of the *CARD15* gene in CD patients was significantly higher than in those with UC (16% vs 3%, $p < 0.001$) and in the control group (5%, $p = 0.04$). The homozygous genotype of 3020insC/insC was found only in the CD patients. The carriage of the 3020insC allele was associated with an average 3.5-fold increase of the probability of CD development (odds ratio [OR] 3.6; 95% confidential interval [CI]: 1.3–10.3)

and was not significantly linked to an increased risk of UC (OR 0.6; 95% CI: 0.1–2.5). The 3020insC allelic frequency in the pooled group of the patients with complicated CD variants (with stricture formation and penetrative) was significantly higher, compared to those with the luminal forms (79% vs 21%, $p = 0.03$) and with the penetrative CD forms compared to the luminal (50% vs 21%, $p = 0.05$). The 3020insC allele carriage in the CD patients was associated with a 3.3-fold increase in the risk of the penetrative forms of the disease (OR 3.3; 95% CI: 1.8–6.1) and with a 14-fold increase of the overall risk of the complicated CD variants (OR 14.1; 95% CI: 7.1–27.9). The 2722C allelic frequency in CD and UC patients and in the control group were not significantly different. **Conclusion:** The detection of the 3020insC allele of the *CARD15* gene in the Kemerovo Region of the Russian Federation is appropriate for the early CD diagnosis, assessment of the prognosis for the risk of development of CD phenotypic variants, as well as for the differential diagnosis between CD and UC.

Key words: *CARD15* gene, polymorphism, genetic testing, prognosis, Crohn's disease, ulcerative colitis

For citation: Kuznetsova DA, Razumov AS, Merzlyakov MV, Vavin GV, Repnikova RV. Molecular and genetic diagnostics of inflammatory bowel diseases. *Almanac of Clinical Medicine*. 2017;45(5):408–15. doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-5-408-415.

Received 11 February 2017; Accepted 10 July 2017

Kuznetsova Daria A. – MD, Postgraduate Student, Chair of Pathophysiology, Medical and Clinical Biochemistry¹, Doctor of Immunology Laboratory²
✉ 22 Oktyabr'skiy prospekt, Kemerovo, 650066, Russian Federation. Tel.: +7 (923) 497 21 10. E-mail: lariwar@mail.ru

Razumov Aleksandr S. – MD, PhD, Professor, Chair of Pathophysiology, Medical and Clinical Biochemistry¹

Merzlyakov Mikhail V. – MD, PhD, Head of the Department of Endoscopy²

Vavin Grigoriy V. – MD, PhD, Deputy Head Physician on Laboratory Diagnostics²

Repnikova Renata V. – MD, PhD, Professor, Chair of Therapy, Occupational Pathology and Endocrinology¹

¹ Kemerovo State Medical University; 22a Voroshilova ul., Kemerovo, 650029, Russian Federation

² Kemerovo Regional Clinical Hospital; 22 Oktyabr'skiy prospekt, Kemerovo, 650066, Russian Federation

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.