



Кастюкевич Л.И.¹ ✉, Романова О.Н.¹, Михаленко Е.П.², Мазур О.Ч.², Малышева О.М.², Коломиец Н.Д.³, Назаренко О.Н.¹, Манкевич Р.Н.¹, Русикевич С.С.¹, Бобровнический В.В.¹, Савицкий Д.В.⁵, Волошко Т.И.⁵, Мараховский К.Ю.⁴, Кильчевский А.В.²

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

³ Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

⁴ Республиканский научно-практический центр детской хирургии, Минск, Беларусь

⁵ Городская детская инфекционная клиническая больница, Минск, Беларусь

Молекулярно-генетический анализ пациентов детского возраста с воспалительными заболеваниями кишечника

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Кастюкевич Л.И. – концепция и дизайн исследования, сбор материала, анализ данных, написание и окончательное редактирование текста; Романова О.Н., Коломиец Н.Д., Назаренко О.Н., Манкевич Р.Н., Бобровнический В.В., Мараховский К.Ю., Кильчевский А.В. – концепция, обсуждение результатов, окончательное редактирование; Михаленко Е.П. – анализ данных и обсуждение результатов; Мазур О.Ч., Малышева О.М. – проведение секвенирования и анализ данных; Русикевич С.С., Савицкий Д.В., Волошко Т.И. – сбор и обработка литературных источников.

Для цитирования: Кастюкевич Л.И., Романова О.Н., Михаленко Е.П., Мазур О.Ч., Малышева О.М., Коломиец Н.Д., Назаренко О.Н., Манкевич Р.Н., Русикевич С.С., Бобровнический В.В., Савицкий Д.В., Волошко Т.И., Мараховский К.Ю., Кильчевский А.В. Молекулярно-генетический анализ пациентов детского возраста с воспалительными заболеваниями кишечника. *Педиатрия Восточная Европа*. 2024;12(4):542–554. <https://doi.org/10.34883/PI.2024.12.4.002>

Подана: 16.08.2024

Принята: 20.11.2024

Контакты: lkmat@tut.by

Резюме

Введение. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это обобщающий термин для хронических воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта. По гистопатологическим признакам основными типами ВЗК являются болезнь Крона (БК), язвенный колит (ЯК) и неопределенный колит (НК), заболеваемость которыми в последнее время растет во всем мире. ВЗК относят к полигенным заболеваниям с хроническим и рецидивирующим течением, сопровождающимся болями в животе, диареей, кровотечением, нарушением всасывания.

Цель. Провести анализ нуклеотидной последовательности генов, ассоциированных с развитием ВЗК, у пациентов детского возраста с использованием метода полноэкзомного секвенирования.

Материалы и методы. Проведен анализ данных полноэкзомного секвенирования 46 пациентов с ВЗК. Оценку патогенности выявленных вариантов нуклеотидной последовательности проводили согласно критериям, рекомендованным в Руководстве по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного

секвенирования. Все расчеты проводились в статистическом пакете R, версия 4.1. Результаты анализа считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. По результатам молекулярно-генетического анализа у 35 (76,1%) пациентов с диагнозом ВЗК было определено носительство гетерозиготных вариантов с патогенным значением либо вариантов с неопределенной значимостью в генах, ассоциированных с ВЗК и метаболическими заболеваниями. Около 70% выявленных в нашем исследовании вариантов являются общими как для пациентов с БК, так и для пациентов с ЯК, что подчеркивает значительное генетическое перекрытие при этих заболеваниях. В нашем исследовании мутации в генах CFTR, ITK, NOD2, PIK3CD, STXBP2 были общими как для пациентов с ЯК, так и для пациентов с БК; в генах COL7A1, KAT6A, PMM2, SI – как для пациентов с ЯК, так и для пациентов с НК, а в гене UNC13D – для пациентов с ЯК, БК и НК. Варианты с патогенным клиническим значением выявлены у 6 (40,0%) пациентов с ЯК, у 2 (15,4%) – с БК и 4 (57,1%) – с НК.

Заключение. Молекулярные методы могут стать важным диагностическим инструментом при обследовании детей с ВЗК, особенно это касается пациентов с очень ранним началом и тяжелыми фенотипами заболевания. Мы предполагаем, что при некоторых ВЗК гетерозиготные варианты в генах, которые, как считается, вызывают ВЗК посредством аутосомно-рецессивного наследования, могут способствовать клинической картине.

Ключевые слова: болезнь Крона, воспалительные заболевания кишечника, генетические мутации, неопределенный колит, первичный иммунодефицит, язвенный колит

Kastsiukevich L.¹ ✉, Romanova O.¹, Mikhalenko A.², Mazur O.², Malyshava V.², Kolomiets N.³, Nazarenko O.¹, Mankevich R.¹, Rusikevich S.¹, Babraunichy V.¹, Savitski D.⁵, Valoshka T.⁵, Marakhovsky K.⁴, Kilchevsky A.²

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

³ Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

⁴ Republican Scientific and Practical Center of Pediatric Surgery, Minsk, Belarus

⁵ City Children's Infectious Diseases Clinical Hospital, Minsk, Belarus

Molecular Genetic Analysis in Pediatric Patients with Inflammatory Intestinal Diseases

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Kastsiukevich L. – study concept and design, material collection, data analysis, text writing and final editing; Romanova O., Kolomiets N., Nazarenko O., Mankevich R., Babraunichy V., Marakhovsky K., Kilchevsky A. – concept, results discussing, final editing; Mikhalenko A. – data analysis and results discussing; Mazur O., Malyshava V. – sequencing and data analysis; Rusikevich S., Savitski D., Valoshka T. – literary sources collecting and processing.

For citation: Kastsiukevich L., Romanova O., Mikhalenko A., Mazur O., Malyshava V., Kolomiets N., Nazarenko O., Mankevich R., Rusikevich S., Babraunichy V., Savitski D., Valoshka T., Marakhovsky K., Kilchevsky A. Molecular Genetic Analysis in Pediatric Patients with Inflammatory Intestinal Diseases. *Pediatrics Eastern Europe*. 2024;12(4):542–554. <https://doi.org/10.34883/PI.2024.12.4.002> (In Russ.)

Submitted: 16.08.2024

Accepted: 20.11.2024

Contacts: lkmat@tut.by

Abstract

Introduction. Inflammatory bowel disease (IBD) is a general term for chronic inflammatory gastrointestinal conditions. According to histopathological features, the main types of IBD are Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC) and indeterminate colitis (IC), the incidence of which has recently been increasing worldwide. IBD is classified as a polygenic disease with chronic and recurrent courses, accompanied by abdominal pain, diarrhea, bleeding, and malabsorption.

Purpose. To analyze the nucleotide sequence of genes associated with IBD in pediatric patients using the whole exome sequencing.

Materials and methods. The analysis of whole-exome sequencing findings of 46 IBD patients was performed. The pathogenicity of the identified nucleotide sequence variants was assessed according to the criteria recommended in the Guide to Interpretation of Data Obtained by Massively Parallel Sequencing Methods. All calculations were performed in the R statistical package, version 4.1. The analysis results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. According to the results of molecular genetic analysis, 35 (76.1%) patients diagnosed with IBD were found to be carriers of heterozygous variants with pathogenic significance or variants with uncertain significance in genes associated with IBD and metabolic disorders. Nearly 70% of the variants identified in our study were common to both CD and UC patients, thus emphasizing a significant genetic overlap in these diseases. In our study, mutations in the CFTR, ITK, NOD2, PIK3CD, STXBP2 genes were common to

both UC and CD patients; in the COL7A1, KAT6A, PMM2, SI genes to both UC and IC, and in the UNC13D gene to UC, CD, and IC. Variants with pathogenic clinical significance were identified in 6 (40.0%) patients with UC, 2 (15.4%) with CD, and 4 (57.1%) with IC.

Conclusion. Molecular methods may become important diagnostic tools in IBD children screening, especially in those with very early onset and severe disease phenotypes. We hypothesize that in some IBDs, heterozygous variants in genes thought to cause IBD via autosomal recessive inheritance may contribute to the clinical picture.

Keywords: Crohn's disease, inflammatory bowel disease, genetic mutations, indeterminate colitis, primary immunodeficiency, ulcerative colitis

■ ВВЕДЕНИЕ

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – обобщающий термин для хронических воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). По гистопатологическим признакам основными типами ВЗК являются болезнь Крона (БК), язвенный колит (ЯК) и неопределенный колит (НК), заболеваемость которыми в последнее время растет во всем мире [1]. Несмотря на имеющийся прогресс в лечении, многие вопросы, связанные с диагностикой и лечением ВЗК, еще требуют ответов. Ряд исследований позволяет предположить, что индивидуальные генетические особенности способствуют восприимчивости организма к ВЗК [2]. Например, колит является относительно неспецифическим фенотипом ВЗК, он может возникать в результате изменений в генах, влияющих как на адаптивную, врожденную иммунную систему, так и на функцию эпителиальных клеток, что приводит к воспалению кишечника [2]. Недостаточная изученность этиологической структуры и факторов риска развития ВЗК – основная причина, по которой неспецифические колиты занимают особую позицию в структуре заболеваемости в детском возрасте. До 15–20% пациентов с манифестацией ВЗК до 6 лет имеют моногенный дефект. ВЗК описываются как сложные многофакторные заболевания, при которых важную роль играет сочетание дисрегуляции иммунного ответа, микробиома кишечника, генетических особенностей пациента и факторов окружающей среды [3].

ВЗК у детей проявляются различными характеристиками фенотипа, тяжести течения и семейного анамнеза. На сегодня актуальны исследования различий в клинике и симптоматике ВЗК с дебютом в детстве и во взрослом состоянии, в связи с которыми продолжается поиск генов предрасположенности к развитию БК и ЯК, причинных генов ВЗК-подобных моногенных заболеваний.

Известно, что ЖКТ является крупнейшим лимфоидным органом в организме человека и содержит множество различных типов клеток: энтероциты, клетки Панета, бокаловидные, энтероэндокринные, Т- и В-клетки, а также макрофаги, которые постоянно сталкиваются с антигенами в виде пищи и бактерий [4]. Поэтому для поддержания гомеостаза существует жесткая регуляция иммунных реакций в кишечнике. Как только начинается воспаление, наличие мутаций в генах играет роль в поддержании воспалительной реакции, обусловленной нарушением провоспалительных и противовоспалительных сигнальных систем. У здорового ребенка эти триггеры окружающей среды приводят к самоограниченной активации иммунной системы слизистой оболочки. Но в сочетании со специфическими поломками в генах эти триггеры

приводят к хронической активации иммунной системы слизистых оболочек, которая клинически проявляется как ВЗК. Каждый из подтипов будет иметь различный генетический и экологический профиль, вероятно, обусловленный бактериальной флорой в кишечнике, но все они будут вызывать примерно одинаковые симптомы.

Следует отметить, что ВЗК с ранним началом имеет уникальные характеристики фенотипа, тяжесть течения, отсутствие ответа на терапию, что наталкивает на поиск локусов генов, которые могут быть специфичными для заболевания с ранним началом.

В последние десятилетия открытия в молекулярной генетике, создание новых методов молекулярно-генетического исследования помогают решить ряд вопросов этиологии, патогенеза, ранней диагностики и профилактики заболеваний кишечника. Актуальными методами исследования генетической природы ВЗК являются секвенирование по Сенгеру и NGS (Next Generation Sequencing – «секвенирование нового поколения»), включающее полное секвенирование генома, экзона и таргетные панели [5].

В настоящее время доказано, что ВЗК являются полигенными заболеваниями с набором сложных генетических признаков. Полногеномные ассоциативные исследования (Genome-Wide Association Studies, GWAS) расширили число генетических факторов, участвующих в патогенезе ВЗК, и теперь включают локусы, мутации в которых приводят к развитию клинической картины, аналогичной ВЗК, и часть из них ассоциированы с врожденными дефектами иммунной системы.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести анализ нуклеотидной последовательности генов, ассоциированных с развитием ВЗК, у пациентов детского возраста с использованием метода полноэкзомного секвенирования.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мы наблюдали 46 пациентов с манифестацией ВЗК в возрасте до 18 лет включительно, находившихся на лечении в Городской детской инфекционной клинической больнице, 4-й городской детской клинической больнице, Республиканском научно-практическом центре детской хирургии г. Минска в период с 2016 по 2023 г. Исследование утверждено этическим комитетом Городской детской инфекционной клинической больницы г. Минска. Информированное согласие на участие в исследовании было подписано законными представителями пациентов.

Пациенты были стратифицированы по возрасту согласно классификации, предложенной Северо-Американским обществом детской гастроэнтерологии, гепатологии и питания, с изложением позиции по оценке и лечению пациентов с ВЗК [6, 7]. По морфологическим критериям диагноз ЯК был установлен у 26 (56,5%) пациентов, БК – у 13 (28,3%) и НК – у 7 (15,2%) пациентов. Гендерное соотношение составило 3:2: мальчиков – 56,5% (n=26), девочек – 43,5% (n=20) (табл. 1).

Полноэкзомное секвенирование выполнено в лабораториях компании Invatae, США, Центра геномики и транскриптомики ООО CeGaT, GmbH и в лаборатории экологической генетики и биотехнологии Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Для фильтрации результатов секвенирования была разработана таргетная фильтр-панель, в основе которой была использована классификация ПИД у детей,

Таблица 1
Распределение пациентов по возрастным группам
Table 1
Distribution of patients by age groups

Возраст, n	ВЗК			Всего ВЗК
	ЯК	БК	НК	
Первые 27 дней (<28 дней)	1	0	0	1
28 дней – 24 месяца	15	4	4	23
25 месяцев – 72 месяца	7	4	2	13
73 месяца – 120 месяцев	1	0	1	2
121 месяц – 204 месяца	2	5	0	7
Всего	15	13	7	46

предложенная Международным союзом иммунологических обществ [8]. Также были применены фильтр-панели по генам, ассоциированным с ВЗК, энтеропатиями и метаболическими заболеваниями (клинически проявляющимися как ВЗК).

Выявленные варианты фильтровали по частоте встречаемости альтернативного варианта: менее 0,5% – для аутосомно-рецессивных заболеваний, 0,01% – для аутосомно-доминантных и доминантных X-сцепленных заболеваний, 0,3% – для рецессивных X-сцепленных (1000G, ExAc, gnomadGenome, gnomadExome); по расположению замены; по функции экзомного варианта; по предсказанию патогенности (SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster, PredictSNP). Варианты классифицировались в соответствии с руководящими принципами Американского колледжа медицинской генетики и геномики и Ассоциации для молекулярной патологии (ACMG/ACGS) [9]. Кроме того, оценку патогенности выявленных вариантов проводили согласно критериям, рекомендованным в Руководстве по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) [10].

Ограничения метода NGS заключаются в том, что он не позволяет выявлять инсерции и делеции длиной более 10 п. о., мутации в интронных областях (за исключением канонических сайтов сплайсинга), вариации длины повторов (в том числе экспансии триплетов), вариации длины гомополимеров (более 4 нуклеотидов), а также мутации в генах, у которых в геноме существует близкий по последовательности паралог (псевдоген). Метод также не предназначен для определения цис-, трансположения пар гетерозиготных мутаций, оценки уровня метилирования, выявления хромосомных перестроек, полиплоидии, выявления мутаций в состоянии мозаицизма.

Использованы методы описательной статистики, для сравнения возрастного состава применялся критерий согласия χ^2 со сравнением равномерного распределения в возрастных группах. Расчет проводился в статистическом пакете R, версия 4.1. Результаты анализа считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После проведения молекулярно-генетического тестирования 11 (24%) пациентам диагноз был изменен на моногенное ВЗК-подобное заболевание, эти пациенты были исключены из последующего анализа.

Среди остальных 35 пациентов с ВЗК преобладали дети с очень ранним началом заболевания в возрасте до 6 лет, они составили 74,3% (26 пациентов, $p=0,001$), из которых у 12 (46,2%) наблюдали ЯК, у 8 (30,8%) – БК, у 6 (23,0%) – НК (табл. 2).

Таблица 2
Распределение по возрасту пациентов с ЯК, БК, НК
Table 2
Age distribution of patients with UC, CD, and IC

Подгруппы, n	Возраст начала заболевания	n=35	ЯК	БК	НК
ВЗК с очень ранним началом	<6 лет	26	12	8	6
ВЗК с ранним началом	<10 лет	2	1	0	1
ВЗК с детским началом	<17 лет	7	2	5	0
Всего		35	15	13	7

По результатам молекулярно-генетического анализа у пациентов с диагнозом ВЗК было определено носительство гетерозиготных вариантов с патогенным значением либо вариантов с неопределенной значимостью (Variant Uncertain Significance, VUS) в генах, ассоциированных с ВЗК, энтеропатиями, метаболическими заболеваниями и врожденными дефектами иммунной системы (клинически проявляющимися как ВЗК) (табл. 3).

Гетерозиготные патогенные варианты обнаружены у 6 (40,0 %) пациентов с ЯК: № 1 – в генах PMM2, CFTR; № 6 – в генах DCLRE1C, CFTR; № 11 – в гене SI; № 18 – в гене HSPA1L; № 20 и № 27 – в гене CFTR.

Из 13 пациентов с БК патогенные варианты выявлены только у 2 (15,3 %) пациентов: пациент № 7 – вариант нуклеотидной последовательности в гене CFTR (с.3909C>G, р.Asn1303Lys), у пациента № 15 выявлена делеция участка 21 хромосомы, включающая гены: RTEL1, EEF1A2, FNDC11, GMEB2, HELZ2, KCNQ2, PDPF, PTK6, SRMS, STMN3; при этом по базам данных делеция экзонов 1–30 гена RTEL1 относится к вариантам с патогенной клинической значимостью. Гетерозиготная мутация в гене RTEL1 может привести к синдрому Хойераала – Хрейдарссона и является клинически тяжелым вариантом врожденного дискератоza (ВДК). Мутации в этом гене приводят к неспособности белка RTEL1 должным образом функционировать. ВДК – это гетерогенный наследственный синдром, проявляющийся недостаточностью костного мозга и диагностирующийся по наличию классической триады: диспластических ногтей, аномальной пигментации кожи и лейкоплакии полости рта. Однако наблюдается клиническая гетерогенность ВДК, и фенотип может включать фиброз легких, гепатит, стеноз пищевода, уретры или слезных протоков, задержку развития и другие осложнения [11, 12].

У 4 (57,1%) пациентов с неопределенным колитом (пациенты № 2, 17, 29, 38) выявлены гетерозиготные варианты с патогенной клинической значимостью в генах PMM2, MVK, HFE, UNC13D, SI.

Кроме того, необходимо отметить, что у двух пациентов с ЯК и трех пациентов с БК выявлены полиморфные варианты в локусах rs2066847 (с.3019dup, р.Leu1007Profs*2) – пациенты № 18, 24, 33; rs2066844 (с.2104C>T, р.Arg702Trp) у пациента № 28; rs2066845 (с.2722G>C, р.Gly908Arg) и rs2066847 (с.3019dup, р.Leu1007Profs*2) у пациента № 39 в гене NOD2. Варианты нуклеотидной последовательности гена NOD2 rs2066844, rs2066845 и rs2066847 встречаются в популяции с частотой более 0,05%. При этом эти три локуса являются основными полиморфными вариантами гена NOD2, связанными с предрасположенностью к болезни Крона и осложненным течением заболевания. В настоящее время подтверждено более 250 регионов генома, ответственных за восприимчивость к ВЗК [13], но только NOD2 превратился из исходного

гена-кандидата в клинически полезный генетический маркер для прогнозирования заболеваний при БК. Вариант, приводящий к сдвигу рамки считывания в экзоне 11 NOD2, p.Leu1007fsX1008 (rs2066847), успешно используется в качестве прогностического фактора для принятия терапевтических решений у пациентов с БК [14].

Выявленные гетерозиготные варианты с неопределенным значением не позволяют сделать окончательный вывод об их связи с развитием и течением ВЗК, однако

Таблица 3

Перечень гетерозиготных вариантов с патогенным клиническим значением и вариантов с неопределенной значимостью в генах, ассоциированных с ВЗК, у пациентов детского возраста с ВЗК

Table 3

List of heterozygous variants with pathogenic clinical significance and variants with uncertain significance in genes associated with IBD in pediatric patients with IBD

№	Шифр	Группа по возрасту	Релевантный ген	Вариант замены		rs ID	Клиническая значимость (ClinVar, VarSome)
				Нуклеотидная замена	Замена аминокислоты		
Мутации в релевантных генах у пациентов с ЯК, N=15							
1	1 (М)	2	CFTR	Deletion (Exons 2-3)	–	–	патогенный
			IL7R	c.814G>A	p.Val272Ile	rs369971728	VUS
			MYO5B	c.4202G>A	p.Arg1401Gln	rs199722479	VUS
			PMM2	c.470T>C	p.Phe157Ser	rs190521996	патогенный
2	3 (Ж)	3	IL2RA	c.262C>T	p.Arg88Trp	–	VUS
3	6 (М)	3	CFTR	c.1210-34TG[11]T[5]	–	–	патогенный
			CR2	c.1117G>A	p.Asp373Asn	rs202077872	VUS
			DCLRE1C	Deletion (Exons 1-3)	–	–	патогенный
			SKIV2L	c.3643C>T	p.Arg1215Cys	rs755655461	VUS
4	8 (М)	3	GHR	c.1077dupA	p.Ser360Ilefs Ter10	–	VUS
5	9 (Ж)	2	ITK	c.1528G>A	p.Asp510Asn	rs778621770	вероятно патогенный
6	11 (Ж)	3	POLA1	c.C2252T	p.Thr751Ile	rs757317865	VUS
			SI	c.1544G>T	p.Gly515Val	rs144972103	патогенный
7	14 (Ж)	2	COL7A1	c.3604C>T	p.Arg1202Cys	rs754979304	VUS
			MAGT1	Gain (Exons 2-10)	–	–	VUS
			NLRP1	c.994del	p.Leu332Cysfs*16	rs1317603303	VUS
8	18 (М)	2	HSPA1L	c.1492G>T	p.Glu498Cys	rs758555654	патогенный
9	19 (М)	3	BLNK	c.328C>G	p.Pro110Ala	rs1554902771	VUS
			UNC13D	c.3011T>C	p.Leu1004Pro	rs371940934	VUS
10	20 (Ж)	5	CFTR	c.1520_1522del	p.Phe508del	rs113993960	патогенный
11	22 (Ж)	2	RIPK1	c.364A>G	p.Ile122Val	–	VUS
12	26 (М)	2	JAK3	c.653G>T	p.Arg218Leu	–	VUS
13	27 (М)	4	CFTR	c.1210-34TG[11]T[5]	–	–	патогенный
			KAT6A	Deletion	–	–	VUS
14	28 (М)	5	PIK3CD	Deletion	–	–	VUS
			STXBP2	c.1443_1444 delinsC>A	p.Val482Ile	rs749915574	VUS
15	34 (М)	3	CD3G	c.353T>C	p.Phe118Ser	rs781239764	VUS

Окончание таблицы 3

Мутации в релевантных генах у пациентов с БК, N=13							
1	4 (М)	3	ELANE	c.272G>C	p.Arg91Pro	rs1201600992	VUS
			ITK	c.1393G>A	p.Asp465Asn	rs1754979969	VUS
			NLRP12	c.2575C>T	p.Arg859Trp	rs573629753	VUS
			STXBP2	c.137A>G	p.Lys46Arg	rs13586641526	VUS
2	7 (Ж)	5	CFTR	c.3909C>G	p.Asn1303Lys	–	патогенный
			IL17RC	c.2075T>C	p.Leu692Ser	rs201296441	VUS
			LCK	c.664C>T	p.Arg222Cys	rs778300098	VUS
			PIK3CD	c.2159G>A	p.Arg720Gln	rs964373496	VUS
3	15 (Ж)	3	PRF1	c.1117C>T	p.Arg373Cys	rs374588624	VUS
			PTK6	DEL		–	–
			RTEL1	Deletion (Exons 1-30)		–	патогенный
4	16 (М)	5	STMN3	DEL		–	–
			NFKB1	c.1160G>A	p.Gly387Asp	–	VUS
5	23 (Ж)	3	ATG16L1	c.898A>G	p.Thr300Ala	rs2241880	VUS
7	25 (М)	5	PARN	c.1493G>A	p.Ser498Asn	rs200471459	VUS
8	30 (М)	5	DLG5	c.3266C>T	p.Pro1089Leu	rs41274586	VUS
9	31 (М)	2	SLC5A1	c.862T>G	p.Leu288Val	rs139037092	VUS
10	33 (М)	3	ANKZF1	c.1803+3C>A	HET	rs374619968	VUS
			IL17RC	c.2075T>C	p.Leu692Ser	rs201296441	VUS
11	35 (М)	2	FCHO1	c.2368A>G	p.Ile790Val	–	VUS
			PIK3R1	c.343C>G	p.Leu115Val	–	VUS
12	37 (М)	2	CARD14	c.827C>A	p.Ser276*	rs149318654	VUS
			PRKCD	c.250G>A	p.Val84Met	–	VUS
			STAT5B	c.2042A>G	p.Lys681Arg	–	VUS
			UNC13D	c.3011T>C	p.Leu1004Pro	rs371940934	VUS
13	39 (Ж)	2	AP3B1	c.2188C>T	p.Arg730Trp	rs141102178	VUS
Мутации в релевантных генах у пациентов с НК, N=7							
1	2 (Ж)	3	PMM2	c.470T>C	p.Phe157Ser	rs190521996	патогенный
2	5 (М)	2	SLC39A7	c.410A>T	p.Tyr137Phe	rs201645740	VUS
3	10 (М)	4	KAT6A	c.1570T>C	p.Ser524Pro	–	VUS
4	17 (М)	2	HFE	c.187C>G	p.His63Asp	rs1799945	патогенный
			HFE	c.803G>A	p.Cis268Tir	rs1800562	патогенный
			MVK	c.1129G>A	p.Val377Ile	rs28934897	патогенный
5	21 (М)	2	NFKB2	c.2140G>T	p.Asp714Tyr	rs1467678334	VUS
6	29 (Ж)	2	SPINK5	c.460A>C	p.Ser154Arg	rs756283031	VUS
			COL7A1	c.4636G>C	p.Gly1546Arg	rs73831831	VUS
			UNC13D	c.1055+1G>A	(Splice donor)	rs75205110	патогенный
7	38 (М)	3	SI	c.1730T>G	p.Val577Gly	rs121912615	патогенный

представляют научный интерес и требуют дальнейшего исследования. Поэтому на следующем этапе был проведен анализ биологического значения и функциональных путей генов, в которых выявлены гетерозиготные варианты с патогенным значением и варианты с неопределенной значимостью.

У обследуемой группы пациентов с ВЗК идентифицированы варианты: 1) в генах, связанных с врожденными дефектами иммунной системы и влияющих на клеточный и гуморальный иммунитет: при ЯК (CD3G, CORO1A, DCLRE1C, IL7R, ITK, JAK3), БК

(FCHO1, ITK, LCK); 2) в генах, связанных с комбинированными иммунодефицитами: при ЯК (SKIV2L, POLA1), БК и НК (STAT5B); 3) в генах, связанных с дефицитом антител: при ЯК (BLNK, PIK3CD), при БК (NFKB1, PIK3CD, PIK3R1) и при НК (NFKB2, SLC39A7); 4) в генах, ассоциированных с заболеваниями иммунной дисрегуляции: при ЯК (IL2RA, MAGT1, RIPK1, STXBP2, UNC13D), при БК (AP3B1, PRF1, PRKCD, STXBP2, UNC13D), у пациентов с НК (UNC13D); 5) в генах, связанных с дефектами фагоцитов – CFTR, ELANE; 6) в генах, связанных с аутовоспалительными заболеваниями (NLRP1, NOD2, POLA1, CARD14, NLRP12, MVK, COL7A1); 7) в генах, связанных с метаболическими процессами (SI, HFE, PMM2).

Около 70% обнаруженных вариантов являются общими как для пациентов с БК, так и для пациентов с ЯК, что подчеркивает значительное генетическое перекрытие при этих заболеваниях [15]. В нашем исследовании мутации в генах CFTR, ITK, NOD2, PIK3CD, STXBP2 были общими как для пациентов с ЯК, так и для пациентов с БК; в генах COL7A1, KAT6A, PMM2, SI – как для пациентов с ЯК, так и для пациентов с НК, а в гене UNC13D – для пациентов с ЯК, БК и НК.

Среди выявленных вариантов с патогенным клиническим значением наибольшая частота встречаемости приходится на ген CFTR (выявлен у 5 пациентов). Ген CFTR кодирует белок – трансмембранный регулятор муковисцидоза (MBTP), который относится к семейству ABC-транспортеров (ATP-binding cassette). Этот белок в норме встраивается в апикальную мембрану эпителиальных клеток, где функционирует как хлорный канал: регулирует поступление в клетку и выход из нее ионов хлора. При мутациях в гене CFTR нарушается транспорт ионов натрия и хлора через мембрану различных клеток. Это приводит к изменению электролитного состава клетки и, как следствие, к нарушению секрета: он становится вязким и не может нормально выделяться из клетки. Наличие мутаций в гомозиготном состоянии связано с развитием муковисцидоза [16]. У людей с одним патогенным вариантом (статус носителя) иногда развивается заболевание, ограниченное также одной системой органов, известное как CFTR-связанное расстройство. Взаимосвязь между муковисцидозом и риском развития ВЗК неясна. Однако доказано, что патогенные варианты в гене CFTR могут влиять на развитие дисбактериоза и повышенную проницаемость стенки кишечника. У таких пациентов наблюдается воспаление кишечника, о чем свидетельствуют повышенная экспрессия провоспалительных цитокинов в кишечнике, специфические фекальные маркеры (фекальный кальпротектин), грубые поражения (капсульная эндоскопия) и гистологические признаки поражения кишечника [17].

У двух родственных пациентов с ВЗК обнаружен патогенный вариант гена PMM2 (с.470T>C, р. Phe157Ser). Ген PMM2 расположен на 16 хромосоме. Белок, кодируемый этим геном, катализирует изомеризацию маннозо-6-фосфата в маннозо-1-фосфат, который является предшественником GDP-маннозы, необходимой для синтеза долихол-Р-олигосахаридов. Мутации PMM2 приводят к врожденному нарушению гликозилирования. В 2023 г. Chenglin Ye и соавт. доказали, что у пациентов с ВЗК и раком прямой кишки регистрируется повышенная экспрессия PMM2, и уровень экспрессии PMM2 является диагностическим маркером ВЗК [18].

Носительство гетерозиготных вариантов с патогенным клиническим значением в гене SI также выявлено у 2 пациентов. Вариант rs144972103 (с.1544G>T, р.Gly515Val) обнаружен у пациента с ЯК, а вариант rs121912615 (с.1730T>G, р.Val577Gly) – у пациента с НК. Ген SI кодирует фермент сахараза-изомальтаза, который экспрессируется

в щеточной кайме кишечника. Кодированный белок синтезируется как белок-предшественник, который расщепляется протеазами поджелудочной железы на две ферментативные субъединицы – сахаразу и изомальтазу. Эти две субъединицы гетеродимеризуются с образованием комплекса сахаразы-изомальтазы. Данный комплекс необходим для переваривания пищевых углеводов, включая крахмал, сахарозу и изомальтозу. Мутации в этом гене являются причиной врожденной недостаточности сахаразы-изомальтазы. Известно, что основные симптомы врожденной недостаточности сахаразы-изомальтазы совпадают с синдромом раздраженного кишечника, распространенным функциональным расстройством ЖКТ [19].

У пациента с НК выявлены два варианта с патогенным клиническим значением в гене HFE. Этот ген кодирует белок – гомеостатический регулятор железа, регулирующий всасывание железа путем взаимодействия рецептора с трансферрином. Мутации гена HFE связаны с развитием гемохроматоза типа 1. Наследственный гемохроматоз представляет собой рецессивное генетическое заболевание, возникающее в результате мутаций гена HFE. В исследованиях отмечена связь ВЗК с наследственным гемохроматозом [20]. В другом исследовании выявлена связь наследственного гемохроматоза с дисбиозом кишечника, что, в свою очередь, является немаловажным фактором течения ВЗК и его управления [21].

У пациента с ЯК выявлен гетерозиготный вариант, представляющий собой делецию 1–3 экзонов гена DCLRE1C. Ген DCLRE1C (DNA Cross-Link Repair 1C) кодирует белок, участвующий в рекомбинации V(D)J и репарации ДНК. Патогенные варианты DCLRE1C в гомозиготном состоянии связывают с тяжелой формой комбинированной иммунной недостаточности с комбинированным иммунодефицитом атабаскского типа (SCIDA) и синдромом Оменна. В литературе описана девочка с мутацией в гене DCLRE1C с диагностированным хроническим ЯК в 9-месячном возрасте, у которой наблюдался тяжелый стероидзависимый колит в течение нескольких лет. Проведенная пациентке трансплантация гемопоэтических стволовых клеток в этом случае восстановила количество лимфоцитов и излечила воспалительное заболевание кишечника. Это исследование доказывает, что генетическое нарушение в процессе созревания лимфоцитов может проявляться хроническим воспалительным заболеванием кишечника в качестве доминирующего фенотипа при отсутствии предрасположенности к тяжелой инфекции [22].

Гетерозиготный вариант с патогенным клиническим значением (с.1492G>T, р.Glu498Cys) в гене HSPA1L обнаружен у одного пациента с ЯК. Этот ген кодирует белок из семейства белков теплового шока 70 (Hsp70), который способствует правильному сворачиванию вновь транслированных и неправильно свернутых белков, а также стабилизирует или деградирует мутантные белки. Функция белка Hsp70 – передача сигналов, апоптоз, а также рост и дифференцировка клеток. Проведенное в 2017 г. Takahashi S. и соавт. полноэкзомное секвенирование 136 пациентов с ВЗК и 106 человек контрольной группы показало связь мутаций в гене HSPA1L с ВЗК. В данном исследовании были выявлены редкие (частота минорных аллелей, MAF, <0,01) варианты нуклеотидной последовательности гена HSPA1L и подтверждена их патогенная клиническая значимость [23].

В гене UNC13D у пациента с НК выявлен патогенный вариант rs75205110 (с.1055+1G>A), влияющий на сплайсинг. Ген UNC13D кодирует белок, участвующий в регуляции секреции цитолитических гранул. Мутации в этом гене связаны

аутосомно-рецессивным семейным гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом 3-го типа [24]. Можно предположить, что носительство гетерозиготного варианта вызывает симптомы ВЗК.

Патогенный вариант rs28934897 (c.1129G>A, p.Val377Ile) гена MVK выявлен у пациента с НК. Ген MVK кодирует мевалонаткиназу – фермент, участвующий в биосинтезе холестерина и изопреноидов. Дефицит мевалонаткиназы (МКД) – редкий аутосомно-рецессивный аутовоспалительный синдром, обусловленный мутациями в MVK. Он проявляется как непрерывный спектр клинических признаков, начиная от рецидивирующих приступов лихорадки, связанных с воспалительными проявлениями, которые известны как синдром гипериммуноглобулина D, до более тяжелой формы, известной как мевалоновая ацидурия. ВЗК-подобное поражение наблюдалось у 16% из 114 пациентов с МБП, включенных в регистр EUROFEVER2. Однако данные о ВЗК, ассоциированных с MVK, остаются ограниченными. В работе В. Bader-Meunier и соавт. описаны 10 пациентов с ВЗК с очень ранним началом и патогенными вариантами MVK. Понимание того, что у пациентов с патогенными вариантами MVK повышен уровень интерлейкина-1 β (IL-1 β), позволило авторам эффективно лечить заболевание с помощью индивидуального терапевтического подхода с использованием препаратов против IL-1. Это подчеркивает ценность понимания функциональной геномики редких мутаций и использования этих знаний для разработки персонализированных эффективных медицинских подходов [25].

Преимущественно при манифестации ВЗК у детей с очень ранним началом отмечено наличие генетического компонента, что позволяет предположить превалирование генетических факторов в развитии заболевания. ВЗК с ранним началом имеют уникальные характеристики фенотипа, тяжести, которые поддерживают поиск локусов и могут быть специфичными для заболевания с ранним началом. Кроме того, ВЗК с ранним началом имеют более сильный семейный компонент, чем болезнь взрослых, исследования, нацеленные на эту подгруппу, потенциально могут предоставить дополнительные возможности для выявления генов, которые способствуют умеренным эффектам.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время считается, что ВЗК являются полигенными заболеваниями с набором сложных генетических признаков. За последние десятилетия усилия исследователей были направлены на улучшение классификации широкого спектра фенотипов и клинических проявлений ВЗК. Было обнаружено множество молекулярных механизмов, лежащих в основе этих заболеваний. Все эти достижения привели к значительному улучшению показателей диагностики. Однако по-прежнему существует значительная часть пациентов с клиническими признаками ВЗК, которым не установлен четкий диагноз. Молекулярные методы могут стать важным инструментом диагностики заболеваний у детей с подозрением на генетические дефекты, особенно это касается детей с очень ранним началом ВЗК и ВЗК с тяжелыми фенотипами заболевания.

По результатам молекулярно-генетического анализа у пациентов с диагнозом ВЗК было определено носительство гетерозиготных вариантов с патогенным значением либо вариантов с неопределенной значимостью в генах, ассоциированных с ВЗК, врожденными дефектами иммунной системы, энтеропатиями

и метаболическими заболеваниями. Мы предполагаем, что при некоторых ВЗК гетерозиготные варианты в генах, которые, как считается, вызывают ВЗК посредством аутосомно-рецессивного наследования, могут способствовать клинической картине. Около 70% обнаруженных в нашем исследовании вариантов являются общими как для пациентов с БК, так и для пациентов с ЯК, что подчеркивает значительное генетическое перекрытие при этих заболеваниях. В нашем исследовании мутации в генах CFTR, IТK, NOD2, PIK3CD, STXBP2 были общими как для пациентов с ЯК, так и для пациентов с БК; в генах COL7A1, КАТ6А, РММ2, SI – как для пациентов с ЯК, так и для пациентов с НК, а в гене UNC13D – для пациентов с ЯК, БК и НК.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2015;50(8):942–951. DOI: 10.3109/00365521.2015.1014407
2. Mizoguchi A, Mizoguchi E. Animal models of IBD: linkage to human disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2010 Oct;10(5):578–87. DOI: 10.1016/j.coph.2010.05.007
3. Torres J, Colombel J.F. Genetics and phenotypes in inflammatory bowel disease. *Lancet.* 2016;387(10014):98–100. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00464-X
4. Peterson L.W., Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2014;14(3):141–153. DOI: 10.1038/nri3608
5. Ye B.D., McGovern D.P. Genetic variation in IBD: progress, clues to pathogenesis and possible clinical utility. *Expert Rev Clin Immunol.* 2016;12:1091.
6. Kelsen J.R., Sullivan K.E., Rabizadeh S., et al. NASPGHAN Position Paper on The Evaluation and Management for Patients with Very Early-Onset Inflammatory Bowel Disease (VEO-IBD). *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2019 Dec 30. DOI: 10.1097/MPG.0000000000002567
7. Turner D, Ruemmele F.M., Orlanski-Meyer E., et al. Management of Paediatric Ulcerative Colitis, Part 1: Ambulatory Care-An Evidence-based Guideline From European Crohn's and Colitis Organization and European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018 Aug;67(2):257–291. DOI: 10.1097/MPG.0000000000002035 Erratum in: *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2020 Dec;71(6):794.
8. Tangye S.G., Al-Herz W, Bousfiha A., et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* 2022;42:1473. DOI: 10.1007/s10875-022-01289-3
9. Richards S, Aziz N, Bale S., et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405–24. DOI: 10.1038/gim.2015.30
10. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prohorchuk E.B., et al. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2). *Medical genetics.* 2019;18(2):3–24. (In Russian) DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.3-24
11. Walne A.J., Vulliamy T., Kirwan M., et al. Constitutional Mutations in RTEL1 Cause Severe Dyskeratosis Congenita. *Am J Hum Genet.* 2013;92(3):448–53.
12. Le Guen T., Jullien L., Touzot F., et al. Human RTEL1 deficiency causes Hoyeraal-Hreidarsson syndrome with short telomeres and genome instability. *Hum Mol Genet.* 2013;22(16):3239–49.
13. Liu J.Z., van Sommeren S, Juan H., et al. Analysis of associations identifies 38 loci susceptible to inflammatory bowel disease and highlights the overall genetic risk among population groups. *Nat Genet.* 2015;47:979.
14. Schnitzler F. Development of a uniform, very aggressive disease phenotype in all homozygous carriers of the NOD2 mutation p.Leu1007fsX1008 with Crohn's disease and active smoking status resulting in ileal stenosis requiring surgery. *PLoS One.* 2020 Jul 27; 15(7):e0236421.
15. Li J., Moran T., Swanson E., et al. Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Hum Mol Genet.* 2004 Aug 15;13(16):1715–25. DOI: 10.1093/hmg/ddh182
16. Amaral M.D., Hutt D.M., Tomati V., et al. CFTR processing, trafficking and interactions. *J Cyst Fibros.* 2020;19 Suppl 1:S33.
17. Trigo S.C., Leo Carnerero E., de la Cruz Ramirez M.D. Crohn's disease and cystic fibrosis: there is still a lot to learn. *Rev Esp Enferm Dig.* 2018 Dec;110(12):835–836. DOI: 10.17235/reed.2018.5725/2018
18. Ye C., Huang Y., Gao Y., et al. Exploring the glycolytic cross-talk genes between inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Funct Integr Genomics.* 2023 Jul 10;23(3):230. DOI: 10.1007/s10142-023-01170-5
19. Husein D.M., Rizk S., Naim H.Y. Differential Effects of Sucrase-Isomaltase Mutants on Its Trafficking and Function in Irritable Bowel Syndrome: Similarities to Congenital Sucrase-Isomaltase Deficiency. *Nutrients.* 2020 Dec 22;13(11):9. DOI: 10.3390/nu13010009
20. Cyriel Y., Ponsoen P.C.F., Stokkers A.R., et al. Patient with hereditary hemochromatosis, ulcerative colitis, and primary sclerosing cholangitis: genetic aspects. *BRIEF REPORT.* 2001;12(6):518–521. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0953-6205\(01\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0953-6205(01)00179-0)
21. Sivaprakasam S., Ristic B., Mudaliar N., et al. Hereditary hemochromatosis promotes colitis and colon cancer and causes bacterial dysbiosis in mice. *Biochem J.* 2020;477:3867–3883.
22. Minegishi Y., Rohrer J., Coustan-Smith E., et al. An essential role for BLNK in human B cell development. *Science.* 1999;286:1954–1957.
23. Takahashi S., Andreoletti G., Chen R., et al. De novo and rare mutations in the HSPA1L heat shock gene associated with inflammatory bowel disease. *Genome Med.* 2017 Jan 26;9(1):8. DOI: 10.1186/s13073-016-0394-9
24. Hu X., Liu D., Jiang X., et al. Identification of a novel nonsense mutation in the UNC13D gene from a patient with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a case report. *BMC Med Genet.* 2018 May 21;19(1):82. DOI: 10.1186/s12881-018-0600-2
25. Bader-Meunier B., Martins A.L., Charbit-Henrion F., et al. Mevalonate Kinase Deficiency: A Cause of Severe Very-Early-Onset Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2021 Oct 20;27(11):1853–1857. DOI: 10.1093/ibd/izab139