

Ю.В. Горина¹, К.В. Савостьянов¹, А.А. Пушков¹, А.Г. Никитин¹, Е.Л. Пеньков¹, С.А. Красовский², О.И. Симонова^{1,3}, Л.С. Намазова-Баранова^{1,4}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт пульмонологии, Москва, Российская Федерация

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Российская Федерация

Генотип-фенотипические корреляции течения кистозного фиброза у российских детей. Первое описание одиннадцати новых мутаций

Контактная информация:

Горина Юлия Викторовна, кандидат медицинских наук, врач-педиатр отделения муковисцидоза НМИЦ здоровья детей

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 134-24-21, e-mail: ygorinova@yandex.ru

Статья поступила: 21.12.2017 г., принята к печати: 26.02.2018 г.

Кистозный фиброз — наследственное заболевание, возникающее в результате мутаций в гене регулятора трансмембранного транспорта ионов хлора (CFTR). Установление мутаций в гене CFTR необходимо для выявления клинических особенностей кистозного фиброза. **Цель исследования:** выявить генотип-фенотипические корреляции между мутациями первого класса патогенности и клиническими проявлениями кистозного фиброза на основе изучения распространенности и структуры мутаций гена CFTR. **Методы.** В исследование включали детей в возрасте до 18 лет с кистозным фиброзом, госпитализированных в период с 2013 по 2017 г. Критерием невключения были биаллельные мутации в гене CFTR. Варианты гена CFTR анализировали методом секвенирования нового поколения. **Результаты.** У 125 пациентов с кистозным фиброзом обнаружено 59 различных вариантов гена CFTR, из них 11, не описанных ранее. Наиболее распространенными были делеция с.1521_1523del, обнаруженная в 98 (39,2%) из 250 проанализированных аллелей гена CFTR, и делеция с.1545_1546del, выявленная в 22/250 (8,8%) аллелях. Показано, что мутация с.1545_1546del, р.Y515* чаще обнаруживалась у детей чеченской народности — отношение шансов (ОШ) 139 (95% доверительный интервал 15–1257). Установлено, что мекониевый илеус, панкреатическая недостаточность и цирроз печени чаще встречаются у пациентов с мутациями первой категории патогенности — ОШ 3,9 (95% ДИ 1,0–15,0), 4,4 (95% ДИ 1,8–11,1) и 351 (95% ДИ 17,5–7046) соответственно. Не обнаружена связь мутаций гена CFTR с развитием бронхоэктазов и полипозного пансинусита. **Заключение.** Установлены корреляции между генотипом и клиническими проявлениями кистозного фиброза у российских детей с мутациями гена CFTR первого класса патогенности.

Ключевые слова: дети, кистозный фиброз, ген CFTR, новые мутации, секвенирование нового поколения, фенотип, генотип, корреляции.

(Для цитирования: Горина Ю. В., Савостьянов К. В., Пушков А. А., Никитин А. Г., Пеньков Е. Л., Красовский С. А., Симонова О. И., Намазова-Баранова Л. С. Генотип-фенотипические корреляции течения кистозного фиброза у российских детей. Первое описание одиннадцати новых мутаций. *Вопросы современной педиатрии*. 2018; 17 (1): 61–69. doi: 10.15690/vsp.v17i1.1856)

ОБОСНОВАНИЕ

Кистозный фиброз поджелудочной железы (код в МКБ-10 E84.0, E84.8 E84.9) — моногенное заболевание с аутосомно-рецессивным механизмом наследования, характеризующееся поражением всех экзокринных желез. В России заболеваемость кистозным фиброзом составляет в среднем 1:10 000 [1], в Европе — 0,7:10 000, в США — 0,8:10 000 новорожденных [2]. При этом каждый 20-й европеец является гетерозиготным носителем мутаций, приводящих к развитию кистозного фиброза [1]. В последнее десятилетие отмечено значительное повышение продолжительности жизни пациентов с кистозным фиброзом [3]. Сегодня в неко-

торых странах Европы медиана продолжительности жизни таких пациентов колеблется в диапазоне между 30 и 40 годами [4].

Клонирование гена CFTR, кодирующего белок — муковисцидозный трансмембранный регулятор (МВТР) [5, 6], и последующее его изучение позволили идентифицировать более 2000 мутаций, являющихся этиологическими причинами развития кистозного фиброза [7]. В современной лабораторной практике для диагностики кистозного фиброза используется большой набор скрининговых методов, включая такие специфические методы, как анализ кривых плавления [8], денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография

(DHPLC) [9], либо метод диагностики кистозного фиброза с использованием микрочипов [10] с его различными модификациями [11]. Данные методы молекулярной диагностики достаточно просты в использовании и позволяют идентифицировать одновременно несколько наиболее распространенных мутаций гена *CFTR*, однако не всегда обладают надлежащим диагностическим разрешением. Бóльшей разрешающей способностью обладает метод классического секвенирования по Сэнгеру. Этот метод позволяет выявлять мутации гена *CFTR*, расположенные как в кодирующих, так и в некодирующих областях гена, за исключением протяженных делеций, вставок и перестроек [12]. К недостаткам этого метода относят его высокую стоимость. В последние годы для молекулярно-генетической диагностики кистозного фиброза стали широко использоваться методы исследования, созданные на основе технологии секвенирования нового поколения. При этом применяются различные модификации этой технологии, позволяющие как анализировать набор определенных мутаций, так и проводить анализ всего гена, включая его некодирующие области [13]. В случае необнаружения биаллельных мутаций вышеперечисленными методами применяются дополнительные методы исследования, такие как количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени и мультиплексная лигазная ПЦР (MLPA), позволяющие выявлять протяженные структурные изменения гена *CFTR*, носящие патогенный характер [14].

Доступность методов генетического скрининга привела к описанию большого числа мутаций, характерных для больных разной географической и этнической при-

надлежности [15]. Подробный перечень мутаций, встречающихся у пациентов с кистозным фиброзом на территории России, был опубликован в 2015 г. [16]. Однако только у 70% представленных пациентов были описаны биаллельные мутации, что, по всей видимости, связано с использованием методов, позволяющих выявлять лишь наиболее распространенные мутации. Выявление недостающих мутаций гена *CFTR* у 30% недообследованных пациентов, по мнению авторов, будет способствовать обнаружению новых мутаций и, скорее всего, приведет к снижению относительной частоты наиболее распространенных мутаций. Именно поэтому в целях обнаружения 100% патогенных вариантов гена *CFTR* авторы выбрали наиболее информативный метод секвенирования нового поколения, позволяющий одновременно исследовать целевые области генома нескольких десятков пациентов, существенно экономя материальные и временные ресурсы по сравнению с методом Сэнгера.

Неоднородность клинической картины кистозного фиброза у различных больных была описана за 20 лет до открытия гена *CFTR* [17]. Описание существенного разнообразия мутаций гена *CFTR* отчасти прояснило гетерогенность фенотипических проявлений кистозного фиброза. Было установлено, что помимо этиологических мутаций гена *CFTR* фенотип больных может формироваться под влиянием других генетических и негенетических (питание, образ жизни, наличие/отсутствие вредных привычек) факторов [18]. За последние 25 лет с момента обнаружения гена *CFTR* некоторые часто встречающиеся мутации были описаны как мутации высокого или низкого риска, обуславливающие различную тяжесть клинических проявлений болезни [19]. В современной

Yulia V. Gorinova¹, Kirill V. Savostyanov¹, Alexandr A. Pushkov¹, Alexey G. Nikitin¹, Evgeniy L. Pen'kov¹, Stanislav A. Krasovskiy², Olga I. Simonova^{1, 3}, Leyla S. Namazova-Baranova^{1, 4}

¹ National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

² Research Institute of Pulmonology, Moscow, Russian Federation

³ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Genotype-Phenotype Correlations of the Course of Cystic Fibrosis in Russian Children. The First Description of Eleven New Mutations

Background. Cystic fibrosis is a hereditary disease that occurs as a result of mutations in the regulator gene of chloride ion transmembrane transport (*CFTR*). Finding mutations in the *CFTR* gene is necessary for identification of the clinical features of cystic fibrosis. **Objective.** Our aim was to identify genotype-phenotype correlations between mutations of the first class of pathogenicity and clinical manifestations of cystic fibrosis based on studying the prevalence and structure of *CFTR* gene mutations. **Methods.** The study included children under 18 years with cystic fibrosis admitted to hospital between 2013 and 2017. Biallelic mutations in the *CFTR* gene were the non-inclusion criterion. The *CFTR* gene variants were analyzed by next-generation sequencing method. **Results.** In 125 patients with cystic fibrosis, 59 different variants of the *CFTR* gene were detected, 11 of them not previously described. The most common was the deletion c.1521_1523del found in 98 (39.2%) of the 250 analyzed *CFTR* gene alleles and the deletion c.1545_1546del found in 22/250 (8.8%) alleles. It has been shown that the mutation c.1545_1546del, p.Y515* was more often found in children of the Chechen nation — odds ratio (OR) 139 (95% confidence interval 15–1,257). It has been established that meconium ileus, pancreatic deficiency and cirrhosis are more common in patients with mutations of the first category of pathogenicity: OR 3.9 (95% CI 1.0–15.0), 4.4 (95% CI 1.8–11.1), and 351 (95% CI 17.5–7,046), respectively. The association of *CFTR* gene mutations with the development of bronchiectases and polypous pancinusitis has not been found. **Conclusion.** Correlations between the genotype and clinical manifestations of cystic fibrosis in Russian children with *CFTR* gene mutations of the first class of pathogenicity have been established.

Key words: children, cystic fibrosis, *CFTR* gene, new mutations, next-generation sequencing, phenotype, genotype, correlations.

(For citation: Gorinova Yulia V., Savostyanov Kirill V., Pushkov Alexandr A., Nikitin Alexey G., Pen'kov Evgeniy L., Krasovskiy Stanislav A., Simonova Olga I., Namazova-Baranova Leyla S. Genotype-Phenotype Correlations of the Course of Cystic Fibrosis in Russian Children. The First Description of Eleven New Mutations. *Voprosy sovremennoi pediatrii — Current Pediatrics*. 2018; 17 (1): 61–69. doi: 10.15690/vsp.v17i1.1856)

классификации молекулярных причин развития кистозного фиброза мутации гена *CFTR* сгруппированы в 6 функциональных классов патогенности, определяющих тяжесть проявлений болезни на белковом уровне [20]. Однако и эта схема имеет недостатки. Например, некоторые мутации имеют характеристики нескольких функциональных классов (например, *p.F508del* и *p.R117H*) [21]. Кроме того, понимание патогенности мутаций гена *CFTR* на молекулярном уровне является необходимым шагом для разработки модуляторов МВТР, которые, как ожидается, позволят уже в ближайшее время персонализировать лечение больных кистозным фиброзом с любыми мутациями гена *CFTR* [22].

Целью настоящего исследования было выявить генотип-фенотипические корреляции между мутациями первого класса патогенности и клиническими проявлениями кистозного фиброза на основе изучения распространенности и структуры мутаций гена *CFTR*.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Проведено кросс-секционное (одномоментное) исследование.

Критерии соответствия

Критерии включения:

- пациенты с установленным диагнозом «кистозный фиброз» в возрасте до 18 лет;
- отсутствие мутаций в гене *CFTR* либо мутация в одной аллели гена;
- подписанное родителями или законными представителями пациента информированное согласие на проведение молекулярно-генетического исследования и обработку данных.

Критерии невключения:

- подтвержденный кистозный фиброз методом молекулярно-генетического исследования (наличие биаллельных мутаций гена *CFTR*).

Диагностические критерии

Информация о диагнозе и диагностических мероприятиях (включая молекулярно-генетические исследования при исключении случаев биаллельных мутаций гена *CFTR*) извлекалась из медицинских карт. Согласно имеющейся информации, диагноз «Кистозный фиброз» устанавливали на основании клинической картины болезни и положительного результата потового теста на содержание хлоридов (> 80 ммоль/л методом проводимости и > 60 ммоль/л методом титрования по Гибсону и Куку).

Условия проведения

В исследование включали больных, госпитализированных в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (Москва) в период с ноября 2013 по октябрь 2017 г.

Исходы исследования

Основной исход: распространенность и структура мутаций гена *CFTR*.

Дополнительные исходы: корреляции между мутациями первого класса патогенности в гене *CFTR* и клиническими проявлениями кистозного фиброза — наличием мекониевого илеуса, панкреатической недостаточности, цирроза печени, бронхоэктазов и полипозного пансинусита.

Генетический скрининг

Для молекулярно-генетического исследования в момент госпитализации осуществляли забор цельной венозной крови в количестве 1–2 мл в пробирку с антикоагулянтом ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), после чего образцы направлялись в лабораторию молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей». Выделение геномной ДНК выполнено с использованием набора реактивов DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия) на автоматической станции QIAQUBE (QIAGEN, Германия). Качество и количество выделенной геномной ДНК исследовалось при помощи флуориметра нового поколения Qubit 3.0 (Invitrogen, США). Критерием качества ДНК было отношение поглощения при длинах волн 260 и 280 нм, лежащее в диапазоне значений 1,8–2,0. Необходимое суммарное количество ДНК для исследования составляло 500 нг. ДНК необходимого качества и количества была получена для всех субъектов исследования.

Нуклеотидную последовательность определяли методом массового параллельного секвенирования. Амплификация целевых областей гена *CFTR*, включающих все кодирующие, прилегающие интронные, а также 3'-UTR области, была осуществлена с использованием олигонуклеотидов Ion AmpliSeq™ *CFTR* Panel (Thermo Fisher Scientific, США). Дальнейшее обогащение, очистка и эмульсионная ПЦР 102 ампликонов, общей протяженностью 8487 пар нуклеотидов (п.н.), проводилась на приборе Ion Chef (Thermo Fisher Scientific, США). Секвенирование нового поколения осуществлялось на оборудовании Ion S5 (Thermo Fisher Scientific, США). Патогенность всех обнаруженных минорных вариантов гена *CFTR* с частотой встречаемости менее 1% согласно информации баз данных dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) и ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>), а также патогенность ранее не описанных нуклеотидных замен оценивали в программах Alamut Batch и Alamut Focus (Interactive Biosoftware, Франция).

Валидация обнаруженных вариантов гена *CFTR* выполнена методом двунаправленного секвенирования по Сэнгеру. С этой целью вся исходная геномная ДНК подвергалась амплификации на приборе ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием олигонуклеотидов, подобранных в программе Beacon Designer 8.10. Проверка специфичности праймеров проводилась с помощью программы Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Продукты амплификации секвенировались с использованием реактивов BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на оборудовании ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, США). Все нуклеотидные замены были подтверждены (специфичность 100%).

Все выявленные варианты гена *CFTR* были описаны согласно номенклатуре HGVS с учетом принятых рекомендаций Европейского общества по генетике человека (European Society of Human Genetics, ESHG) (<http://www.eurogentest.org>) и информации баз данных по муковисцидозу (www.cftr2.org; www.cff.org).

Фенотипическое описание кистозного фиброза

Фенотипическое описание болезни включало случаи мекониевого илеуса, панкреатической недостаточности, цирроза печени, бронхоэктазов и полипозного пансинусита. Перечисленные признаки кистозного фиброза устанавливали на основании записей в медицинских картах больных по результатам исследований, выполненных до (мекониевый илеус) или в период пребывания в НМИЦ здоровья детей. Возникновение панкреатической недостаточности определяли при снижении концентрации панкреатической эластазы $1 < 200$ мкг/г. Диагностику цирроза печени проводили методом фиброэластометрии с помощью аппарата «Фиброскан 502» (Echosens, Франция) с использованием шкалы METAVIR F0-F4 [23]. Наличие цилиндрических бронхоэктазов и полипозного пансинусита определяли с использованием мультиспирального компьютерного томографа Discovery CT750 HD (General Electric, США) с применением следующих параметров: 100–120 кВт, 80–100 мА, толщина среза 0,625 мм, pitch-1.

Этическая экспертиза

Проведение исследования одобрено локальным независимым этическим комитетом при ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России (протокол № 10 от 19.11.2013 г.).

Статистический анализ

Размер выборки предварительно не рассчитывался. Анализ данных выполнен с применением пакета статистических программ STATISTICA v. 10.0 (StatSoft Inc., США). Сравнение качественных показателей в группах детей с различными вариантами гена *CFTR* выполнено с помощью критерия Пирсона хи-квадрат или точного дву-

стороннего теста Фишера, в случае если частота хотя бы в одной ячейке таблицы 2×2 была меньше или равна 5. Определение генотип-фенотипических корреляций проведено на основании анализа бинарных признаков (наличие/отсутствие мутации и наличие/отсутствие фенотипического признака), расчета отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (ДИ).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика выборки

В исследование включены 125 пациентов (девочек 63%) в возрасте от 5 мес до 17 лет, медиана 7,2 года (4,4; 13,0). Мекониевый илеус отмечался у 13/117 (11%) пациентов, панкреатическая недостаточность — у 97/123 (79%), цирроз печени — у 14/123 (11%), бронхоэктазы — у 64/123 (52%), полипозный пансинусит — у 40/123 (33%) пациентов. У 122/125 (98%) пациентов результат неонатального скрининга был положительным, у 3/125 (2%) детей — отрицательным.

Распространенность и структура мутаций гена *CFTR*

В результате молекулярно-генетического исследования биаллельные мутации гена *CFTR* были обнаружены у всех 125 обследованных пациентов, всего 59 различных вариантов гена *CFTR*. Наиболее распространенной оказалась мутация *c.1521_1523del, p.F508del*, обнаруженная в гомозиготном состоянии у 23/125 (18,4%) пациентов. Второй по частоте встречаемости была делеция *c.1545_1546del, p.Y515**: гомозиготными по данной мутации были 4% пациентов. Наиболее частой миссенс-мутацией и третьей по частоте встречаемости была мутация *c.274G>A, p.E92K*. Протяженная делеция *c.54-5940_273+10250del/21kb* обнаружена менее чем в 5% случаев, причем только у одного пациента она была выявлена в гомозиготном состоянии. Остальные мутации встретились с частотой менее 3% (табл. 1).

Среди 59 выявленных вариантов гена *CFTR* чаще всего встречались миссенс-мутации, реже обнаруживались делеции, включая одну протяженную делецию, нонсенс-

Таблица 1. Сравнительный анализ частоты встречаемости мутаций у детей с кистозным фиброзом по данным настоящего исследования и российского регистра больных кистозным фиброзом (данные 2015 г.)

Table 1. Comparative analysis of the incidence of mutations in children with cystic fibrosis according to the present study and the Russian register of patients with cystic fibrosis (data from 2015)

№	Мутация	Тип мутации	Частота аллелей, абс. (%)	
			<i>n</i> = 125 [#]	По данным [3]
1	<i>c.1521_1523del, p.F508del</i>	Делеция	96 (38,4)	51,7
2	<i>c.1545_1546del, p.Y515*</i>	Делеция	22 (8,8)	1,3
3	<i>c.274G>A, p.E92K</i>	Миссенс	17 (6,8)	2,4
4	<i>c.54-5940_273+10250del/21kb</i>	Делеция	12 (4,8)	5,7
5	<i>c.3846G>A, W1282*</i>	Нонсенс	7 (2,8)	1,8
6	<i>c.1766+1G>C</i>	Интронная	5 (2,0)	0,1
7	<i>c.2052dup, p.Q685Tfs*4</i>	Инсерция	5 (2,0)	1,8
8	<i>c.3909C>G, p.N1303K</i>	Миссенс	5 (2,0)	1,4
9	<i>c.1243_1247del, p.N415*</i>	Делеция	4 (1,6)	0,2
10	<i>c.4004T>C, p.L1335P</i>	Миссенс	4 (1,6)	0,1

Таблица 1. Продолжение

№	Мутация	Тип мутации	Частота аллелей, абс. (%)	
			n = 125 [#]	По данным [3]
11	c.580-1G>T	Интронная	4 (1,6)	0,2
12	c.1000C>T, p.R334W	Миссенс	4 (1,6)	0,8
13	c.2012del, p.L671*	Делеция	4 (1,6)	1,9
14	c.3196C>T, p.R1066C	Миссенс	4 (1,6)	0,3
15	c.3844T>C, p.W1282R	Миссенс	3 (1,2)	0,3
16	c.1397C>G, p.S466*	Нонсенс	2 (0,8)	0,3
17	c.3209G>A, p.R1070Q	Миссенс	2 (0,8)	нд
18	c.1624G>T, p.G542*	Нонсенс	2 (0,8)	1,2
19	c.287C>A, p.A96E	Миссенс	2 (0,8)	0,04
20	c.3718-2477C>T	Интронная	2 (0,8)	2,1
21	c.550del, p.L184Ffs*5	Делеция	2 (0,8)	нд
22	c.1735G>T, p.D579Y	Миссенс	2 (0,8)	0,1
23	c.3816_3817del, p.S1273Lfs*28	Делеция	2 (0,8)	0,3
24	c.442del, p.I148Lfs*5	Делеция	2 (0,8)	нд
25	c.349C>T, p.R117C	Миссенс	2 (0,8)	0,02
26	c.174_177del, p.D58Efs*32	Делеция	2 (0,8)	нд
27	c.3107C>A, p.T1036N	Миссенс	1 (0,4)	нд
28	c.412_413insACT, p.L137_L138insH	Инсерция	1 (0,4)	1,1
29	c.3475T>C, p.S1159P	Миссенс	1 (0,4)	0,1
30	c.2589_2599del, p.I864Sfs*28	Делеция	1 (0,4)	нд
31	c.43del, p.L15Ffs*10	Делеция	1 (0,4)	0,04
32	c.254G>A, p.G85E	Миссенс	1 (0,4)	0,1
33	c.358G>A, p.A102T	Миссенс	1 (0,4)	нд
34	c.4298A>G, p.E1433G	Миссенс	1 (0,4)	0,02
35	c.1219del, p.E407Nfs*35	Делеция	1 (0,4)	0,02
36	c.353del, p.S118Lfs*6	Делеция	1 (0,4)	нд
37	c.1657C>T, p.R553*	Нонсенс	1 (0,4)	0,2
38	c.2834C>T, p.S945L	Миссенс	1 (0,4)	0,1
39	c.1488G>A, p.W496*	Нонсенс	1 (0,4)	0,02
40	c.831G>A, p.W277*	Нонсенс	1 (0,4)	нд
41	c.1584+1G>A	Интронная	1 (0,4)	0,1
42	c.237G>A, p.W79*	Нонсенс	1 (0,4)	0,02
43	c.2125C>T, p.R709*	Нонсенс	1 (0,4)	0,02
44	c.1735G>T, p.D579Y	Миссенс	1 (0,4)	0,04
45	c.3140-26A>G	Интронная	1 (0,4)	0,02
46	c.1399C>T, p.L467F	Миссенс	1 (0,4)	нд
47	c.1853_1863del, p.I618Rfs*2	Делеция	1 (0,4)	нд
48	c.3691del, p.S1231Pfs*4	Делеция	1 (0,4)	0,5
49	c.2491G>T, p.E831*	Нонсенс	1 (0,4)	нд
50	c.252T>A, p.Y84*	Нонсенс	1 (0,4)	0,1
51	c.1130dup, p.Q378Afs*4	Инсерция	1 (0,4)	нд
52	c.3929G>A, p.W1310*	Нонсенс	1 (0,4)	0,13
53	c.3454G>C, p.D1152H	Миссенс	1 (0,4)	0,1
54	c.580G>A, p.G194R	Миссенс	1 (0,4)	нд
55	c.3927_3938del, p.W1310_Q1313del	Делеция	1 (0,4)	нд

Таблица 1. Продолжение

№	Мутация	Тип мутации	Частота аллелей, абс. (%)	
			n = 125 [#]	По данным [3]
56	<i>c.3528del, p.K1177Sfs*15</i>	Делеция	1 (0,4)	0,1
57	c.1708_1712del, p.L570Rfs*17	Делеция	1 (0,4)	нд
58	c.2619+1G>A	Интронная	1 (0,4)	нд
59	<i>c.328G>C, p.D110H</i>	Миссенс	1 (0,4)	0,02

Примечание. [#] — частота рассчитана для 250 секвенированных аллелей. Жирным шрифтом выделены варианты гена *CFTR*, ранее не описанные в базе данных HGMD. Среди них 4 варианта представлены в российском регистре больных кистозным фиброзом за 2015 г. под номерами 34, 35, 39 и 42 (на основании результатов настоящего исследования). нд — нет данных.

Note. [#] — the frequency is calculated for 250 sequenced alleles. The boldface characters the *CFTR* gene variants previously not described in the HGMD. Four variants of them are presented in the Russian register of patients with cystic fibrosis for 2015 under the numbers 34, 35, 39, and 42 (based on the results of this study). нд — not available.

мутации, мутации, приводящие к нарушению сплайсинга, и небольшие инсерции встречались с частотой менее 10% (рис.). К первому классу патогенности (нонсенс-мутации; мутации, сдвигающие рамку считывания; мутации первого и последнего нуклеотида интронов) относятся 33/59 (55,9%) мутации, обнаруженные у 76/125 (60,8%) пациентов.

Анализ полученных результатов с учетом географического проживания пациентов и их этнической принадлежности позволил определить, что мутация *c.1545_1546del, p.Y515** обнаружена в подавляющем большинстве случаев у детей чеченской народности (ОШ 139; 95% ДИ 15–1257).

Анализ генотип-фенотипических корреляций

Установлено, что мекониевый илеус чаще встречался у пациентов с мутациями первой категории патогенности. Наличие мутаций первого класса патогенности даже в гетерозиготном состоянии статистически значимо повышало вероятность поражения печени. Развитие панкреатической недостаточности чаще встречалось у пациентов с нонсенс-мутациями и мутациями, сдвигающими рамку считывания. Наличие миссенс-мутации хотя бы по одному аллелю, напротив, было благоприятным прогностическим фактором, указывающим на низкий риск поражения поджелудочной железы. Связи мутаций первого класса патогенности с развитием бронхоэктазов и полипозного пансинусита не выявлено (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Резюме основного результата исследования

Исследовано распределение частоты аллелей и генотипов гена *CFTR* у 125 пациентов с кистозным фиброзом, на основании чего определена частота встречаемости каждого из выявленных аллелей гена *CFTR* и установлены генотип-фенотипические корреляции. Проведен анализ корреляций между различными типами мутаций с наличием панкреатической недостаточности, поражениями печени, наличием бронхоэктазов и полипозного пансинусита. Анализ полученных данных с учетом этнической принадлежности пациентов позволил впервые описать мутацию *c.1545_1546del, p.Y515** как мутацию, характерную для чеченского этноса.

Обсуждение основного результата исследования

Результаты большинства российских исследований, имеющих молекулярно-генетическую направленность, отражаются в ежегодно публикуемом отчете Регистра больных кистозным фиброзом в РФ, тем самым объективизируется качественный и количественный состав мутаций гена *CFTR* в РФ [15]. По всей видимости, значительные различия в частоте встречаемости выявленных нами делеций *c.1521_1523del, p.F508del* и *c.1545_1546del, p.Y515** в сравнении с данными Регистра могут быть связаны с большим числом больных детей чеченской национальности, включенных в наше исследование, а также со значительным числом генотипов, представленных в Регистре лишь одним аллелем. Относительная частота большинства обнаруженных в данном исследовании мутаций превышает частоту этих же мутаций, приведенных в Регистре. Это также может свидетельствовать о генетической недообследованности российских пациентов ввиду использования большинством лабораторий лишь методики выявления частых мутаций. Кроме того, в Регистре отсутствует частота встречаемости 17 (29,3%) мутаций гена *CFTR*, обнаруженных нами на сравнительно

Рис. Частота встречаемости различных типов мутаций у 125 детей с кистозным фиброзом

Fig. The incidence of different mutation types in 125 children with cystic fibrosis

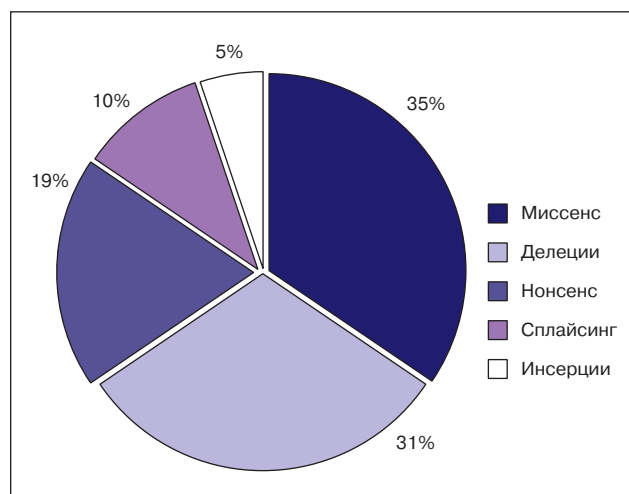


Таблица 2. Генотип-фенотипические корреляции у детей с кистозным фиброзом
Table 2. Genotype-phenotype correlations in children with cystic fibrosis

Фенотипический признак	Тип мутаций	Отсутствие/наличие признака, абс (%)		ОШ (95% ДИ)	p
		Нет	Есть		
Мекониевый илеус	Мутации класса 1	48 (41,0)	10 (8,5)	3,9 (1,0–15,0)	0,043
	Другие мутации	56 (47,9)	3 (2,6)		
Панкреатическая недостаточность	Мутации класса 1	9 (7,3)	68 (54,3)	4,4 (1,8–11,1)	0,001
	Другие мутации	17 (13,8)	29 (23,5)		
Панкреатическая недостаточность	Миссенс-мутации	5 (4,1)	8 (6,5)	0,47 (0,14–0,55)	0,302
	Другие мутации	21 (17,1)	89 (72,4)		
Цирроз печени	Мутации класса 1	44 (35,8)	13 (10,6)	19,2 (2,4–152,1)	0,001
	Другие мутации	65 (52,8)	1 (0,8)		
Бронхоэктазы	Мутации класса 1	34 (27,6)	40 (32,5)	1,2 (0,6–2,4)	0,661
	Другие мутации	25 (20,3)	24 (19,5)		
Полипы	Мутации класса 1	49 (39,8)	25 (20,3)	0,9 (0,4–1,9)	0,771
	Другие мутации	34 (27,6)	15 (12,2)		

Примечание. В статистический анализ по показателю «мекониевый илеус» включено 117 пациентов, в анализ по панкреатической недостаточности, циррозу печени, бронхоэктазам и полипам — 123 пациента. Для остальных пациентов данные о фенотипическом признаке отсутствовали.

Note. The statistical analysis for meconium ileus indicator included 117 patients; the analysis for pancreatic deficiency, cirrhosis, bronchiectases and polyps — 123 patients. For the rest of the patients, there was no evidence of a phenotypic trait.

небольшой, по меркам Регистра, выборке пациентов. При этом 12 (21,1%) вариантов гена *CFTR* отсутствуют в двух ведущих международных базах данных по мутациям — HGMD [24] и *cftr2.org*.

Обращает на себя внимание тот факт, что три нон-сенс-мутации — *c.237G>A*, *p.W79**, *c.252T>A*, *p.Y84** и *c.1488G>A*, *p.W496**, две из которых описаны нами, содержатся в Регистре, однако до сих пор не упомянуты в ведущих международных базах данных. Кроме того, делеция *c.1243_1247del*, *p.N415** и миссенс-мутация *c.3196C>T*, *p.R1066C*, каждая из которых встретилась у четырех обследованных нами пациентов, не представлены в базе *cftr2.org*, однако уже неоднократно встречались среди российских больных ранее [25]. Таким образом, 11 вариантов гена *CFTR* — *c.2619+1G>A*; *c.353del*, *p.S118Lfs*6*; *c.1708_1712del*, *p.L570Rfs*17*; *c.3927_3938del*, *p.W1310_Q1313del*; *c.580G>A*, *p.G194R*; *c.1853_1863del*, *p.I618Rfs*2*; *c.4298A>G*, *p.E1433G*; *c.1219del*, *p.E407Nfs*35*; *c.237G>A*, *p.W79**; *c.831G>A*, *p.W277** и *c.1488G>A*, *p.W496** — являются новыми, не описанными ранее вариантами гена *CFTR*. Патогенность всех 11 вариантов была подтверждена сегрегационным анализом. Все эти варианты являются синглтонами.

Большая доля выявленных нами мутаций определяет тяжелый фенотип пациентов, располагаясь на стыке экзонов и интронов и нарушая сплайсинг, приводя к сдвигу рамки считывания и преждевременной терминации трансляции. Логично, что и крупные перестройки гена (в нашем исследовании делеция второго и третьего экзонов гена *CFTR*) также относятся к мутациям, вызывающим тяжелый фенотип. Генотипы, формирующиеся двумя такими мутациями, сопровождаются классическим

течением заболевания с развитием панкреатической недостаточности и, соответственно, необходимостью приема адекватных доз панкреатических ферментов с первых недель жизни [26].

Для мутаций первого класса патогенности характерно существенное изменение аминокислотной последовательности кодируемого белка и его функциональной активности, что в свою очередь может проявляться тяжелым клиническим течением [27]. С целью проверки этой гипотезы мы провели статистическую обработку полученных данных для установки возможных корреляций между выявленным генотипом и фенотипическими проявлениями болезни у обследованных пациентов. Обнаружены следующие закономерности:

- взаимозависимость между наличием мутаций первой категории патогенности и развитием у пациентов мекониевого илеуса, что частично совпадало с результатами исследования российских авторов, опубликованного в 2016 г. [28];
- мутации первого класса патогенности ассоциированы с наличием у пациентов панкреатической недостаточности и цирроза печени.

Таким образом, настоящее исследование на выборке из 125 российских детей, больных муковисцидозом, продемонстрировало корреляции тяжести клинической картины кистозного фиброза с классом патогенности выявленных мутаций. Кроме того, геногеографическая оценка полученных данных с последующим анализом национальностей впервые позволили описать мутацию *c.1545_1546del*, *p.Y515** как мутацию, характерную для чеченского этноса, что указывает на эффект основателя.

Среди выявленных нами патогенных вариантов гена *CFTR* мутации *p.E831**, *p.D110H*, *p.S945L*, *p.R117C*,

c.3718–2477C>T и p.D1152H входят в список мутаций, одобренных для назначения препарата ивакафтор. Потенциаторы МВТР, направленные на активацию функции ионного канала (например, ивакафтор), корректоры, улучшающие процессинг и транспортировку МВТР к поверхности клетки (например, люмакафтор), и малые молекулы, направленные на предотвращение преждевременной терминации трансляции у пациентов с нонсенс-мутациями, проходят стадию разработки либо уже одобрены для терапии кистозного фиброза [22].

Ограничения исследования

В исследование были включены только дети, проживающие на территории Российской Федерации на момент госпитализации. Выявленную частоту мутаций в гене *CFTR* невозможно экстраполировать на всю популяцию российских детей ввиду малочисленности исследуемой выборки. В литературе описаны мутации гена *CFTR*, располагающиеся глубоко в интронных областях гена, варианты, представляющие собой протяженные делеции/дупликации, а также структурные перестройки гена [24]. Данные варианты не могли быть выявлены ввиду ограничений метода массового параллельного секвенирования. Для их обнаружения необходимо использование других методов исследования, например количественной ПЦР в режиме реального времени и мультиплексной лигазной ПЦР (MLPA). Кроме того, используемый в исследовании метод не позволяет выявлять количество повторяющихся элементов генома (экспансии ди-/тринуклеотидных повторов), уровень метилирования ДНК, сбалансированные хромосомные перестройки и полиплоидии, а также однородительские дисомии, делеции и инсерции, протяженностью более 20 п.н., в некоторых случаях — мутации в генах, имеющих псевдогены, мозаичные варианты мутаций, мутации в интронных областях, находящихся на расстоянии более 20 п.н. от экзонов, а также мутации в других областях генома, не являющихся таргетными, эпигенетические и ненаследственные (соматические) мутации. И, наконец, еще одним ограничением исследования являлось отсутствие многофакторного анализа генотип-фенотипических корреляций с учетом всех особенностей течения заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярно-генетическое обследование 125 российских детей с кистозным фиброзом позволило выявить 59 различных мутаций гена *CFTR*, 11 из которых оказались новыми, не описанными ранее: c.2619+1G>A; c.353del, p.S118Lfs*6; c.1708_1712del, p.L570Rfs*17; c.3927_3938del, p.W1310_Q1313del; c.580G>A, p.G194R; c.1853_1863del, p.I618Rfs*2; c.4298A>G, p.E1433G; c.1219del, p.E407Nfs*35; c.237G>A, p.W79*; c.831G>A, p.W277*; c.1488G>A, p.W496*. Мутация

c.1545_1546del, p.Y515* характерна для чеченской популяционной группы. Было показано, что такие фенотипические признаки кистозного фиброза, как развитие мекониевого илеуса, панкреатическая недостаточность и наличие цирроза печени, чаще встречаются у пациентов с мутациями первой категории патогенности, а гетерозиготные миссенс-мутации, в свою очередь, являются благоприятным прогностическим фактором отсутствия поражения поджелудочной железы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

FINANCING SOURCE

Not specified.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

С. А. Красовский — чтение лекций для компании Chiesi.

О. И. Симонова — чтение лекций для компании ООО «Генфа».

Л. С. Намазова-Баранова — получение исследовательских грантов от фармацевтических компаний Пьер Фабр, Genzyme Europe B.V., ООО «Астра зенека Фармасьютикалз», Gilead / PRA «Фармасьютикал Рисерч Ассошиэйтс СиАйЭс», Teva Branded Pharmaceutical products R&D, Inc. / ООО «ППД Девелопмент (Смоленск)», «Сталлержен С.А.» / «Квинтайлс ГезмБХ» (Австрия).

Остальные авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

CONFLICT OF INTERESTS

Stanislav A. Krasovskiy — lecturing for Chiesi.

Olga. I. Simonova — lecturing for Genfa LLC.

Leyla S. Namazova-Baranova — receiving research grants from pharmaceutical companies Pierre Fabre, Genzyme Europe B. V., AstraZeneca Pharmaceuticals LP, Gilead / PRA Pharmaceutical Research Associates CAS, Teva Branded Pharmaceutical products R&D, Inc. / PPD Development (Smolensk) LLC, Stallergen SA / Quintiles GesmbH (Austria).

The other contributors confirmed the absence of a reportable conflict of interests.

ORCID

Ю. В. Горинова [http:// orcid.org/ 0000-0002-2209-7531](http://orcid.org/0000-0002-2209-7531)

К. В. Савостьянов [http:// orcid.org/0000-0003-4885-4171](http://orcid.org/0000-0003-4885-4171)

А. А. Пушков [http:// orcid.org/0000-0001-6648-2063](http://orcid.org/0000-0001-6648-2063)

А. Г. Никитин [http:// orcid.org/0000-0001-9672-3383](http://orcid.org/0000-0001-9672-3383)

Е. Л. Пеньков [https:// orcid.org/0000-0001-8250-5405](https://orcid.org/0000-0001-8250-5405)

С. А. Красовский [http:// orcid.org/0000-0001-9642-0947](http://orcid.org/0000-0001-9642-0947)

О. И. Симонова [http:// orcid.org/ 0000-0002-2367-9920](http://orcid.org/0000-0002-2367-9920)

Л. С. Намазова-Баранова [http:// orcid.org/0000-0002-2209-7531](http://orcid.org/0000-0002-2209-7531)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Капранов Н.И., Каширская Н.Ю. Муковисцидоз. — М.: Медпрактика-М; 2014. — 672 с. [Kapranov NI, Kashirskaya NYu. *Mucoviscidosis*. Moscow: Medpraktika-M; 2014. 672 p. (In Russ).]
2. Farrell P. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros*. 2008;7(5):450–453. doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.007.
3. Красовский С.А., Черняк А.В., Каширская Н.Ю., и др. Муковисцидоз в России: Создание национального регистра // *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. — 2014. — Т. 93. — № 4 — С. 44–55. [Krasovsky SA, Chernyak AV, Kashirskaya NYu, et al. Cystic fibrosis in Russian Federation: establishment of the national registry. *Pediatrriia*. 2014;93(4):44–55. (In Russ).]
4. Каширская Н.Ю., Красовский С.А., Черняк А.В., и др. Динамика продолжительности жизни больных муковисцидозом, проживающих в Москве, и ее связь с получаемой терапией: ретроспективный анализ за 1993–2013 гг. // *Вопросы современной педиатрии*. — 2015. — Т. 14. — № 4 — С. 503–508. [Kashirskaya NY, Krasovsky SA, Chernyak AV, et al. Trends in life expectancy of cystic fibrosis patients in Moscow and their connection with the treatment received: retrospective analysis for 1993–2013. *Current pediatrics*. 2015;14(4):503–508. (In Russ).] doi: 10.15690/vsp.v14.i4.1390.
5. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066–1073. doi: 10.1126/science.2475911.
6. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073–1080. doi: 10.1126/science.2570460.
7. genet.sickkids.on.ca [Internet]. Cystic Fibrosis Mutation Database [cited 2017 Dec 24]. Available from: www.genet.sickkids.on.ca/cftr.
8. Audrezet MP, Dabricot A, Le Marechal C, Ferec C. Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *J Mol Diagn*. 2008;10(5):424–434. doi: 10.2353/jmolx.2008.080056.
9. Le Marechal C, Audrezet MP, Quere I, et al. Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC): major implications for genetics counseling. *Hum Genet*. 2001;108(4):290–298. doi: 10.1007/s004390100490.
10. Galvin P, Clarke L, Harvey S, Amaral M. Microarray analysis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2004;3(2):29–33. doi: 10.1016/j.jcf.2004.05.006.
11. Баранов А.А., Капранов Н.И., Каширская Н.Ю., и др. Проблемы диагностики муковисцидоза и пути их решения в России // *Педиатрическая фармакология*. — 2014. — Т. 11. — № 6 — С. 16–23. [Baranov AA, Kapranov NI, Kashirskaya NY, et al. Diagnostic problems of mucoviscidosis and ways of solution in Russia. *Pediatric pharmacology*. 2014;11(6):16–23. (In Russ).] doi: 10.15690/pf.v11i6.1211.
12. Lucarelli M, Narzi L, Piergentili R, et al. A 96-well formatted method for exon and exon/intron boundary full sequencing of the CFTR gene. *Anal Biochem*. 2006;353(2):226–235. doi: 10.1016/j.ab.2006.03.022.
13. A new targeted CFTR mutation panel based on next-generation sequencing technology. *J Mol Diagn*. 2017;19(5):788–800. doi: 10.1016/j.jmolx.2017.06.002.
14. Schrijver I, Rappahahn K, Pique L, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification identification of whole exon and single nucleotide deletions in the CFTR gene of Hispanic individuals with cystic fibrosis. *J Mol Diagn*. 2008;10(4):368–375. doi: 10.2353/jmolx.2008.080004.
15. Mehdizadeh Hakkak A, Keramatipour M, Talebi S, et al. Analysis of CFTR gene mutations in children with cystic fibrosis, first report from North-East of Iran. *Iran J Basic Med Sci*. 2013;16(8):918–921.
16. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2015 год / Под ред. Е.И. Кондратьевой, С.А. Красовского, А.Ю. Воронковой, и др. — М.: Медпрактика-М; 2016. — 72 с. [Registry of cystic fibrosis patients in Russian Federation. 2015. Ed by E.I. Kondrat'eva, S.A. Krasovsky, A.Yu. Voronkova, et al. Moscow: Medpraktika-M; 2016, 72 p. (In Russ).]
17. Gurwitz D, Corey M, Francis PW. Perspectives in cystic fibrosis. *Pediatr Clin North Am*. 1979;26(3):603–615. doi: 10.1016/S0031-3955(16)33752-X.
18. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet*. 2003;67(Pt 5):471–485. doi: 10.1046/j.1469-1809.2003.00028.x.
19. Green DM, McDougal KE, Blackman SM, et al. Mutations that permit residual CFTR function delay acquisition of multiple respiratory pathogens in CF patients. *Respir Res*. 2010;11:140. doi: 10.1186/1465-9921-11-140.
20. Bombieri C, Seia M, Castellani C. Genotypes and phenotypes in cystic fibrosis and cystic fibrosis transmembrane regulator-related disorders. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015;36(2):180–193. doi: 10.1055/s-0035-1547318.
21. Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet*. 2015;16(1):45–56. doi: 10.1038/nrg3849.
22. Elborn JS. Personalised medicine for cystic fibrosis: treating the basic defect. *Eur Respir Rev*. 2013;22(127):3–5. doi: 10.1183/09059180.00008112.
23. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, et al. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut*. 2006;55(3):403–408. doi: 10.1136/gut.2005.069153.
24. hgmd.cf.ac.uk [Internet]. HGMD® Professional 2017.4. [cited 2018 Feb 20]. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
25. Одинокова О.Н. Расширенный поиск мутаций гена CFTR в выборке больных муковисцидозом из Сибирского региона. / VII ежегодная Северо-Западная с международным участием научно-практическая конференция по муковисцидозу «Практика лечения муковисцидоза»; Май 27–28, 2016; Санкт-Петербург. [Odinokova ON. Rasshirennyi poisk mutatsii gena CFTR v vyborke bol'nykh mukovistsidozom iz Sibirskogo regiona. (Conference proceedigs) VII ezhegodnaya Severo-Zapadnaya s mezhdunarodnym uchastiem nauchno-prakticheskaya konferentsiya po mukovistsidozu «Praktika lecheniya mukovistsidoz»; 2016 may 27–28; St. Petersburg. (In Russ).] Доступно по: <http://ostrovaru.com/%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%BC%D1%8B/2015/01/08/%D0%BA%D0%BE%D0%BD%D1%84%D0%B5%D1%80%D0%B5%D0%BD%D1%86%D0%B8%D0%B8-%D0%B8-%D1%81%D0%B5%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%B0%D1%80%D1%8B/>. Ссылка активна на 12.02.2018.
26. Sinaasappel M, Stern M, Littlewood J, et al. Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus. *J Cyst Fibros*. 2002;1(2):51–75. doi: 10.1016/S1569-1993(02)00032-2.
27. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. 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;17(5):405–424. doi: 10.1038/gim.2015.30.
28. Кондратьева Е.И., Шерман В.Д., Амелина Е.Л., и др. Клинико-генетическая характеристика и исходы мекониевого илеуса при муковисцидозе // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. — 2016. — Т. 61. — № 6 — С. 77–81. [Kondratyeva EI, Sherman VD, Amelina EL, et al. The clinical and genetic characteristics and outcomes of meconium ileus in cystic fibrosis. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii (Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics)*. 2016;61(6):77–81. (In Russ).] doi: 10.21508/1027-4065-2016-61-6-77-81.