ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНА *CFTR* У ДЕТЕЙ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

А. И. Никифорова[1] ✉, Д. Д. Абрамов[1], Г. Ю. Зобкова[1], А. В. Горяинова[2], С. Ю. Семыкин[2], Е. Шубина[3], А. Е. Донников[3], Д. Ю. Трофимов[1,3]

[1] ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва

[2] Российская детская клиническая больница Российского научно-исследовательского университета имени Н. И. Пирогова, Москва

[3] Лаборатория молекулярно-генетических методов, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва

Муковисцидоз (МВ) — одно из наиболее распространенных моногенных заболеваний человека. Определение частоты мутаций моногенного заболевания для конкретных популяций позволяет оптимизировать ДНК-диагностику, сократив ее себестоимость и время проведения. В статье представлены результаты ретроспективного исследования гена *CFTR* у 191 ребенка со смешенной формой МВ. Для определения 24 наиболее распространенных мутаций *CFTR* использовали диагностическую ПЦР-панель, а минорные варианты выявляли методом высокопроизводительного секвенирования. С помощью диагностической панели в выборке выявлено 18 типичных мутаций гена *CFTR*: F508del (с аллельной частотой 54,7%), dele 2,3 (21kb) (7,3%), 2143delT (3,4%), 2184insA (3,4%), 1677delTA (2,4%), N1303K (2,1%), 3849+10kbC>T (2,1%), E92K (2,1%), G542X (1,6%), W1282X (1,6%), S1196X (1,3%), R334W (1,0%), 394delTT(0,8%), 3944delGT (0,8%), 3821delT (0,5%), 2789+5G>A (0,5%), 621+1G>T(0,3%), 2183AA>G (0,3%). В результате секвенирования обнаружено 24 генетических варианта *CFTR* с потенциальной клинической значимостью. Обнаружено 8 минорных вариантов *CFTR*, до этого не отмеченных у пациентов в РФ, в том числе 4 новых мутации гена *CFTR* — p.Glu819Ter, p.Gln378Ter, p.Val1360Phefs и p.Lys1365Argfs.

Ключевые слова: муковисцидоз, *CFTR*, мутации *CFTR*, российская популяция больных муковисцидозом

Конфликт интересов: исследование проведено при участии сотрудников компании ДНК-Технология.

✉ **Для корреспонденции:** Никифорова Алёна Игоревна
Каширское ш., д. 24, г. Москва, 115478; nikiforova@dna-technology.ru

Статья получена: 10.07.2018 **Статья принята к печати:** 03.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.037

DETECTION OF *CFTR* MUTATIONS IN CHILDREN WITH CYSTIC FIBROSIS

Nikiforova AI[1] ✉, Abramov DD[1], Zobkova GYu[1], Goriainova AV[2], Semykin SYu[2], Shubina J[3], Donnikov AE[3], Trofimov DYu[1,3]

[1] DNA-Technology LLC, Moscow

[2] Russian Children's Clinical Hospital, Pirogov Russian National Medical Research University, Moscow

[3] Laboratiry of Molecular Genetics, Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

Cystic fibrosis (CF) is one of the most common monogenic disorders of humans. The knowledge of population frequency of a mutant genotype causing a monogenic disease helps to optimize DNA testing and to reduce its costs and time required for the procedure. This article presents the results of a retrospective study of the *CFTR* gene in 191 children with mixed manifestations of CF. To screen for 24 most common mutations, we used the diagnostic PCR panel; minor mutations were detected by next generation sequencing. The diagnostic panel allowed us to identify 18 typical *CFTR* mutations, including F508del (allelic frequency of 54.7%), dele 2,3 (21kb) (7.3%), 2143delT (3.4%), 2184insA (3.4%), 1677delTA (2.4%), N1303K (2.1%), 3849+10kbC>T (2.1%), E92K (2.1%), G542X (1.6%), W1282X (1.6%), S1196X (1.3%), R334W (1.0%), 394delTT(0.8%), 3944delGT (0.8%), 3821delT (0.5%), 2789+5G>A (0.5%), 621+1G>T(0.3%), and 2183AA>G (0.3%). Sequencing revealed the presence of 24 potentially pathogenic *CFTR* variants in the sample. We also discovered 8 minor *CFTR* variants previously unseen in Russian patients with CF, including 4 new *CFTR* mutations: p.Glu819Ter, p.Gln378Ter, p.Val1360Phefs, and p.Lys1365Argfs.

Keywords: cystic fibrosis, *CFTR*, *CFTR* mutations, Russian population

Conflict of interests: the study was conducted in collaboration with DNA-Technology staff.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alena I. Nikiforova
Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115478; nikiforova@dna-technology.ru

Received: 10.07.2018 **Accepted:** 03.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.037

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз, — наследственное заболевание, характеризующееся системным поражением экзокринных желез организма, проявляющееся тяжелыми нарушениями функций органов дыхания и пищеварительного тракта. МВ наследуется по аутосомно-рецессивному типу и обусловлен патогенными мутациями в гене трансмембранного регулятора муковисцидоза (*CFTR*) [1]. Наиболее частая причина возникновения МВ — мутация F508del (rs113993960), приводящая к делеции фенилаланина в 508 положении [1–3]. В настоящее время МВ неизлечим и требует проведения комплексных терапевтических мер на протяжении всей жизни пациента.

МВ входит в число наиболее частых наследственных заболеваний. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, в среднем в мире МВ встречается с частотой 1:2500–3000 новорожденных [3]. В национальном регистре за 2015 г. в Российской Федерации официально зарегистрировано 2916 больных муковисцидозом [4]. В 2016 г. частота встречаемости МВ у новорожденных РФ составила 1:8788 [5].

Крайне важно диагностировать МВ еще на доклиническом этапе заболевания — своевременно начатое лечение существенно снижает риск развития необратимых изменений органов дыхательной системы и ЖКТ ребенка, что, несомненно, отражается на качестве жизни самого больного и его близких [6].

Инструментом ранней диагностики МВ служит неонатальный скрининг (проводится в РФ с 2006 г.). В РФ он включает комплекс диагностических исследований, выполняемых последовательно: тест на содержание иммунореактивного трипсина (ИРТ) в крови, повторный тест на ИРТ, потовый тест на содержание ионов хлора (назначается при превышении пороговых значений ИРТ) [7].

Молекулярно-генетическая диагностика, или ДНК-диагностика (определение мутаций в гене *CFTR*), при МВ проводится в несколько этапов. В первую очередь, осуществляется поиск частых мутаций с использованием специфических диагностических панелей [3, 7, 8]. Если частые мутации *CFTR* идентифицированы не были, проводят секвенирование гена [3, 9], затем при необходимости специальными методами осуществляется поиск крупных структурных вариаций гена CFTR [3].

В настоящее время ДНК-диагностика МВ не является строго обязательной, чаще выполняется при получении неоднозначного результата исследования или невозможности проведения потовой пробы. Тем не менее характер мутаций является одним из факторов, предопределяющих тяжесть течения заболевания [3], а подтверждение генотипа позволяет рекомендовать пациентам прицельную фармакогенетическую терапию [2, 3]. Одно из преимуществ ДНК-диагностики состоит в точности метода (в отличие от потовой пробы, результат исследования последовательности гена не зависит от физиологических особенностей пациента).

На сегодняшний день в РФ можно констатировать недостаточную доступность генетической диагностики муковисцидоза. Однако за последние годы был накоплен существенный объем данных по генетической эпидемиологии МВ в России. Определены наиболее распространенные варианты мутаций гена *CFTR* [3, 8], установлены особенности генетики МВ у различных этнических групп, а также описаны межрегиональные различия частот встречаемости патогенных аллелей [8, 10, 11] (например, мутация E92K (rs121908751), которая наиболее часто встречается среди представителей популяции Чувашии). С 2011 г. В национальном регистре больных МВ ведется учет данных о мутациях гена *CFTR* [12]. На платформе открытой международной базы данных генетических вариантов LOVD v.3.0 (Leiden Open Variation Database) создан и дополняется реестр аллельных вариантов гена *CFTR*, представленных у жителей РФ, под названием «SeqDB-LOVD»/«Консенсус по клиническим эффектам генетических вариантов» [13]. В «SeqDB-LOVD» представлена информация по клинической значимости различных вариантов гена, в том числе популяционно редких. Последнее стало возможным за счет активного внедрения в исследовательскую практику технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS).

Согласно данным «SeqDB-LOVD» на текущий момент в РФ зарегистрировано более 220 клинически значимых мутаций гена *CFTR*, при этом новые неописанные аллельные варианты регистрируются в сравнительно малочисленных выборках [9]. Учитывая данное наблюдение, можно предполагать, что действительное разнообразие патогенных мутаций *CFTR* существенно выше.

В отделении педиатрии Российской детской клинической больницы имени Н. И. Пирогова ежегодно проходят наблюдение около 500 детей из разных регионов РФ, в том числе до 100 пациентов с диагнозом МВ. С 2014 по 2017 г. в отделение поступило более 200 детей с клинической картиной МВ, в большинстве случаев с неполными данными генотипирования (молекулярно-генетическая диагностика не была проведена, либо у пациента была известна мутация в одном из аллелей гена *CFTR*). Целью настоящей работы стало определение спектра патогенных вариантов гена *CFTR* в выборке из 191 пациента со смешанной формой МВ и тяжелым течением.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для проведения ретроспективного исследования отобраны образцы крови 191 ребенка с диагнозом муковисцидоз, с тяжелым или среднетяжелым течением заболевания, проходивших лечение в Российской детской клинической больнице РНИМУ им. Н. И. Пирогова в период с 2014 г. по начало 2017 г. В большинстве случаев пациенты не имели подтвержденного генетического диагноза. В исследованную группу вошли дети обоих полов из 57 субъектов РФ (Московская область и Ставропольский край были представлены в выборке 15 пациентами, другие регионы РФ — 1–9 пациентами). Критерии включения: клинически установленный диагноз муковисцидоз смешанная форма, тяжелое течение (Е 84.8). Критерии исключения: клинически установленный диагноз муковисцидоз, преимущественно легочная форма (Е 84.0) и пациенты с легкими или пограничными клиническими проявлениями кистозного фиброза. Основную часть выборки составили неродственные пациенты, в 4 случаях исследованы пары сибсов. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России (протокол № 172 от 19.02.18).

Забор биоматериала пациентов (периферическая кровь) проводили на базе детской клинической больницы им. Н. И. Пирогова. Геномную ДНК пациентов выделяли из образцов цельной крови, архивированной в Биобанке Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова, с помощью комплекта реагентов «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» (ДНК-Технология, Россия) согласно инструкции производителя.

Для определения наиболее распространенных мутаций в гене *CFTR* использовали комплекты реагентов «Генетика наследственных заболеваний. Муковисцидоз Скрин» и «Генетика наследственных заболеваний. Муковисцидоз — редкие мутации» (ДНК-Технология, Россия). Комплекты реагентов разработаны для определения 8 (F508del, dele 2,3 (21kb), 2143delT, 1677delTA, N1303K, 3849+10kbC>T, E92K, W1282X) и 16 (2184insA G542X, S1196X, R334W, 394delTT, 3944delGT, 3821delT, 2789+5G>A, 621+1G>T, 2183AA>G, L138ins, R117H, 604insA, 3667insTCAA, R553X, K598ins) вариантов мутаций в гене *CFTR* соответственно (здесь и далее приведены тривиальные названия мутаций, определяемых в составе панелей). Принцип работы наборов основан на методе «примыкающих проб» (kissing probes) [14] и включает: ПЦР-амплификацию целевого участка гена, гибридизацию последовательность-специфичных зондов с продуктами амплификации и регистрацию кривых плавления зондов в ходе температурной денатурации (рис. 1) [15, 16]. ПЦР и определение температуры плавления зондов проводили при помощи детектирующего амплификатора DTprime (ДНК-Технология, Россия).

Поиск редких и новых вариантов *CFTR* проводили методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Ion Torrent™ (Thermo Fisher Scientific, США). Целевые участки включали в себя кодирующие области (27 экзонов гена *CFTR*), интрон-экзонные границы и область промотера гена. Дополнительно в панель включен фрагмент для идентификации интронного варианта 3849+10kbC>T (rs75039782) патогенного значения. Для определения распространенной у представителей российской популяции делеции 2–3 экзонов *CFTR* — dele 2,3 (21 kb) в панель мишеней были добавлены области, охватывающие ее границы (табл. 1).

Обогащение целевых фрагментов перед секвенированием проводили методом ПЦР. В ПЦР брали не менее 10 нг геномной ДНК. Лигирование адаптеров к ПЦР-продуктам проводили с использованием Т4 ДНК-лигазы (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Качество библиотек фрагментов ДНК определяли с помощью системы Agilent 2100 Bioanalyzer и набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США). Для постановки высокопроизводительного секвенирования использовали платформу Ion PGM Next-Generation Sequencing Systems (Ion Torrent™, США), набор Ion PGM™ Template OT2 400 Kit (Ion Torrent™, США). Высокопроизводительное секвенирование выполняли на базе лаборатории молекулярно-генетических методов Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова.

Первичный анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения Torrent server 4.4.3. Выравнивание на референсный геном версии GRCh37/hg19 выполняли с помощью программного модуля TMAP (в референсный геном был внесен фрагмент, соответствующий «fusion-ампликону», маркирующему наличие делеции CFTRdele 2,3 (21 kb), для идентификации генетических вариантов был использован программный модуль Torrent Variant Caller 5.4.0.46. Последующий анализ проводили с помощью программных модулей, разработанных авторами. Медиана покрытия целевых участков составила 4500 прочтений, минимальное покрытие — 500. Для определения патогенности использовали базу данных dbSNP Build 147, локус-специфичные базы данных «CFTR1» [17], «CFTR2» [18], «SeqDB-LOVD» [13], а также данные литературы. Подтверждение генетических вариантов проводили методом секвенирования ДНК по Сэнгеру (по обеим цепям) на секвенаторе ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США) с оригинальными реагентами, согласно рекомендациям производителя. Во всех случаях были получены идентичные результаты генотипирования.

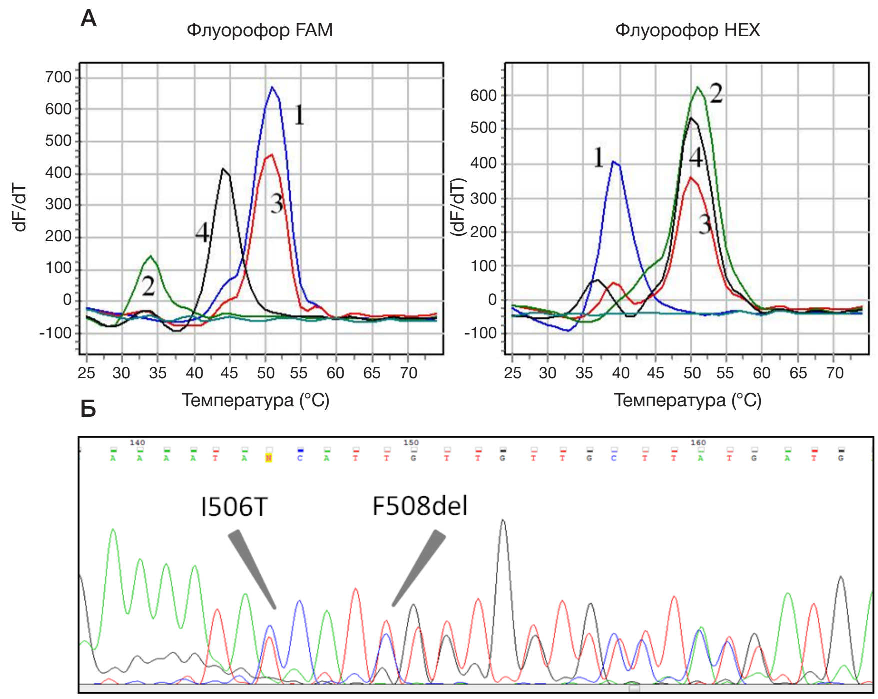

Рис. 1. А. Кривые плавления для разных вариантов генотипа, регистрируемые при определении мутации F508del (rs113993960) и пример сочетания в генотипе вариантов F508del и I506T (rs397508224). Канал FAM/HEX — регистрация плавления зондов комплементарных последовательности гена без мутации и при ее наличии соответственно. Динамика плавления зондов регистрируется в диапазоне от 25 до 75 °C и имеет отличительные особенности в различных вариантах генотипа. 1 — отсутствие мутации в генотипе; 2 — гомозигота по мутации; 3 — гетерозигота по мутации; 4 — случай сочетания в генотипе мутаций F508del и I506T (положение максимума кривых плавления не соответствует стандартным вариантам). **Б**. Сиквенсная хроматограмма фрагмента последовательности ДНК с сочетанием F508del и I506T

Таблица 1. Последовательности праймеров для амплификации участков, включающих области границ делеции CFTRdele 2,3 (21 kb)

Праймер	Последовательность
del2,3F1	tcc ctt ggt aaa att aag cct cat g
del2,3R1	ccc tcc tct gat tcc aca agg tat
del2,3F2	ccc aaa aac tat tgt cag act ctg ct
del2,3R2	cac cta cac tca gaa ccc atc ata gg

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате ПЦР-генотипирования в выборке было выявлено 18 мутаций гена *CFTR* (табл. 2). В гомозиготном состоянии определены следующие мутации: F508del — 70 случаев; E92K, 1677delTA и dele 2,3 (21kb) — в 3 случаях каждая, W1282X — 1 случай. У 144 пациентов (75,4%) удалось определить две патогенные мутации *CFTR*, у 41 пациента — 1 мутацию (21,5%), не было выявлено мутаций у 6 пациентов (3,1%). У 112 пациентов (58,6%) две патогенные мутации были выявлены с помощью панели для определения 8 наиболее частых мутаций *CFTR* (см. Пациенты и методы).

В 99% случаев по каждой мутации панели был получен однозначный результат типирования. В двух образцах (1% случаев) при определении одного из вариантов кривые плавления не соответствовали стандартным. В результате секвенирования прямым методом в данных образцах на участках гибридизации аллель-специфичных зондов были выявлены нецелевые однонуклеотидные замены (SNP) (рис. 1). В 47 случаях, для которых патогенные мутации не были определены ПЦР-методом, было проведено исследование гена *CFTR* методом NGS. В итоге секвенирования у пациентов суммарно выявлено более 300 генетических вариантов, 24 из которых имеют потенциальное клиническое значение (учтены варианты, описанные в локус-специфичных базах данных как патогенные, либо нонсенс, либо варианты сдвига рамки считывания (табл. 2). Несколько вариантов отмечено более одного раза, наиболее часто (у 5 неродственных пациентов) зарегистрирована патогенная мутация p.Ser466Ter (rs121908805) в составе сложного аллеля (табл. 3).

Были выявлены четыре ранее не описанные мутации *CFTR*: c.4093delA/p.Lys1365Argfs и c.4078delG/p.Val1360Phefs (мутации сдвига рамки считывания), c.1132C>T/p.Gln378Ter и c.2455G>T/p.Glu819Ter (нонсенс-мутации) патогенного значения (табл. 4). Новые варианты выявлены в гетерозиготном состоянии в сочетании с одной из частых мутаций гена (табл. 3). Данные варианты *CFTR* зарегистрированы нами в аллель-специфичной базе данных платформы LOVD.

В двух образцах при верификации результатов высокопроизводительного секвенирования методом Сэнгера в экзоне 24 выявлена делеция, приводящая к сдвигу рамки считывания p.Ile1214Phefs (rs397508630).

В результате проведения расширенной ДНК-диагностики две и одна патогенные мутации определены у 178 пациентов и у 13 пациентов соответственно. Отметим, что наиболее часто встречающаяся в РФ мутация F508del (rs113993960) была выявлена у 139 пациентов из 49 регионов РФ. У четырех неродственных пациентов из Ингушетии и Чечни выявлена мутация 1677delTA (rs121908776). У трех из четырех пациентов из Чувашии в гомозиготном состоянии выявлена мутация E92K.

Доля пациентов с двумя «тяжелыми» мутациями *CFTR* (I–III классы *CFTR* [19]) составила 69,6%. Доля пациентов с одной или двумя «мягкими» мутациями (IV–V классы *CFTR* [19]) составила 8,4%, с одной или двумя мутациями «неопределенной клинической тяжести» — 22%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследованной группе пациентов выявлено 36 различных патогенных мутаций гена *CFTR*, большинство из них относится к распространенным в РФ вариантам [4, 8]. F508del (rs113993960) — наиболее частый вариант в выборке как в целом, так и в группах пациентов из регионов с преобладанием русского населения. Частоты остальных мутаций выборки соответствуют данным по российской популяции больных муковисцидозом [4, 8]. 10 наиболее частых мутации выборки соответствует списку национально регистра [4]. Было отмечено преобладание мутации 1677delTA (rs121908776) у группы детей из регионов Северного Кавказа. У детей из Чувашии зарегистрирована характерная этническая мутация E92K (rs121908751). На основании полученных результатов исследованная группа детей может быть рассмотрена как репрезентативная выборка жителей РФ, больных МВ, результаты генотипирования которой позволяют пополнить информацию о генетическом разнообразии МВ в России.

Таблица 2. Результаты ПЦР-генотипирования у 191 пациента с диагнозом муковисцидоз

Мутация	RefSNP (rs)	Аллельная частота (%)
F508del	rs113993960	54,7
dele 2,3 (21kb)	–	7,3
2143delT	rs121908812	3,4
2184insA	rs121908786	3,4
1677delTA	rs121908776	2,4
N1303K	rs80034486	2,1
3849+10kb C>T	rs75039782	2,1
E92K	rs121908751	2,1
G542X	rs113993959	1,6
W1282X	rs77010898	1,6
S1196X	rs121908763	1,3
R334W	rs121909011	1,0
394delTT	rs121908769	0,8
3944delGT	rs397508612	0,8
3821delT	rs77035409	0,5
2789+5G>A	rs80224560	0,5
621+1G>T	rs78756941	0,3
2183AA>G	rs121908799	0,3

Таблица 3. Результаты высокопроизводительного секвенирования гена *CFTR* у 47 пациентов

п/н	Данные ПЦР	Данные секвенирования
1	dele 2,3 (21kb)/?	dele 2,3 (21kb)/p.Asn415Terfs (rs397508184)
2	3849+10kbC>T/?	3849+10kbC>T/Tyr84Ter (rs-)
3	F508del/?	F508del/p.Ile1214Phefs (rs397508630) *
4	F508del/?	F508del/p.Arg1070Gln (rs78769542)
5	?/?	[p.Ser466Ter; p. Arg1070Gln] (rs121908805; rs78769542)/?
6	?/?	p.Arg1066Cys(rs78194216)/ p.Arg1066Cys (rs78194216)
7	1677delTA/? (E92K)	1677delTA/p.Ala96Glu (rs397508449)
8	?/?	c.1766+1G>C (rs121908748)/p.Gly314Arg (rs397508819)
9	?/?	c.580–1G>T (rs121908748)/c.1766+2T>C (rs-)
10	? (F508del)/?	F508del/p.Ile506Thr (rs397508224)
11	?/?	p.Gln39Ter (rs397508168)/p.Arg785Ter (rs374946172)
12	F508del/?	F508del/?
13	N1303K/?	N1303K/p.Asn415Terfs (rs397508184)
14	F508del/?	F508del/?
15	F508del/?	F508del/p.Arg347Pro (rs77932196)
16	F508del/?	F508del/p.Leu15Phefs (rs397508715)
17	3944delGT/?	3944delGT/p.Phe1286Ser (rs121909028)
18	S1196X/?	S1196X/p.Leu15Phefs (rs397508715)
19	F508del/?	F508del/p.Glu1418Argfs (rs397508706)
20	F508del/?	F508del/p.Arg1066Cys (rs78194216)
21	F508del/?	F508del/**p.Glu819Ter (rs-)***
22	F508del/?	F508del/c.3140-16T>A (rs767232138)
23	F508del/?	F508del/?
24	F508del/?	F508del/p.Trp1282Arg (rs397508616)
25	F508del/?	F508del/**p.Gln378Ter (rs-)***
26	dele 2,3 (21kb) /?	dele 2,3 (21kb)/p.Glu217Gly, p.Arg153Lys (rs121909046, rs149197463)
27	W1282X/?	W1282X/p.Gly1047Ser (rs397508504)
28	S1196X/?	S1196X/p.Leu15Phefs (rs397508715)
29	2143delT/?	2143delT/ [p.Ser466Ter; p.Arg1070Gln] (rs121908805; rs78769542)
30	dele 2,3 (21kb) /?	dele 2,3 (21kb)/**p.Val1360Phefs (rs-)***
31	F508del/?	F508del/p.Trp1282Arg (rs397508616)
32	F508del/?	F508del/p.Trp496Ter (rs200626971)
33	3944delGT/?	3944delGT/?
34	N1303K/?	N1303K/p.Lys1177Serfs (rs121908747)
35	F508del/?	F508del/?
36	G542X/?	G542X/p.Ser466Ter;p.Arg1070Gln] (rs121908805; rs78769542)
37	F508del/?	F508del/**p.Lys1365Argfs (rs-)***
38	dele 2,3 (21kb) /?	dele 2,3 (21kb)/p.Ile1214Phefs (rs397508630) **
39	2143delT/?	2143delT/[p.Ser466Ter; p.Arg1070Gln] (rs121908805; rs78769542)
40	dele 2,3 (21kb)	dele 2,3 (21kb)/p.Arg785Ter (rs374946172)
41	F508del/?	F508del/?
42	W1282X/?	W1282X/?
43	394delTT/?	394delTT/p.Trp1282Arg (rs397508616)
44	3849+10kbC>T/?	3849+10kbC>T/[p.Ser466Ter; p.Arg1070Gln] (rs121908805; rs78769542)
45	2183AA>G/?	2183AA>G/?
46	F508del/?	F508del/p.Trp1310Ter (rs397508645)
47	F508del/?	F508del/p.Trp1063Terfs (rs-)

Примечание: * — полужирным начертанием выделены 4 ранее неописанные мутации CFTR; ** — вариант p.Ile1214Phefs (rs397508630), определенный методом секвенирования по Сэнгеру; ? — кандидатные варианты не установлены.

Таблица 4. Описание четырех новых вариантов *CFTR* и фенотипов пациентов

Идентификатор пациента	Пол	Фенотип	Описание нового варианта
BRMVedZB99	Ж	Муковисцидоз, смешанная форма, тяжелое течение. Хронический гнойный обструктивный бронхит. Хроническая панкреатическая недостаточность. Бронхоэктазы. Цирроз печени	NC_000007.14:g.117592622G>T; NM_000492.3:c.2455G>T; NP_000483.3:p.Glu819Ter
BRMVedZB112	Ж	Муковисцидоз смешанная форма, тяжелое течение. Хроническая панкреатическая недостаточность. Бронхоэктазы	NC_000007.14:g.117542031C>T; NM_000492.3:c.1132C>T; NP_000483.3:p.Gln378Ter
BRMVedZB138	М	Муковисцидоз, смешанная форма, тяжелое течение. Хронический гнойный обструктивный бронхит. Хроническая панкреатическая недостаточность. Хронический полипозный риносинусит	NC_000007.14:g.117664802delG; NM_000492.3:c.4078delG ; NP_000483.3:p.Val1360Phefs 20
BRMVedZB185	М	Муковисцидоз, смешанная форма, тяжелое течение. Хронический гнойный бронхит. Хроническая панкреатическая недостаточность. Цирроз печени. Хронический полипозный риносинусит	NC_000007.14:g.117664818delA; NM_000492.3:c.4094delA ; NP_000483.3:p.Lys1365Argfs15

Методами секвенирования выявлено 24 клинически значимых варианта *CFTR* (22 из которых минорные), из них 8 ранее не отмечены у пациентов российского регистра: p.Gln39Ter (rs397508168), p.Phe1286Ser (rs121909028), p.Ile1214Phefs (rs397508630), p.Trp1063Terfs, p.Glu819Ter, p.Gln378Ter, p.Val1360Phefs и p.Lys1365Argfs. Обнаруженные мутации согласно предсказательным программам *in silico* обусловливают образование укороченного белка МВТР и являются патогенными (класс мутаций I).

Эффективность выявления патогенных аллелей *CFTR* методом ПЦР для исследованной выборки составила 86,1% (при этом 1 или 2 патогенных мутации было выявлено в 96,9% случаев), показатель удовлетворяет требованиям, предъявляемым к эффективности диагностических панелей [19]. Однако принимая во внимание данные по генетической эпидемиологии МВ последних лет [4, 13], а также результаты расширенной диагностики исследованной выборки, диагностическая эффективность панели может быть повышена за счет включения вариантов p.Ser466Ter (rs121908805), p.Trp1282Arg (rs397508616) и p.Leu15Phefs (rs397508715). Технологическое решение, используемое для определения известных мутаций гена *CFTR* на основе метода ПЦР с «примыкающими зондами», при сравнении с альтернативными подходами (MLPA, RFLP) демонстрирует ряд преимуществ: все этапы исследования, включая анализ графиков кривых плавления, выполняются в одном приборе, не требуется постановка электрофореза. Программное обеспечение автоматически осуществляет трактовку полученных результатов. В то же время возможен визуальный контроль результатов по графикам кривых плавления, что позволяет регистрировать наличие полиморфизмов, расположенных близко к целевой мутации. Учитывая относительную простоту, возможности для оптимизации (сокращение набора пробирок с индивидуальными тестами при реализации варианта мультиплексной ПЦР) и автоматизации процесса, в технологии заключен потенциал высокопропускного метода ДНК-диагностики/скрининга частых наследственных заболеваний.

Эффективность расширенной ДНК-диагностики с применением методов секвенирования составила 95,4% (во всех случаях была выявлена хотя бы одна мутация патогенного значения). Причины невыявления мутаций могут быть связаны с ограничениями технологии NGS, кроме того, для повышения эффективности диагностики обычно требуется доработка панели, а также оптимизация алгоритмов анализа [20]. В частности, технология Ion Torrent не позволяет достоверно распознавать мутации внутри гомополимерных участков, например не могут быть установлены мутации *CFTR* по типу 2184insA (rs121908786). В нашей работе делеция аденина внутри участка TATTT[A/-]TTTTTTCT (мутация p.Ile1214Phefs (rs397508630)) была установлена после секвенирования данного фрагмента по Сэнгеру. Существенной проблемой для технологии являются также протяженные делеции и дупликации, распознавание гетерозиготного носительства которых требует применения специальных биоинформатических алгоритмов обсчета данных, а в случае крупных делеций — введения в панель дополнительных мишеней, захватывающих границы делеций [9], либо серий дополнительных мишеней, учитывающих популяционно частые варианты гена. На данный момент у больных МВ жителей РФ выявлено несколько вариантов крупных делеций, из которых наиболее распространенная CFTRdele 2,3 встречается с частотой 1,4–8% [8]. Достоверное определение гетерозиготного носительства делеции CFTRdele 2,3 с помощью метода NGS в нашем исследовании было возможно при добавлении дополнительных пар праймеров на границы делеции, в то время как оценка представленности прочтений при сравнении результатов секвенирования гомо-, гетерозигот и нормы по CFTRdele 2,3 оказалась ненадежным решением.

ВЫВОДЫ

По данным национального регистра больных МВ 30–35 мутаций *CFTR* представлены у пациентов с аллельной частотой не более 1%, в то же время, в сумме распространенные патогенные варианты составляют около 20% от всего аллельного разнообразия. Эффективная молекулярно-генетическая диагностика МВ на практике может быть обеспечена при условии сочетания различных технологических подходов, например определения отдельных полиморфизмов методом ПЦР с последующим NGS негативных образцов. В настоящем исследовании 86,1% патогенных аллелей *CFTR* было выявлено с использованием панели для определения 24 генетических вариантов, ассоциированных с МВ, 10% идентифицировано методами секвенирования. Выявлено 8 минорных вариантов *CFTR*, до этого не отмеченных у жителей РФ, включая 4 новых патогенных мутации — p.Glu819Ter, p.Gln378Ter, p.Val1360Phefs и p.Lys1365Argfs.

Литература

1. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science. 1989 Sep 8; 245 (4922): 1073–80.
2. Dodge JA. A millennial view of cystic fibrosis. Dev Period Med. 2015 Jan-Mar; 19 (1): 9–13.
3. Баранов А. А., Капранов Н. И., Каширская Н. Ю. и др. Проблемы диагностики муковисцидоза и пути их решения в России. Педиатрическая фармакология. 2014; 11 (6): 16–23.
4. Кондратьева Е. И., Красовский С. А., Воронкова А. Ю., Амелина Е. Л., Черняк А. В., Каширская Н. Ю., редакторы. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2015 год. М.: ИД МЕДПРАКТИКА-М; 2016. 72 с.
5. Шерман В. Д., Кондратьева Е. И., Каширская Н. Ю., Калиненкова С. Г., Коталевская Ю. Ю. Неонатальный скрининг на муковисцидоз. Итоги 10 лет. Вторая Всероссийская научно-практическая конференция «Новые технологии диагностики наследственных болезней» Москва, 27–28 октября 2017 г.
6. 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; 14 (4): 503–8.
7. Шерман В. Д., Каширская Н. Ю., Капранов Н. И. Современный алгоритм диагностики муковисцидоза. Педиатрия. 2014; 93 (4).
8. Степанова А. А., Красовский С. А., Поляков А. В. Информативность поиска 19 частых мутаций в гене CFTR у российских больных муковисцидозом и расчетная частота заболевания в Российской популяции. Генетика. 2015; 52 (2): 231–41.
9. Симакова Т. С., Брагин А. Г., Глушкова М. А., Петрова Н. В., Поляков А. В., Кондратьева Е.И., и др. Опыт применения таргетного секвенирования для молекулярной диагностики муковисцидоза. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (5): 305–9.
10. Степанова А. А., Абрукова А. В., Саваскина Е. Н., Поляков А. В. Мутация p.E92K –основная причина муковисцидоза у чувашей. Генетика. 2012; 48 (7): 863–71.
11. Петрова Н. В., Тимковская Е. Е., Васильева Т. А. и др. Особенности спектра мутаций в гене CFTR у больных муковисцидозом из Карачаево-Черкесии. Медицинская генетика. 2015; 14 (7): 32–6.
12. Красовский С. А., Черняк А. В., Каширская Н. Ю. и др. Муковисцидоз в России: создание национального регистра. Педиатрия. 2014; 93 (4).
13. Доступно по ссылке: http://seqdb.med-gen.ru/
14. Кофиади И. А., Ребриков Д. В. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. Генетика 2006; 42 (1): 22–32.
15. Абрамов Д. Д., Кадочникова В. В., Якимова Е. Г., Белоусова М. В., Маерле А. В., Сергеев И. В. и др. Высокая частота носительства в российской популяции мутаций гена CFTR, ассоциированных с муковисцидозом, и мутаций гена PAH, ассоциированных с фенилкетонурией. Вестн. РГМУ. 2015; (4): 32–5.
16. Сергеев И. В., Хаитов М. Р., Трофимов Д. Ю., Абрамов Д. Д., Грудакова Е. Г., Гончарова Е. В. и др. Разработка методов для проведения широкомасштабных исследований полиморфизма генов, регулирующих различные компоненты иммунного ответа. Физиол. и патол. иммун. системы. 2009; 13 (4): 21–6.
17. Доступно по ссылке: http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app
18. Доступно по ссылке: https://www.cftr2.org/
19. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Jr, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J Cyst Fibros. 2008 May; 7 (3): 179–96.
20. Shin S, Kim Y, Chul Oh S, Yu N, Lee ST, Rak Choi J, et al. Validation and optimization of the Ion Torrent S5 XL sequencer and Oncomine workflow for BRCA1 and BRCA2 genetic testing. Oncotarget. 2017 May 23; 8 (21): 34858–66.

References

1. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science. 1989 Sep 8; 245 (4922): 1073–80.
2. Dodge JA. A millennial view of cystic fibrosis. Dev Period Med. 2015 Jan–Mar; 19 (1): 9–13.
3. 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.
4. Kondrateva EI, Krasovskij SA, Voronkova AJu, Amelina EL, Cherniak AV, Kashirskaja N. Ju., redaktory. Registr bol'nyh mukoviscidozom v Rossijskoj Federacii. 2015 god. M.: ID MEDPRAKTIKA-M; 2016. 72 s.
5. Sherman VD, Kondrat'eva EI, Kashirskaja NJu, Kalinenkova SG, Kotalevskaja JuJu. Neonatal'nyj skrining na mukoviscidoz. Itogi 10 let. Vtoraja Vserossijskaja nauchno-prakticheskaja konferencija «Novye tehnologii diagnostiki nasledstvennyh boleznej» Moskva, 27–28 oktjabrja 2017 g.
6. Kashirskaya NY, Krasovsky SA, Chernyak AV, Sherman VD, Voronkova AY, Shabalova LA, 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): 503–8.
7. Sherman VD, Kashirskaja NJu, Kapranov NI. Sovremennyj algoritm diagnostiki mukoviscidoza. Pediatrija. 2014; 93 (4).
8. Stepanova AA, Krasovsky SA, and Polyakov AV. Reliability of the Search for 19 Common Mutations in the CFTR Gene in Russian Cystic Fibrosis Patients and the Calculated Frequency of the Disease in Russian Federation. Russian Journal of Genetics. 2016; 52 (2): 204–13.
9. Simakova TS, Bragin AG, Glushkova MA, Petrova NV, Polyakov AV, Kondratieva EI, et al. The experience of application of target sequencing in molecular diagnostic of mucoviscidosis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2017; 62 (5): 305–309.
10. Stepanova AA, Polyakov AV, Abrukova AV, Savaskina EN. Mutation p.E92K is the primary cause of cystic fibrosis in Chuvashes Russian Journal of Genetics. 2012; 48 (7): 731–7.
11. Petrova NV, Timkovskaya EE, Vasilyeva TA et al. Characteristics the spectrum of cftr mutations in Karachay-Cherkessia. Meditsinskaia genetika 2015; 14 (7): 32–6.
12. Krasovsky SA, Chernyak AV, Kashirskaya N.Yu. et al. Cystic fibrosis in Russia: the creation of a national register. Pediatrics. 2014; 93 (4).
13. Available from: http://seqdb.med-gen.ru/
14. Kofiadi IA, Rebrikov DV. Methods for detecting single nucleotide polymorphisms: Allele-specific PCR and hybridization with oligonucleotide probe Russian Journal of Genetics. 2006; 42 (1): 16–26.
15. Abramov DD, Kadochnikova VV, Yakimova EG, Belousova MV, Maerle AV, Sergeev IV et al. High carrier frequency of CFTR gene mutations associated with cystic fibrosis, and PAH gene mutations associated with phenylketonuria in Russian population. Bulletin of RSMU. 2015; (4): 32–5.
16. Sergeev IV, Haitov MR, Trofimov DJu, Abramov DD, Grudakova EG, Goncharova EV, i dr. Razrabotka metodov dlja provedenija shirokomasshtabnyh issledovanij polimorfizma genov, regulirujushhih razlichnye komponenty immunnogo otveta. Fiziol i patol immun sistemy. 2009; 13 (4): 21–6.
17. Available from: http://www.genet.sickkids.on.ca
18. Available from: https://www.cftr2.org/
19. Castellani C, Cuppens H, Macek M, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J Cyst Fibros. 2008 May; 7 (3): 179–96.
20. Shin S, Kim Y, Chul Oh S, Yu N, Lee ST, Rak Choi J, et al.Validation and optimization of the Ion Torrent S5 XL sequencer and Oncomine workflow for BRCA1 and BRCA2 genetic testing. Oncotarget. 2017 May 23; 8 (21): 34858–66.