

ВЫСОКАЯ ЧАСТОТА НОСИТЕЛЬСТВА В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ МУТАЦИЙ ГЕНА *CFTR*, АССОЦИИРОВАННЫХ С МУКОВИСЦИДОЗОМ, И МУТАЦИЙ ГЕНА *PAH*, АССОЦИИРОВАННЫХ С ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ

Д. Д. Абрамов^{1✉}, В. В. Кадочникова¹, Е. Г. Якимова¹, М. В. Белоусова¹, А. В. Маерле³, И. В. Сергеев¹, А. А. Рагимов², А. Е. Донников³, Д. Ю. Трофимов³

¹ Государственный научный центр "Институт иммунологии", Москва

² Центр крови Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова, Москва

³ ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва

Целью исследования было установление частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах *CFTR* и *PAH* у доноров первичной кроводачи. При генотипировании 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации, обнаружены 29 носителей мутаций в гене *CFTR*, ассоциированных с развитием муковисцидоза (частота в выборке составила 2,9 %, или 1:34), и 32 носителя мутаций в гене *PAH*, ассоциированных с развитием фенилкетонурии (частота в выборке — 3,2 %, или 1:31). Всего обнаружен 61 носитель мутаций в генах *CFTR* и *PAH* (частота в выборке — 6,1 %, или 1:16). Полученные данные могут быть использованы для разработки оптимальных схем диагностики указанных наследственных заболеваний.

Ключевые слова: муковисцидоз, *CFTR*, фенилкетонурия, *PAH*, генотипирование, российская популяция

✉ Для корреспонденции: Дмитрий Дмитриевич Абрамов
115478, Москва, Каширское ш., 24, корп. 2; d.d.abramov@mail.ru
Статья поступила: 11.09.2015 Статья принята к печати: 05.11.2015

HIGH CARRIER FREQUENCY OF *CFTR* GENE MUTATIONS ASSOCIATED WITH CYSTIC FIBROSIS, AND *PAH* GENE MUTATIONS ASSOCIATED WITH PHENYLKETONURIA IN RUSSIAN POPULATION

Abramov DD^{1✉}, Kadochnikova VV¹, Yakimova EG¹, Belousova MV¹, Maerle AV³, Sergeev IV¹, Ragimov AA², Donnikov AE³, Trofimov DY³

¹ National Research Centre – Institute of Immunology, Moscow

² Blood Centre of The First Sechenov Moscow State Medical University, Moscow

³ DNA-Technology LLC, Moscow

The study aimed to establish the frequency of common *CFTR* and *PAH* mutations in the Russian population in first time blood donors. Genotyping of 1000 first time blood donors who identify themselves as Russians and live permanently in the Russian Federation, detected 29 carriers of *CFTR* mutations associated with cystic fibrosis development (carrier frequency in the sample of subjects was 2.9 %, or 1:34) and 32 carriers of *PAH* mutations associated with phenylketonuria development (carrier frequency in the sample of subjects was 3.2 %, or 1:31). Altogether 61 carrier of *CFTR* and *PAH* mutations was found (carrier frequency in the sample of subjects was 6.1 %, or 1:16). The obtained data can be used for developing effective diagnostic guidelines for the above mentioned hereditary diseases.

Keywords: cystic fibrosis, *CFTR*, phenylketonuria, *PAH*, genotyping, Russian population

✉ Correspondence should be addressed: Dmitry Abramov
Build. 2, 24, Kashirskoe highway, Moscow, 115478; d.d.abramov@mail.ru
Received: 11.09.2015 Accepted: 05.11.2015

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз — наследственное заболевание (OMIM: 219700), связанное с нарушением ионного транспорта в эпителии и вызываемое мутациями в гене трансмембранного регулятора ионной проводимости (*CFTR*). Кодированный этим геном белок функционирует как цАМФ-зависимый хлорный канал, встроенный в мембрану клетки. Тип наследования муковисцидоза — аутосомно-рецессивный. Частота носительства мутаций, ассоциированных с развитием муковисцидоза, различается в зависимости от популяции и может варьировать от 1:90 для азиатских популяций до 1:29 для европейских популяций. В среднем с этим заболеванием среди европейцев рождается 1 человек на 2500–4500 населения.

Муковисцидоз — тяжелое системное заболевание, сопро-

вождающееся существенным снижением качества и продолжительности жизни. У больных МВ поражены многие органы, особенно выделяющие слизистый секрет: верхние и нижние дыхательные пути, поджелудочная железа, желчевыводящая система, кишечник, мужские половые органы, потовые железы. У некоторых больных при рождении возникает мекониальный илеус. У мужчин с МВ практически всегда отмечают азооспермию (отсутствие сперматозоидов в эякуляте) и бесплодие из-за двухсторонней аплазии семявыносящего протока (OMIM: 277180, Congenital bilateral absence of vas deferens — врожденное двухстороннее отсутствие семявыносящих протоков). Считается, что более 50 % мужчин, страдающих бесплодием и имеющих азооспермию или олигозооспермию тяжелой сте-

пени, являются носителями мутаций в гене *CFTR* [1, 2].

Фенилкетонурия (ФКУ) — наследственное заболевание обмена веществ, связанное с нарушением метаболизма аминокислот, главным образом фенилаланина. Без корректной терапии ФКУ сопровождается накоплением фенилаланина и его токсических продуктов в организме, что приводит к тяжелому поражению центральной нервной системы и нарушению умственного развития. Частота и распространенность заболевания варьирует от популяции к популяции. Самая высокая частота рождения ребенка с ФКУ отмечена среди отдельных цыганских популяций Словакии — 1 больной на 40 рождений, самая низкая — в Японии, менее 1 случая на 100 000 рождений. В России частота рождения ребенка с ФКУ составляет примерно 1 случай на 10 000 новорожденных, с частотой носительства по литературным данным примерно 1:50 [3, 4]. Заболевание связано с мутацией в гене *PAH*, кодирующем фенилаланингидроксилазу. Ген локализован на длинном плече хромосомы 12. На сегодняшний день в гене фенилаланингидроксилазы описано свыше 400 мутаций, частота и встречаемость которых характеризуется существенными межпопуляционными различиями, однако лишь несколько из них встречаются с частотой более 1 %. Среди жителей Европы и России наиболее распространена миссенс-мутация в 12-м экзоне гена *PAH* — R408W. Тип наследования фенилкетонурии — аутосомно-рецессивный [5].

В Российской Федерации с 2006 г. в рамках реализации приоритетного национального проекта «Здоровье» (приказ Минздравсоцразвития РФ от 22.03.2006 № 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания») проводят неонатальный скрининг на пять подобных заболеваний, включая муковисцидоз и фенилкетонурию. Кровь берут из пятки новорожденных и исследуют с применением биохимических и молекулярно-генетических методов диагностики. В ряде стран, учитывая высокую частоту носительства при сравнительно небольшом количестве мажорных мутаций в генах *CFTR* и *PAH*, скрининг на наиболее частые мутации предлагают проводить всем парам, планирующим деторождение.

Целью данного исследования было установление частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах *CFTR* и *PAH* у доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для настоящего исследования использовали коллекцию периферической крови 1000 здоровых индивидов (доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских). Выделение ДНК проводили из 0,1 мл периферической крови при помощи набора реагентов «ПРО-БА-ГС-ГЕНЕТИКА» компании «ДНК-Технология» (Москва). Методика выделения основана на лизисе биоматериала с последующими сорбцией ДНК на носителе, отмывке примесей, элюцией ДНК с сорбента. Полученные образцы ДНК сразу использовали для генотипирования либо хранили при -20°C . Концентрация ДНК, определенная на специализированном флуориметре Qubit (Invitrogen, США), составляла в среднем 50–100 мкг/мл.

Определение замен одиночных нуклеотидов проводили с использованием комплектов реагентов «Генетика наследственных заболеваний. Муковисцидоз Скрин», «Генетика наследственных заболеваний. Муковисцидоз — редкие мутации» и «Генетика наследственных заболеваний. Фенилкетонурия» компании «ДНК-Технология» (Москва). Принцип их действия основан на применении метода примыкающих проб (adjacent probes, kissing probes) [6, 7]. Указанные комплекты

реагентов позволяют выявлять 24 мутации в гене *CFTR*, ассоциированные с развитием муковисцидоза, и 16 мутаций в гене *PAH*, ассоциированные с развитием фенилкетонурии.

В каждый из комплектов реагентов входят амплификационные смеси для определения конкретной мутации. Каждая из смесей содержит праймеры, общие для дикого и мутантного вариантов нуклеотидной последовательности, один общий олигонуклеотид с гасителем флуоресценции и два сиквенс-специфичных олигонуклеотида (пробы), несущих различные флуорофоры. Олигонуклеотидные пробы, соответствующие тому или иному варианту последовательности, мечены различными флуорофорами, что позволяет определять оба варианта в одной пробирке.

При идентификации замен одиночных нуклеотидов проводили ПЦР, затем понижали температуру реакционной смеси для гибридизации полученной матрицы с олигонуклеотидными пробами. Определение генотипа выполняли после ПЦР и гибридизации путем измерения уровня флуоресценции в ходе температурной денатурации дуплексов олигонуклеотидов и полученных матриц. Данное измерение проходило в режиме реального времени, в результате были получены кривые плавления (рисунок). Если анализируемый образец содержал только один вариант нуклеотидной последовательности гена, т. е. был гомозиготен по данному полиморфизму, температура плавления для пробы, образующей совершенный дуплекс, была существенно выше, нежели для пробы, образующей несовершенный дуплекс. Если же анализировали гетерозиготный образец, содержащий оба варианта нуклеотидной последовательности, оба варианта проб могли образовать совершенный дуплекс, поэтому температуры их плавления были практически одинаковы. Применяемый подход выгодно отличается от большинства молекулярно-генетических методов определения полиморфизмов одиночных нуклеотидов, в т. ч. использующих технологию TaqMan. Определение генотипа происходит дважды, независимо по двум каналам флуоресценции, что существенно повышает надежность генотипирования и практически нереализуемо другими способами.

Полимеразную цепную реакцию и определение температуры плавления олигонуклеотидных проб проводили с помощью детектирующего амплификатора DTrime («ДНК-Технология», Россия). Использовали следующий температурный режим амплификации: 94°C — 10 с, 64°C — 30 с в течение 50 циклов. По завершении реакции амплификации реакционную смесь остужали до 25°C со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{с}$. Кривые плавления получали следующим образом: температуру реакции смеси повышали с 25°C до 75°C с шагом в 1°C , измеряя уровень флуоресценции на каждом шаге. В ходе выполнения работы применяли комплекс отечественного оборудования для автоматизирования основных этапов проведения исследований, что позволило проводить генотипирование до 100 образцов по 40 мутациям в день. В качестве подтверждающего метода проводили выборочное автоматическое секвенирование ДНК по Сэнгеру с применением автоматического секвенатора ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), использовали реактивы и рекомендации производителя. Во всех случаях были получены идентичные результаты генотипирования.

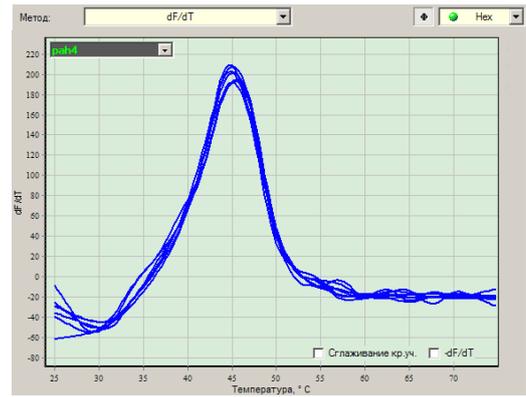
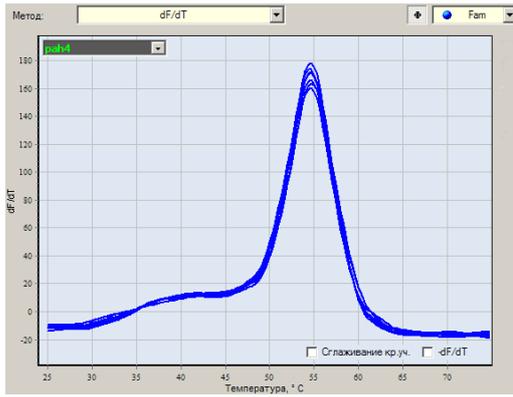
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные результаты по частотам встречаемости 29 мутаций в гене *CFTR* и 18 мутаций в гене *PAH* у 1000 здоровых индивидов (доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации) представлены в таблицах 1 и 2. При генотипировании 1000 доноров первичной кроводачи были обнаружены 29 носителей мутаций в гене *CFTR*, ассоциированных с развитием муковисцидоза (частота в выборке

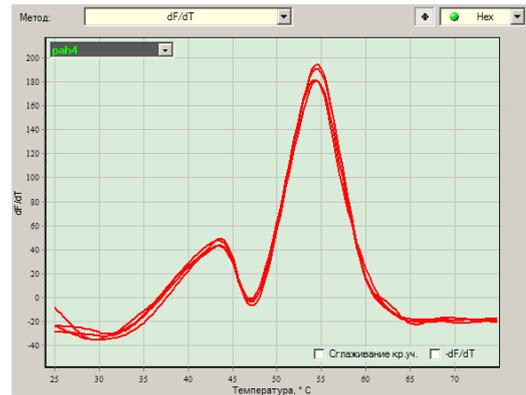
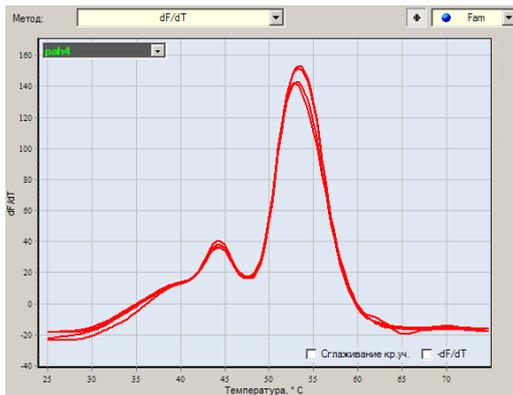
Флуорофор FAM

Флуорофор HEX

Гомозиготы
дикого типа



Гетерозиготы



Кривые плавления для различных вариантов генотипа, полученные при определении мутации R408W в гене *PAH*

Таблица 1. Выявленные гетерозиготы по мутациям в гене *CFTR* у 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских

Мутация в гене <i>CFTR</i>	Выявлено гетерозигот
F508del	15
R117H	4
N1303K	3
3849+10kbC>T	3
dele2,3(21kb)	1
E92K	1
L138ins	1
K598ins	1
W1282X	0
G542X	0
2143delT	0
2184insA	0
604insA	0
621+1G>T	0
S1196X	0
3821delT	0
3667insTCAA	0
R334W	0
394delTT	0
R553X	0
1677delTA	0
2183AA>G	0
2789+5G>A	0
3944delGT	0

Таблица 2. Выявленные гетерозиготы по мутациям в гене *PAH* у 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских

Мутация в гене <i>PAH</i>	Выявлено гетерозигот
R408W	24
R158Q	2
R261Q	2
L48S	1
Y414C	1
IVS4+5G>T	1
IVS10nt546	1
G188D	0
R252W	0
R261X	0
E280K	0
P281L	0
F331S	0
c.836C>T	0
IVS2+5G>C	0
IVS12+1G>A	0

составила 2,9 %, или 1:34), и 32 носителя мутаций в гене *PAH*, ассоциированных с развитием фенилкетонурии (частота в выборке — 3,2 %, или 1:31).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из 29 доноров первичной кроводачи, для которых были выявлены гетерозиготы по мутациям в гене *CFTR*, 19 были носите-

лями фенотипически «тяжелых» мутаций, ассоциированных с значительной степенью поражения поджелудочной железы при заболевании муковисцидозом. Наличие подобных мутаций I–II классов приводит к нарушению синтеза или созревания (фолдинга) белка. У 10 доноров обнаруженные мутации в гене *CFTR* относились к IV и V классам с фенотипически более «мягкими» проявлениями, приводящими к нарушениям проводимости хлорных каналов и транспорта белка соответственно [8]. Следует отметить, что в нашем исследовании не было ни одного случая выявления сочетанного носительства мутаций, ассоциированных как с муковисцидозом, так и с фенилкетонурией.

По данным литературных источников для российской популяции частота носительства мутаций, ассоциированных с муковисцидозом, варьирует от 1:26 до 1:44, что в целом сопоставимо с подобной характеристикой для стран Европы [9–11]. В свою очередь, частота носительства мутаций, ассоциированных с фенилкетонурией, составляет в среднем 1:50, что также соответствует другим европейским популяциям [3–5]. Результаты настоящего исследования в целом согласуются с опубликованными данными для российской популяции, при этом нами была получена несколько более высокая частота носительства мутаций, ассоциированных с фенилкетонурией.

Литература

- Jentsch TJ, Maritzen T, Zdebek AA. Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. *J Clin Invest*. 2005 Aug; 115 (8): 2039–46.
- Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, 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.
- Аничкина А. А., Гаврилюк А. П., Тверская С. М., Поляков А. В. Анализ наиболее часто встречающихся мутаций в гене фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией. *Мед. ген.* 2003; 2 (4): 175–81.
- Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat*. 2003 Apr; 21 (4): 345–56.
- Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Rabin M, Ruddle FH, et al. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985 Sep; 82 (18): 6221–5.
- Кофиади И. А., Ребриков Д. В. Методы детекции однонуклеотид-

References

- Jentsch TJ, Maritzen T, Zdebek AA. Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. *J Clin Invest*. 2005 Aug; 115 (8): 2039–46.
- Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, 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.
- Anichkina AA, Gavrilyuk AP, Tverskaya SM, Poliakov AV. Analiz naibolee chasto vstrechayushchikhsya mutatsiy v gene fenilalaningidroksilazy u bolnykh fenilketonuriei. *Med Gen*. 2003; 2 (4): 175–81. Russian.
- Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat*. 2003 Apr; 21 (4): 345–56.
- Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Rabin M, Ruddle FH, et al. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985 Sep; 82 (18): 6221–5.
- Kofiadi IA, Rebrikov DV. Methods for detecting single nucleotide polymorphisms: allele-specific PCR and hybridization with oligonucleotide probe. *Genetika*. 2006 Jan; 42 (1): 22–32. Russian.

ВЫВОДЫ

В результате исследования были установлены частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах *CFTR* и *PAH* у здоровых индивидов. Всего обнаружен 61 носитель мутаций в генах *CFTR* и *PAH* (частота в выборке составила 6,1 %, или 1:16). Подобная высокая частота распространения носительства наследственных заболеваний позволяет сделать предположение о необходимости проведения не только неонатального скрининга, но и молекулярно-генетической диагностики в составе комплекса мероприятий при планировании беременности, в том числе при решении вопроса о применении вспомогательных репродуктивных технологий для преодоления бесплодия. Наиболее подходящей платформой для таких исследований является ПЦР в реальном времени. Данный подход открывает принципиально новые возможности для массового высокопропускного генотипирования, позволяет роботизировать работу лаборатории при высокой надежности получаемых результатов.

- ных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. *Генетика*. 2006; 42 (1): 22–32.
- Сергеев И. В., Хаитов М. Р., Трофимов Д. Ю. и др. Разработка методов для проведения широкомасштабных исследований полиморфизма генов, регулирующих различные компоненты иммунного ответа. *Физиол. и патол. иммун. системы*. 2009; 13 (4): 21–5.
- Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. 1993 Jul 2; 73 (7): 1251–4.
- Кусова З. А., Петрова Н. В., Васильева Т. А. и др. Результаты массового скрининга новорожденных на муковисцидоз в Москве. *Вопр. соврем. педиатр*. 2010; 9 (6): 26–30.
- Петрова Н. В., Тимковская Е. Е., Зинченко Р. А., Гинтер Е. К. Анализ частоты некоторых мутаций в гене *CFTR* в разных популяциях России. *Мед. ген.* 2006; 5 (2): 32–9.
- Brice P, Jarrett J, Mugford M. Genetic screening for cystic fibrosis: an overview of the science and the economics. *J Cyst Fibros*. 2007 Jul; 6 (4): 255–61.

- Sergeev IV, Khaitov MR, Trofimov DYU, et al. Razrabotka metodov dlya provedeniya shirikomasshtabnykh issledovaniy polimorfizma genov, reguliruyuschikh razlichnye komponenty immunnogo otveta. *Fiziol Patol Immun Sist*. 2009; 13 (4): 21–5. Russian.
- Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. 1993 Jul 2; 73 (7): 1251–4.
- Kusova ZA, Petrova NV, Vasil'eva TA, et al. Rezultaty massovogo skringinga novorozhdennykh na mukovistsidoz v Moskve. *Vopr Sovrem Peditr*. 2010; 9 (6): 26–30. Russian.
- Petrova NV, Timkovskaya EE, Zinchenko RA, Ginter EK. Analiz chastoty nekotorykh mutatsiy v gene CFTR v raznykh populyatsiyakh Rossii. *Med Gen*. 2006; 5 (2): 32–9. Russian.
- Brice P, Jarrett J, Mugford M. Genetic screening for cystic fibrosis: an overview of the science and the economics. *J Cyst Fibros*. 2007 Jul; 6 (4): 255–61.