

Е.И.Самильчук, А.Г.Чучалин

ГЕТЕРОЗИГОТНОСТЬ ПО МУТАЦИИ $\Delta F508$ ГЕНА МУКОВИСЦИДОЗА СРЕДИ БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Институт пульмонологии МЗ РФ, Москва

THE HETEROZYGOSITY OF THE CYSTIC FIBROSIS GENE ON $\Delta F508$ MUTATION IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY PATHOLOGY

E.I.Samilchuk, A.G.Chuchalin

Summary

The purpose of this study was investigation of the prevalence of $\Delta F508$ mutation of the cystic fibrosis gene in patients with COPD. 66 patients with COPD, 35 ones with nonobstructive pulmonary diseases and 35 healthy volunteers were examined aged of 17—76 years.

DNK of the subjects were analysed to reveal mutations $\Delta F508$ and G542X, S549N, G551D, R553X, and W1282X additionally. The obtained results show the presence of $\Delta F508$ mutation in 4 patients of COPD group, that is 6% of the number of the latter. The frequency of mutations in the nonobstructive diseases group was less then 1:35 (1:70 for the total number of chromosomes), that is in account with literature data. The present data correspond to the hypothesis about the heterozygosity on pathogenic mutation of cystic fibrosis plays the certain role in COPD pathogenesis.

Резюме

Целью настоящего исследования было изучение частоты встречаемости мутации $\Delta F508$ гена муковисцидоза среди пациентов ХОЗЛ. Обследовано 66 пациентов с ХОЗЛ, 35 пациентов с необструктивными заболеваниями органов дыхания и 35 здоровых добровольцев. Возрастной диапазон составил 17—76 лет.

Были исследованы ДНК на предмет наличия мутаций $\Delta F508$ и дополнительно G542X, S549N, G551D, R553X и W1282X. Полученные результаты показали наличие мутации $\Delta F508$ у 4 обследуемых из группы ХОЗЛ, что составляет 6%. Частота мутаций в группе необструктивных заболеваний легких составила менее 1:35 (1:70 по хромосомному набору), что соответствует литературным данным. Представленные данные соответствуют гипотезе о том, что гетерозиготность по патогенной мутации муковисцидоза играет определенную роль в патогенезе ХОЗЛ.

Муковисцидоз (МВ) — наиболее частая наследственная патология органов дыхания. Это аутосомно-рецессивное заболевание связано с мутациями гена CF (cystic fibrosis), расположенного на хромосоме 7. У пациентов с МВ данный ген "поврежден" на обеих хромосомах, т.е. они являются либо гомозиготами (идентичная мутация на обеих хромосомах), либо составными гетерозиготами (мутации имеются в обеих хромосомах, однако они различны). Родители больных с МВ имеют один нормальный и один мутантный ген (нормальные гетерозиготы). Ген CF кодирует белок, формирующий в мембранах эпителиальных клеток каналы для транспорта ионов хлора. В результате мутаций соответствующий белок либо вообще не синтезируется, либо его функция резко нарушена. В настоящее время идентифицировано более 350 CF мутаций, однако большинство из них встречаются крайне редко. Лишь

мутация $\Delta F508$ присутствует с довольно высокой частотой в различных районах мира. По усредненным данным на долю этой мутации приходится более 60% CF хромосом, однако имеется значительная межэтническая вариабельность. Наиболее высокая частота $\Delta F508$, достигающая 80% CF хромосом, наблюдается в некоторых регионах Северной Европы; на юге Европы эта частота составляет уже 45—50%, а среди арабов, турок и евреев—ашкенази (восточно-европейского происхождения) $\Delta F508$ встречается лишь в 23—25% CF хромосом. Еще около 20 CF мутаций (G542X, G551D, R553X, W1282X и др.) могут считаться относительно частыми (<1% CF хромосом). Их частота также варьирует в разных этнических группах. Среди отечественных пациентов с МВ идентифицировано, по крайней мере, 14 CF мутаций [1,2,6,7,15,16, 26—28]. На долю $\Delta F508$ приходится около 50% исследованных CF хромосом. Еще несколько

мутаций (3723delA, R553X и W1282X) были найдены более чем на трех неродственных CF хромосомах. Более подробную информацию в отношении CF мутаций и связанной с ними патологии можно найти в обзорах [4,10,25].

В характере поражения органов дыхания при МВ и при хронических обструктивных заболеваниях легких (ХОЗЛ) имеется много сходного. Не удивительно поэтому, что гетерозиготность по мутантному гену муковисцидоза была достаточно давно "заподозрена" в качестве фактора, повышающего риск ХОЗЛ. Однако проверка этой гипотезы ранее осложнялась тем, что отсутствовали достоверные методы определения носителей CF мутаций (диагностика гетерозигот на основании потового теста крайне ненадежна). Единственное исключение составляло исследование родителей пациентов с муковисцидозом (облигатных носителей мутантного гена CF) [9]. Последнее выявило повышенную реактивность дыхательных путей среди лиц исследованной группы. Недавнее открытие гена CF и его наиболее частой мутации $\Delta F508$ привело к внедрению в диагностику методов прямого определения этой, а затем и других, CF мутаций [17,22,23]. Таким образом, исследование пульмонологических больных на гетерозиготность по мутантному гену МВ стало реальным. К настоящему времени сообщено об аномальном распределении мутации $\Delta F508$ среди 65 французских пациентов с хронической бронхиальной гиперсекрецией (6 пациентов были гетерозиготы по $\Delta F508$) [11]. В работе из Германии, включавшей 10 взрослых больных с ранним началом ХОЗЛ, в двух случаях был диагностирован МВ (оба пациента оказались гомозиготами по $\Delta F508$) и еще 4 больных были идентифицированы как гетерозиготы по этой мутации [21]. Частота CF мутаций, в 4,9 раза превышающая ожидаемую, была выявлена и среди 29 итальянских больных с ХОЗЛ [20]. Следует, однако, отметить, что несколько ранее авторы последней работы приводили иной результат: среди 18 пациентов с ХОЗЛ не было обнаружено ни одного носителя $\Delta F508$ [12]. Ниже мы приводим наши данные о частоте мутации $\Delta F508$ среди пациентов с ХОЗЛ.

Образцы ДНК были получены из клеток периферической крови от 66 пациентов с ХОЗЛ, 35 пациентов с заболеваниями органов дыхания, не относящихся к ХОЗЛ, и 35 здоровых лиц. Возраст обследованных был в интервале 17—76 лет. Все группы включали лиц обоих полов. ДНК выделяли с помощью "солевого" или "chelex" методов [18,29]. Образцы ДНК были исследованы на наличие мутации $\Delta F508$ с помощью PCR (polymerase chain reaction) с последующим анализом амплифицированных фрагментов ДНК методом электрофореза в полиакриламидном геле. Для амплификации фрагмента, включающего сайт мутации $\Delta F508$, были использованы праймеры C16B и C16D [17]. Образцы ДНК, оказавшиеся гетерозиготными по $\Delta F508$, дополнительно исследовались на наличие мутаций G542X, S549N, G551D, R553X (11 экзон CF гена) и W1282X (20 экзон). Амплификация фрагмента 11 экзона приводилась с использованием нормального 11i-3B и модифицированного M11e-5 праймеров [19]. Анализ PCR фрагмента на наличие мутаций осуществляли с



Рис. Исследование образцов ДНК на мутацию $\Delta F508$ при электрофорезе в полиакриламидном геле.

1 — гетерозиготность по мутации $\Delta F508$: две нижние полосы имеют размер 95 п.н. и 98 п.н., соответственно; верхние полосы — гетеродуплекс; 2 — нормальный вариант (мутация $\Delta F508$ отсутствует): одна полоса 98 п.н.

помощью RFLP (restriction fragment length polymorphism) с использованием следующих рестриктаз: DdeI для мутации S549N, HincII для мутаций G551D и R553X (при необходимости последние две мутации можно было различить рестриктазой MboI) и EcoRII для мутации G542X. Для амплификации фрагмента 20 экзона использовались праймеры 20i-3 и 20i-5 [30]. Наличие мутации W1282X определяли с помощью рестриктазы MnlI.

PCR фрагмент, включающий сайт мутации $\Delta F508$, имеет размер 98 пар нуклеотидов (п.н.) при амплификации нормального гена CF и 95 п.н. в случае мутации $\Delta F508$. При электрофорезе в полиакриламидном геле эти полосы мигрируют с разной скоростью. Нормальная гомозигота характеризуется одной полосой 98 п.н., а гомозигота по мутации $\Delta F508$, соответственно, полосой 95 п.н. Гетерозиготный вариант имеет обе полосы (98 п.н. и 95 п.н.) и для него характерно наличие гетеродуплексов (рисунок). Данные о распространенности мутации $\Delta F508$ среди исследуемых групп приведены в табл.1. Как видно из этой таблицы, данная мутация отсутствовала среди здоровых лиц, а также пациентов с заболеваниями легких, не относящихся к ХОЗЛ. В группе больных с ХОЗЛ гетерозиготность по мутации $\Delta F508$ была выявлена у 4 лиц. Информация, касающаяся этих гетерозигот, приведена в

Таблица 1

Распределение мутации $\Delta F508$ среди исследуемых групп

Группа	Количество обследованных	Количество носителей мутации $\Delta F508$
ХОЗЛ	66	4 (6%)
Заболевания легких, не относящиеся к ХОЗЛ	35	—
Здоровый контроль	35	—

Данные о пациентах, гетерозиготных по мутации $\Delta F508$

Пациент	Пол	Возраст	Начало заболевания	Потовый тест	Фертильность	Вариант α -1-антитрипсина	Семейный анамнез
1 (Е.Л.)	муж.	17	1 год	нормальный	?	M2Z	неотягощен
2 (О.В.)	жен.	26	16 лет	нормальный	+	M1M2	неотягощен
3 (А.Г.)	муж.	72	24 года	нормальный	+	M1	МВ у внуки
4 (Н.Г.)	муж.	56	19 лет	не проводился	+	M1	неотягощен

табл.2. Все четыре случая были дополнительно исследованы на ряд других относительно частых CF мутаций (G542X, S549N, G551D, R553X, W1282X), однако ни одна из данных мутаций обнаружена не была. Потовый тест, проведенный для 3 из 4 гетерозигот, ни в одном случае не достигал порогового значения, требуемого для постановки диагноза МВ. Все четыре гетерозиготы характеризовались ранним началом заболевания. Один случай, проявившийся с первого года жизни, сразу же вызвал подозрения педиатров в отношении МВ. Однако результаты потового теста, проводившегося в разные годы жизни данного пациента, всегда были нормальны, что не позволяло поставить диагноз МВ. В дополнение к мутации $\Delta F508$ гена CF мы выявили, что этот пациент является также гетерозиготным носителем патогенной мутации Z гена альфа-1-антитрипсина. Гомозиготность по аллелю Z, как известно, ассоциирована с первичной эмфиземой легких; клиническая значимость гетерозиготности по этой мутации остается предметом дискуссии (эти вопросы освещены в обзорах [3,8]). Другой гетерозиготный пациент считает, что его заболевание является следствием перенесенного в молодом возрасте ранения легкого. Этот пациент имеет здоровую дочь, однако у его внуки от этой дочери был диагностирован МВ (легочная форма без панкреатической недостаточности). Образцы крови от родственников данного пробанда не были доступны. Никто из выявленных гетерозигот не имел признаков недостаточности экзокринной функции поджелудочной железы. Против диагноза МВ свидетельствуют также данные об фертильности, по крайней мере, трех гетерозигот: наличие детей у двух пациентов мужского пола и беременность в анамнезе женщины.

Таким образом, гетерозиготность по мутации $\Delta F508$ была выявлена у 6% пациентов с ХОЗЛ. В обеих контрольных группах мутация $\Delta F508$ отсутствовала. Это означает, что в этих группах гетерозиготы встречаются реже чем 1:35 индивидуумов (соответственно, частота мутации $\Delta F508$ менее чем 1:70 среди соответствующих хромосом больных ХОЗЛ). Эти данные сопоставимы с приведенными в обзоре [7] результатами скрининговых исследований новорожденных, проводившихся в Санкт-Петербурге и Киеве. Последние выявили частоту гетерозиготности по мутации $\Delta F508$ среди новорожденных, равную 1:40 (1:80 в пересчете на хромосомы). Таким образом, полученные нами данные указывают на более чем двукратное

увеличение частоты $\Delta F508$ среди пациентов с ХОЗЛ. Казалось бы, что этот результат однозначно свидетельствует о предрасположенности гетерозигот по CF мутации к ХОЗЛ. Однако прежде чем делать окончательный вывод, нам хотелось бы привлечь внимание к вопросу постановки диагноза МВ. Как известно, краеугольным камнем в постановке этого диагноза является потовый тест. Однако после внедрения прямых методов определения CF мутаций были описаны пациенты с клиникой МВ и мутациями в обоих генах CF, но тем не менее с нормальными или на уровне пороговых значениями потового теста. Так, в работе [21] описан взрослый пациент с диссеминированными бронхоэктазами обоих легких, оказавшийся гомозиготой по $\Delta F508$ с нормальным потовым тестом. Данное наблюдение, по-видимому, относится к разряду казуистики, так как это единственный случай среди тысяч гомозиготных по $\Delta F508$ больных МВ. Однако для некоторых редких генетических вариантов нормальный потовый тест может быть и закономерностью. К числу таких вариантов относится мутация 3849+10kb, которая была впервые выявлена в гомозиготном состоянии у 19-летней пакистанской девушки со сравнительно мягким течением легочного заболевания и нормальным потовым тестом [14]. Этот результат был позднее подтвержден в исследовании 15 пациентов с МВ, гетерозиготных по мутации 3849+10kb [5]. У пяти из этих пациентов на второй хромосоме присутствовала мутация $\Delta F508$, еще у пяти — W1282X и у одного — G85E; у четырех пациентов вторая мутация не была идентифицирована. У пяти (33%) пациентов данной группы (с каким конкретно генотипом не указано) потовый тест не превышал нормальных значений. МВ с нормальным значением потового теста был выявлен также у двух сестер — гомозигот по мутации G551S [24]. Пороговые значения потового теста при наличии клинической картины, сходной с муковисцидозом, были обнаружены также у одного пациента с генотипом $\Delta F508$ /P67L и двух пациентов, гетерозиготных по мутации R117H [13]. Таким образом, приведенные выше данные указывают на существование CF мутаций, которые, не нарушая транспорта хлора в эпителиальных клетках потовых желез, тем не менее вызывают патологические процессы в других органах. Это означает, что нормальный потовый тест не позволяет исключить МВ со 100% вероятностью. Прямая же детекция мутаций позволяет диагностировать МВ лишь при обнаружении мутаций на обеих хромосомах.

Как, однако, интерпретировать те случаи, когда вторую мутацию не удается идентифицировать? Отсутствие четких критериев вызывает противоречивые трактовки по сути сходных результатов. Так, высокую частоту мутации $\Delta F508$ среди взрослых больных с ХОЗЛ авторы одного наблюдения трактуют как наличие недиагностированных случаев МВ [21]. В аналогичной работе других авторов повышенная частота мутаций трактуется уже как доказательство вовлеченности гена CF в ХОЗЛ [20]. Можно также упомянуть работу [5], подтверждавшую слабое влияние мутации 3849+10kb на потовый тест. Интересно, что все пациенты в этой работе рассматриваются как составные гетерозиготы, хотя фактически у 4 из них вторая мутация не определена (в сочетании с нормальным потовым тестом такое определение генотипа не представляется столь уж бесспорным). Возвращаясь к нашим пациентам, нам кажется, что в совокупности имеющиеся данные (возраст пациентов, начало заболевания хотя и в молодом, но не детском возрасте, фертильность и нормальный потовый тест) свидетельствуют в пользу того, что трое из них являются нормальными носителями мутации $\Delta F508$. Четвертый случай представляется более сложным для интерпретации. Помимо мутации гена CF, пациент имеет патогенный аллель Z гена альфа-1-антитрипсина. Имеет ли здесь место "сочетание усилий" двух дефектов в отношении легочной ткани? Или все же данный пациент является составной гетерозиготой с редкой и атипичной в отношении потового теста второй мутацией?

В заключение нам хотелось бы отметить, что несмотря на упомянутые выше сложности, имеющиеся в литературе данные и результаты, представленные в данной статье, в большей степени соответствуют гипотезе о том, что гетерозиготность по патогенной мутации гена CF играет определенную роль в ХОЗЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В., Горбунова В., Иващенко Т. и др. Молекулярный анализ гена и пренатальная диагностика муковисцидоза // Пульмонология. — 1992. — № 4, Приложение. — С.842.
2. Гембицкая Т.Е., Воронина О.В., Куприна Е.А., Шепелев А.В. Клинические проявления муковисцидоза и их молекулярно-генетическая характеристика // Всесоюзный конгресс по болезням органов дыхания, 2-й. — Челябинск, 1991. — С.217.
3. Самильчук Е.И., Лапин Б.А. Наследственный дефицит α_1 -антитрипсина: клинические проявления, методы диагностики, перспективы лечения // Тер. арх. — 1988. — № 7. — С.141—144.
4. Чучалин А.Г., Самильчук Е.И. Муковисцидоз: состояние проблемы // Там же. — 1993. — № 3. — С.3—9.
5. Augarten A., Kerem B.-S., Yahav Y. et al. Mild cystic fibrosis and normal or borderline sweat test in patients with the 3849+10 kb C→T mutation // Lancet. — 1993. — Vol.342. — P.25.
6. Baranov V.S., Ivaschenko T.E., Gorbunova V.N. et al. Frequency of the F508 deletion in cystic fibrosis patients from the European part of the USSR // Hum. Genet. — 1991. — Vol.87. — P.61—64.
7. Baranov V.S. Molecular diagnosis of some common genetic diseases in Russia and the former USSR: present and future // J. Med. Genet. — 1993. — Vol.30. — P.141—146.
8. Crystal R.G., Brantly M.L., Hubbard R.C. et al. The alpha-1-antitrypsin gene and its mutations, clinical consequences and strategies for therapy // Chest. — 1989. — Vol.95. — P.196—208.
9. Davis P.B., Vargo K. Pulmonary abnormalities in obligate heterozygotes for cystic fibrosis // Thorax. — 1987. — Vol.42. — P.120—125.
10. Dean M., Santis G. Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of CFTR gene mutations // Hum. Genet. — 1994. — Vol.93. — P.364—368.
11. Dumar V., Lafitte J.-J., Gervais R. et al. Abnormal distribution of cystic fibrosis $\Delta F508$ allele in adults with chronic bronchial hypersecretion // Lancet. — 1990. — Vol.335. — P.1340.
12. Gasparini P., Savoia A., Luisetti M. et al. The cystic fibrosis gene is not likely to be involved in chronic obstructive pulmonary disease // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. — 1990. — Vol.2. — P.297—299.
13. Hamosh A., Macek M., Nash E. et al. Mutation analysis in cystic fibrosis patients with pancreatic sufficiency, pancreatitis, borderline sweat chloride concentrations or isolated congenital bilateral absence of the vas deferens // Am. J. Hum. Genet. — 1993. — Vol.53. — P.A—1169.
14. Highsmith W.E., Burch L.H., Boat T.F. et al. Identification of homozygous point mutation in intron 19 in an inbred CF patient with mild disease and normal sweat chloride: creation of an alternative splice site resulting in CFTR coding region between exon 19 and 20 // Pediatr. Pulmonol. — 1991. — Suppl.6. — P.A—22.
15. Ivaschenko T.E., Baranov V.S., Dean M. Two new mutations detected by singlestrand conformation polymorphism analysis in cystic fibrosis from Russia // Hum. Genet. — 1993. — Vol.91. — P.63—65.
16. Kalinin V.N., Trubnikova I.S., Barbova N.I., Kapranov N.I. $\Delta F508$ mutation in cystic fibrosis in Moscow region // European Cystic Fibrosis Conference, 17-th: Abstracts. — Copenhagen, 1991. — P.A-73.
17. Kerem B.-S., Rommens J.M., Buchanan J.A. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis // Science. — 1989. — Vol.245. — P.1073—1080; 1437.
18. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // Nucl. Acid Res. — 1988. — Vol.16. — P.1215.
19. Ng I.S.L., Pace R., Richard M.V. et al. Methods for analysis of multiple cystic fibrosis mutations // Hum. Genet. — 1991. — Vol.87. — P.613—617.
20. Pignatti P.F., Bombieri C., Marigo C. et al. Cystic fibrosis mutations found in chronic obstructive pulmonary disease patients // Am. J. Hum. Genet. — 1993. — Vol.53. — P.A—1213.
21. Poller W., Faber J.P., Scholz S. et al. Sequence analysis of the cystic fibrosis gene in patients with disseminated bronchiectatic lung disease. Application in identification of a cystic fibrosis patient with atypical clinical course // Klin. Wochenschr. — 1991. — Bd 69. — S.657—663.
22. Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B.-S. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA // Science. — 1989. — Vol.245. — P.1066—1073.
23. Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B.-C. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping // Science. — 1989. — Vol.245. — P.1059—1065.
24. Strong T.V., Smit L.S., Turpin S.V. et al. Cystic fibrosis gene mutation in two sisters with mild disease and normal sweat electrolyte levels // N. Engl. J. Med. — 1991. — Vol.325. — P.1630—1634.
25. Tsui L.C. The spectrum of cystic fibrosis mutations // Trends Genet. — 1992. — Vol.8. — P.392—398.
26. Verlinque C., Mercier B., Audrezet M.P. et al. Screening for CFTR gene mutations in Russian patients // Am. J. Hum. Genet. — 1992. — Vol.51. — P.A—1361.
27. Verlinque C., Audrezet M.P., Savov A. et al. Complete screening for CFTR gene mutations in three samples of CF patients from Eastern Europe // Ibid. — 1993. — Vol.53. — P.A—873.
28. Voronina O., Gaitskhoki V., Potapova O. et al. Correlation of F508 deletion with CF clinical form // European Cystic Fibrosis Conference, 17-th: Abstracts. — Copenhagen, 1991. — P.A—76.
29. Walsh P.C., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material // Bio Techniques. — 1991. — Vol.10. — P.506—513.
30. Zielinski J., Rozmahel R., Bozon D. et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene // Genomics. — 1991. — Vol.10. — P.214—228.

Поступила 16.07.94.