

© ПЕТРОВА Н.В., ГИНТЕР Е.К., 2001

УДК [616.24-003.4-004]-07

Н.В.Петрова, Е.К.Гинтер

ДЕСЯТИЛЕТНИЙ ОПЫТ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МУКОВИСЦИДОЗА В МГНЦ РАМН

Медико-генетический центр РАМН, Москва

TEN YEARS OF MOLECULAR GENETIC DIAGNOSIS OF CYSTIC FIBROSIS IN RUSSIAN PATIENTS

N.V.Petrova, E.K.Ginter

Summary

Since 1990 466 CF patients and more than 1000 members of their families which were clinically diagnosed in the Department of CF of the Research Centre for Medical Genetics have been examined for 20 mutations in the CFTR gene. More than 80% of the patients were originated from the European part of Russia. The relative frequencies of 13 screened CF mutations were as follows: $\Delta F508$ — 53%, CFTKdele2.3(21kb) — 6.4%, N1303K — 2.6%, G542X — 2.0%, W1282X — 1.9%, — 3849+10kbC-T — 1.9%, 2143 Δ T — 1.8%, 2184insA — 1.8%, R334W — 0.7%, S1196X — 0.7%, 394 Δ TT — 0.4%, 1677 Δ TA — 0.5%, G551D — 0.3%. Other screened mutations have not been identified in our sample. The above mentioned 13 mutations account for 75% of all CF alleles of Russian patients. It seems that it is possible to distinguish a nucleus of common "Slavic" mutations (CFTRdele2.3(21kb), 2143 Δ T, 2184insA) but their origin and history of distribution should be clarified further. Still about 25% of CF alleles are remained to be identified in Russian population and only for 56% of CF patients the full CF genotype could be recognized. In families where one or both parents have unidentified mutations analysis of inter- and intragenic DNA markers have been exploited to complete genetic testing. As a result the informativity close to 100% could be obtained for all families with the CF child.

Резюме

Молекулярно-генетическое исследование больных муковисцидозом (МВ) проводится в лаборатории генетической эпидемиологии МГНЦ РАМН с 1990 г. К настоящему времени молекулярно-генетический анализ выполнен в 466 семьях, имеющих больного МВ ребенка. Предварительное клиническое обследование и постановка диагноза проводились в научно-клиническом отделении муковисцидоза МГНЦ РАМН. Более 80% пациентов проживали в Европейской части России, около 15% — из районов Сибири и Дальнего Востока. ДНК больных и их родителей проскринировали на 17 мутаций в гене CFTR. Относительные частоты 13 обнаруженных мутаций следующие: $\Delta F508$ — 53%, CFTRdele2,3(21kb) — 6,4%, N1303K — 2,6%, G542X — 2,0%, W1282X — 1,9%, 3849+10kbC-T — 1,9%, 2143 Δ T — 1,8%, 2184insA — 1,8%, R334W — 0,7%, S1196X — 0,7%, 1677 Δ TA — 0,5%, 394 Δ TT — 0,4%, G551D — 0,3%. Кажется вероятным, что возможно выделить ядро частых "славянских" мутаций в изученной выборке МВ хромосом: CFTRdele2,3(21kb), 2143 Δ T, 2184insA, но их происхождение и история распространения требуют дальнейшего исследования и уточнения. Примерно в 25% муковисцидозных хромосомах мутация остается неидентифицированной, поэтому в семьях, где один или оба родителя являются носителями неидентифицированных мутаций, проводится анализ внутри- и внегенных ДНК-маркеров для определения фазы сцепления мутантного МВ-аллеля. В результате информативность косвенного теста в семьях, имеющих больного МВ ребенка, достигает 100%.

Муковисцидоз (МВ) — наиболее распространенное тяжелое, аутосомно-рецессивное заболевание. Ген, ответственный за развитие заболевания, был картирован в 1989 г., а продукт его (белок) назван "муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости муковисцидоза"

(*Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator* — CFTR) [1]. К настоящему времени обнаружены около 900 мутаций в гене CFTR, приводящих к развитию заболевания. По данным Международного консорциума, менее 10 мутаций в гене CFTR можно

считать часто встречающимися в мире [2]. Относительной частоты эти мутации в объединенной выборке МВ хромосом достигают следующих значений: ΔF508 — 66%, G542X — 2,2%, G551D — 1,6%, N1303K — 1,3%, W1282X — 1,2%, R553X — 0,7%, 621+1G-T — 0,7%, 1717-1G-A — 0,6%. Остальные являются распространенными лишь в некоторых популяциях, а многие уникальны, т.е. встречаются только в одной семье. Спектр и относительные частоты МВ мутаций существенно различаются в разных популяциях.

Молекулярно-генетическое обследование больных МВ проводится в МНЦ РАМН начиная с 1990 г. Первоначальной задачей было определение спектра МВ мутаций, характерных для российских больных. Совместно с Институтом биогенетики (Брест, Франция) обследованы выборки 38 больных МВ из Центральной России, изучались все 27 экзонов и области экзон-интронных соединений гена *CFTR* методом денатурирующего гель-электрофореза с последующим секвенированием фрагментов ДНК с аномальной подвижностью [3]. В результате работы были выявлены 18 различных мутаций в гене *CFTR*, 3 из них описаны впервые — 175ΔC, 624ΔT и D572N, и определены мутации, которые могли считаться распространенными среди больных из России. К таким мутациям можно было отнести F508Δ (10-й экзон), W1282X (20-й экзон), 2143ΔT (13-й экзон), 2184insA (13-й экзон) и 3821ΔT (19-й экзон). Более 25% МВ-аллелей остались неидентифицированными в исследованной выборке больных даже после изучения всей кодирующей последовательности гена *CFTR*. Это отличает популяцию России от большинства популяций Западной Европы, где более 95% мутантных аллелей гена *CFTR* обусловлено изменениями последовательности нуклеотидов в экзонах или местах сплайсинга.

Хотя более 95% мутаций в гене *CFTR* обусловлены заменой одного нуклеотида на другой, предполагается, что в популяциях, где не удается выявить полный спектр мутаций в кодирующей части гена, вероятно обнаружить протяженные делеции. В литературе опубликованы данные о 5 таких делециях, но оказалось, что они являются либо очень редкими мутациями, либо встречаются только в конкретных популяциях [4—8]. Недавно была обнаружена еще одна протяженная делеция, охватывающая экзоны 2 и 3 гена *CFTR* [9]. Несколько предварительных наблюдений доказывали возможность существования такой делеции. У некоторых больных МВ невозможно было амплифицировать 2-й и 3-й экзоны, используя стандартные методы. В последствии было показано, что эти больные являлись гомозиготами по данной делеции. У 3 больных из Германии, Канады и Испании, являющихся гетерозиготными компаундами по мутации предполагаемой делеции и G551D, R347P и ΔF508 соответственно, в половине мРНК транскриптов *CFTR*-гена было обнаружено комбинированное отсутствие 2-го и 3-го экзонов. Гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) с последующей блот-гибридизацией по Саузерну выявил aberrантные полосы в образцах некоторых больных МВ с неизвестными мутациями, согласующихся с

наличием геномной делеции размером 20—25 тыс.п.н. После определения точек разрыва оказалось, что делеция охватывает 21,08 тыс.п.н. и включает около 25% интрона 1, полностью экзон 2, интрон 2 и экзон 3 и примерно 45% интрона 3. Последовательности нуклеотидов в точках разрыва делеции негомологичны, за исключением короткого участка длиной 4 пиримидина (5'-CTTT-3'), идентичного в обеих точках разрыва. На уровне кДНК в результате данной делеции происходит сдвиг рамки считывания и образования терминирующего сигнала в 106-м кодоне в экзоне 4. В дальнейшем при использовании дуплексной ПЦР-амплификации была проведена обширная работа по определению встречаемости делеции, обозначенной как CFTRdele2,3(21kb), в разных популяциях. В этой работе участвовали лаборатории из большинства европейских стран, а также лаборатории из Канады, США и Уругвая. Было показано, что данная мутация распространена у больных из Чехии, России, Белоруссии, Австрии, Германии, Польши, Украины, Словении и Словакии (6,4, 4,1—5,8, 3,3, 2,6, 0,5—2,5, 1,0—1,8, 1,2, 1,5 и 1,1 соответственно). Мутация CFTRdele2,3 (21kb) является второй частой мутацией после ΔF508 у больных МВ Центральной и Восточной Европы. Эта мутация sporadически встречается у больных Западной Европы и совершенно отсутствует у больных из Болгарии, Хорватии, Румынии и Сербии. Предполагается, что мутация имеет славянский источник происхождения, ее географическое распространение в Европе соответствует распространению славян в первом тысячелетии нашей эры.

В лаборатории генетической эпидемиологии выработана определенная стратегия молекулярно-генетической диагностики МВ в семьях, имеющих больного ребенка. В результате двух мультиплексных ПЦР-реакций проводится анализ мутаций, суммарно составляющих около 65 МВ-аллелей встречающихся у больных из России. В дальнейшем проводится поиск некоторых менее распространенных мутаций. Анализ мутаций проводится методом анализа длин амплифицированных фрагментов ДНК, гетеродуплексных полос, образующихся при амплификации гетерозиготных образцов и рестрикционного анализа. В лаборатории проводится рутинный поиск 20 мутаций в гене *CFTR* как характерных для больных из России, так и часто встречающихся в мировой выборке больных МВ.

К настоящему моменту молекулярно-генетический анализ выполнен для 466 пациентов и их родителей. Предварительное клиническое обследование и постановка диагноза проводили в научно-клиническом отделении муковисцидоза МНЦ РАМН и некоторых медико-генетических консультациях региональных центров. Более 80% обследованных пациентов проживали в европейской части России, около 15% из районов Сибири и Дальнего Востока и менее 5% из сопредельных государств. В исследованной выборке обнаружены 13 частных мутаций в гене *CFTR*, их относительная частота приведена в табл., а суммарная доля составляет около 75%. Мутации I507Δ, R347P, R553X, 621+1G-T, E85Q, R1162X и 1717-1G-A в нашей выборке не

Относительная частота CFTR-мутаций у больных МВ из России

Мутация	Число мутаций/число хромосом	Частота в МВ хромосомах, %	Экзон (Э)/Инtron (И)
ΔF508	494/932	53,0	Э10
CFTRdele2,3(21kb)	46/337*	6,4	0,25И1-Э2-И2-Э3-0,45И3
N1303K	18/331*	2,6	Э21
G542X	14/331*	2,0	Э11
W1282X	13/327*	1,9	Э20
3849+10kbC-T	7/172*	1,9	И19
2143ΔT	13/333*	1,8	Э13
2184insA	13/333*	1,8	Э13
R344W	5/329*	0,7	Э7
S1196X	5/332*	0,7	Э19
1677ΔTA	5/438*	0,5	Э10
394ΔTT	3/340*	0,4	Э3
G551D	2/331*	0,3	Э11
Неидентифицированы		26,0	

Примечание. * — количество исследованных МВ не-ΔF508-хромосом.

обнаружены. Наиболее распространенной, как и в большинстве европейских популяциях, является мутация F508Δ. Значение доли этой мутации среди всех МВ мутаций для России мало отличается от значений, полученных для стран Восточной Европы, где проживают в основном этнические группы, имеющие славянское происхождение. И следовательно, можно предполагать, что для всех славянских народов характерна более низкая доля мутации ΔF508, чем для народов Северо-Западной Европы. Второй по распространенности в исследуемой выборке была мутация CFTRdele2,3(21kb). Ее относительная частота превысила значение, полученное в предварительном исследовании [3]. Считается, что эта мутация имеет славянское происхождение, но нами она была обнаружена и у больных других национальностей. Две мутации в 13-м экзоне гена CFTR, 2143ΔT и 2184insA являются относительно частыми в исследованной выборке, их суммарная доля составляет около 3,3—4%. Недавно обнаружено, что эти мутации достаточно часты среди больных Чехии и Польши, что позволяет предположить их славянское происхождение. Кажется вероятным, что возможно выделить ядро частых "славянских" МВ мутаций, но их происхождение и история распространения требуют дальнейшего исследования и уточнения.

Суммарная доля идентифицированных мутаций в исследованной нами выборке больных МВ из России составляет около 75% от общего количества МВ хромосом, т.е. примерно у 55% больных удается определить обе мутации в гене CFTR, у 38,5% больных идентифицирована одна мутация, а у 6,5% обе мутации не идентифицированы. Поэтому в семьях, где один или оба родителя являются носителями неидентифицированных мутаций в гене CFTR, проводится анализ внутрисгенных и внегенных полиморфных ДНК-

маркеров для определения фазы сцепления мутантного аллеля гена CFTR. Для косвенного тестирования мы используем 4 внутрисгенных (динуклеотидных CA/GT повторы в 1, 8, 17B-интронах и тетрауклеотидные GATT повторы в 6A-интроне гена CFTR: IVS1CA, IVS8CA, IVS17BCA, INS6aGATT соответственно) и 4 внегенных (XV2c, KM19, CS7 и J3.11) полиморфизма. Более предпочтительным в качестве маркеров является использование внутрисгенных полиморфизмов, так как в этом случае вероятность кроссинговера между полиморфным сайтом и сайтом мутации практически исключена. Наиболее информативным в исследованной выборке МВ семей оказался полиморфизм INS1CA, около 62,5% семей полностью информативны по этому маркеру. При совместном использовании всех маркеров информативность теста достигает 100% практически во всех семьях, имеющих больного МВ ребенка. В МГНЦ РАМН проведены 53 пренатальных диагностики МВ в семьях высокого риска в первом триместре беременности. 33 диагностики проведены методом прямой идентификации родительских МВ мутаций у плода (ДНК ворсин хориона), в 16 случаях выявляли известную мутацию одного родителя и использовали информативные ДНК-маркеры для определения мутантной хромосомы другого родителя, 4 диагностики проведены косвенным методом с использованием маркерных систем. В 13 случаях плод унаследовал только нормальные хромосомы родителей, в 27 являлся здоровым носителем одной мутации и в 13 случаях плод был поражен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B.Sh. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989; 245: 1066—1073.

2. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum. Mutat.* 1994; 4: 167—177.
3. *Verlinguer C., Kapranov N.I., Mercier B. et al.* Complete screening of mutations in the coding sequence of the CFTR gene in a sample of CF patients from Russia: Identification of three novel alleles. *Hum. Mutat.* 1995; 113: 205—209.
4. *Morral N., Nunes V., Casals T. et al.* Uniparenteral inheritance of microsatellite allerts of the cystic fibrosis gene (CFTR): identification of a 50 kilobase deletion. *Hum. Mol. Genet.* 1993; 2: 677—681.
5. *Magnani C., Cremonesi L., Giunta A. et al.* Short direct repeats at the breakpoints of a novel large deletion in the CFTR gene suggest a likely slipped mispairing mechanism. *Hum. Genet.* 1996; 98: 102—108.
6. *Chevalier-Porst F., Bonardot A.M., Chazalette J.P. et al.* 40Kilobase deletion (CF44dele4-10) removes exons 4-10 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum. Mutat.* 1998; suppl.1: 291—294.
7. *Mickle J.E., Macek M.Jr., Fulmer-Smentek S. et al.* A mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene associated with elevated sweat chloride concentrations in the absence of cystic fibrosis. *Hum. Mol. Genet.* 1998; 7:729—735.
8. *Lerer I., Laufer-Cahana A., Rivlin J.R. et al.* A large deletion mutation in the CFTR gene (3120+1kdel8, 6kb): a founder mutation in the Palestinian Arabs. *Hum. Mutat.* 1999; 13: 337.
9. *Dork T., Macek M.Jr., Mekus F. et al.* Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum. Genet.* 2000; 106: 259—268.

Поступила 25.06.01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2001

УДК [616.24-003.4-004]-082

З.А.Блистонова, В.А.Прошин, Н.И.Капранов, Н.Ю.Каширская

МЕДИКО-СОЦИАЛЬНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

Комитет здравоохранения Москвы;
Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

MEDICAL AND SOCIAL PROVISION OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

Z.A.Blistinova, V.A.Proshin, N.I.Kapranov, N.Yu.Kashirskaya

Summary

The article represents a positive experience of the cooperation between the Russian Cystic Fibrosis Center, the Moscow Department of the Public Health and an Association of Cystic Fibrosis Childrens' Parents. Such joint work made possible to develop individual treatment schemes and to organize timely outpatient observation of these patients, to provide a treatment continuity of cystic fibrosis patients between the Russian Cystic Fibrosis Center and paediatric outpatient departments as well as Adult Cystic Fibrosis Patients' Center. It also permitted to arrange a distinct scheme for the full medicine provision and rehabilitation of cystic fibrosis patients and to improve their quality of life, to control precisely and to diminish financial expenses for cystic fibrosis patients' treatment; to train doctors and nurses of Moscow outpatient departments in cystic fibrosis patients' management and to improve a quality of outpatient medical care for cystic fibrosis patients.

Резюме

В статье представлен положительный опыт совместной работы Российского центра муковисцидоза, Комитета здравоохранения Москвы и Ассоциации родителей детей, больных муковисцидозом, позволивший разработать индивидуальные схемы лечения и своевременное диспансерное наблюдение больных, обеспечить преемственность в лечении больных муковисцидозом между Российским центром муковисцидоза и детскими городскими поликлиниками, а также центром для взрослых больных муковисцидозом, наладить четкую схему полного лекарственного обеспечения и реабилитации больных муковисцидозом, улучшить качество жизни больных, обеспечить четкий контроль за финансовыми затратами и уменьшить экономические расходы на лечение больных муковисцидозом, обеспечить повышение уровня знаний врачей и среднего медицинского персонала амбулаторно-поликлинических учреждений Москвы по проблеме муковисцидоза и повысить качество оказания медицинской помощи больным муковисцидозом в амбулаторно-поликлинических условиях и в условиях дневного стационара.

Муковисцидоз является важной медико-социальной проблемой, что связано с большими моральными, физическими и материальными затратами органов

здравоохранения, семьи и общества в целом на диагностику, лечение, реабилитацию и социальную адаптацию больных [3].