

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МУКОВИСЦИДОЗА У ПАЦИЕНТОВ ЧУВАШСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

Голубцова О.И.<sup>1,2</sup>, Краснов М.В.<sup>2</sup>, Красовский С.А.<sup>3</sup>, Николаева Л.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Бюджетное Учреждение «Республиканская детская клиническая больница» МЗСР ЧР, Чебоксары, Россия (428020, Чебоксары, ул. Gladkova, д. 27), [vakcina2007@mail.ru](mailto:vakcina2007@mail.ru)

<sup>2</sup>Федеральное Государственное Бюджетное Образовательное Учреждение Высшего профессионального образования «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», кафедра детских болезней, Чебоксары, Россия (428020, Чебоксары, ул. Gladkova, д. 27).

<sup>3</sup>Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального Медико-биологического агентства России (105077, Москва, ул. 11-Парковая, д.32).

В статье анализируются данные генетического обследования у пациентов с муковисцидозом в Чувашской Республике. Дана характеристика генотипов пациентов, представлена аллельная частота мутаций. Изучены встречаемость МВ в Чувашской республике по данным неонатального скрининга, проведена оценка генетического статуса и ряда клинических показателей, определена выживаемость больных муковисцидозом в Чувашской республике. Особенностью генетического профиля больных муковисцидозом в данном регионе является относительно малое количество выявленных мутаций. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о значительном преобладании "мягкой" мутации E92K в генетическом профиле больных, которая встречается в обследуемой выборке почти в два раза чаще, чем самая распространенная в мире и России мутация F508del. Наличие «мягкого» генотипа отразилось значительно меньшим числом осложнений со стороны органов пищеварения у пациентов обследуемой группы, что, в свою очередь, повлияло на число взрослых больных. Представлены показатели неонатального скрининга на муковисцидоз в Чувашской Республике.

Ключевые слова: муковисцидоз, Чувашская республика, генотип, E92K.

## GENETIC FEATURES OF CYSTIC FIBROSIS AT PATIENTS OF THE CHUVASH REPUBLIC

Golubtsova O.I.<sup>1,2</sup>, Krasnov M.V.<sup>2</sup>, Krasovsky S.A.<sup>3</sup>, Nikolaeva L.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Budget establishment "Republican Children's Clinical Hospital" MZSR Chuvash Republic, Cheboksary, Russia (428020, Cheboksary, Gladkov St., 27), [vakcina2007@mail.ru](mailto:vakcina2007@mail.ru)

<sup>2</sup>Federal state budgetary institution of Higher education "The Chuvash state university of I.N. Ulyanov", chair of children's diseases, Cheboksary, Russia (428020, Cheboksary, Gladkov St., 27).

<sup>3</sup>SPI of Pulmonology of FMBA, Moscow, Russian Federation, Moscow, Russia (105077, Moscow, st. 11-Parkovaya, 32).

In article data of genetic inspection at patients with cystic fibrosis (CF) in the Chuvash Republic are analyzed. The characteristic of genotypes of patients is given, the allelic frequency of mutations is presented. Are studied occurrence of CF in the Chuvash Republic according to neonatal screening, the assessment of the genetic status and a number of clinical indicators is carried out, the survival of patients CF in the Chuvash Republic is defined. Feature of a genetic profile of patients CF in this region is rather small quantity of the revealed mutations. Besides, the received results testify to considerable prevalence of a "soft" mutation of E92K in a genetic profile of patients which meets in the surveyed selection almost twice more often than the most widespread in the world and Russia F508del mutation. Existence of a "soft" genotype was reflected considerably by smaller number of complications from digestive organs at patients of the surveyed group that, in turn, affected number of adult patients. Indicators of a neonatal screening on CF in the Chuvash Republic are presented.

Keywords: cystic fibrosis, Chuvash Republic, genotype, E92K.

Муковисцидоз (МВ) - наиболее распространенное, тяжелое моногенное заболевание, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу. Это заболевание характеризуется поражением экзокринных желез и кистозным перерождением поджелудочной железы, поражением желез кишечника и дыхательной системы из-за закупорки их выводящих протоков густым вязким секретом, что вызвано изменениями функций хлорных каналов мембран эпителиальных

клеток. Ведущим же моментом является поражение двух систем - бронхолегочной и пищеварительной, которые определяют исход заболевания. Вариабельность клинической картины определяется многообразием дефектов в гене трансмембранного белка муковисцидоза. В зависимости от первичного повреждающего дефекта выделяют 6 классов мутаций гена CFTR, которые подразделяются на, так называемые, «тяжелые» и «мягкие» мутации. Несмотря на существующий прогресс в фармакотерапии МВ, позволивший значительно увеличить среднюю продолжительность жизни больных, в настоящее время ведутся научные исследования в области генной терапии этого заболевания, разрабатываются методики геннозамещающих технологий.

Целью настоящего исследования явилось определить частоту мутаций у пациентов с муковисцидозом (МВ) в Чувашии.

### **Материалы и методы**

В ЧР Центр по диагностике, лечению и реабилитации больных МВ создан в 2007 году, куда включены данные 92 пациентов с МВ, наблюдаемых с 1982 года. На настоящий момент в ЧР наблюдается 51 больной: 32 ребенка на базе БУ «Республиканская детская клиническая больница» (г. Чебоксары) и 19 взрослых на базе БУ «Республиканская клиническая больница» (г. Чебоксары).

Для определения частоты МВ были проанализированы данные рождаемости и диагностики МВ после всех этапов неонатального скрининга за 2006-2012гг. Диагноз МВ был установлен на основании клинической картины, данных положительной потовой пробы и/или генетического исследования.

Проведен ретроспективный анализ медицинской документации, включая амбулаторные карты и выписки из стационаров. Оценивались следующие показатели: возраст установления диагноза, уровень хлоридов пота при диагностике МВ, наличие внелегочных и легочных осложнений, результаты молекулярно-генетического исследования, этиологию флоры респираторного тракта. Среди показателей функции внешнего дыхания учитывались ОФВ<sub>1</sub> (объем форсированного выдоха за первую секунду) и ФЖЕЛ (форсированная жизненная емкость легких) как процент от должных величин. Спирометрия проведена у всех взрослых пациентов и у 18 детей старше 6 лет на аппаратах Shiller SP-10 или Master Screen Body по стандартной методике. Потовый тест был проведен всем пациентам двукратно с помощью экспресс-методики с помощью аппарата Нанодакт (Вескор, США) и/или определением хлоридов пота по методу Гибсона-Кука.

Молекулярно-генетическое исследование проведено 38 пациентам (74,5%) в лаборатории ДНК диагностики ГУ МГНЦ РАМН, (г. Москва). Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью набора реактивов для выделения DNA Prep100

(DIAtom™, Россия) по протоколу производителя. Определялась аллельная частота всех выявленных мутаций и идентифицировалась «тяжесть» генотипа: под тяжелым «тяжелым» подразумевалось обязательное наличие в генотипе мутации I-III класса, под «мягким» - хотя бы одной мутации IV-V классов.

Микробиологическое исследование мокроты (мазок из зева, мокрота, орофарингеальный смыв) проведено в бактериологической лаборатории Городского Центра Диагностики (г.Чебоксары) с помощью селективных сред или в бактериологических лабораториях 57 и 15 городских клинических больниц г. Москвы. Под хроническим инфицированием дыхательных путей грамотрицательной флорой принималось наличие ее в более чем 50% образцов мокроты при условии не менее 4х посевов за последние 12 месяцев: критерии центра MB в г. Лидс (Великобритания).

Статистическая обработка проведена с помощью пакета прикладных программ SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL). В зависимости от вида распределения мерами центральной тенденции и рассеяния служили среднее значение (M) ± стандартное отклонение (SD) или медиана (Me) (интерквартильный размах). При сравнении средних значений или медиан применялись t-критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни. Для оценки различий категориальных переменных в подгруппах использовался  $\chi^2$  или точный метод Фишера. Для оценки выживаемости в анализ включены данные 26 пациентов, умерших за период 1993 по 2012 гг. Выживаемость оценивалась с помощью анализа Каплана-Майера. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,005$ .

### Результаты и обсуждение

В данной работе впервые проведен анализ генетических особенностей MB в Чувашской республике, течения заболевания в разные возрастные периоды. В литературе доступны показатели московского региона [3,4] и Ярославской области [1]. Однако, доминирование чувашской национальности в Чувашской Республике повлияло на формирование определенных особенностей муковисцидоза в данном регионе.

Данные диагностики с помощью неонатального скрининга представлены в табл.1.

Таблица 1

Показатели диагностики муковисцидоза при проведении неонатального скрининга в ЧР

Год	Всего родившихся	Установленный диагноз муковисцидоза	Частота
2006	13238	0	---
2007	14871	1	1 : 14871
2008	15034	1	1 : 15034
2009	16187	2	1 : 8093
2010	16287	3	1 : 5429
2011	16166	4	1: 4041
2012	17525	2	1:8762

Всего:	109308	13	1:8408
--------	--------	----	--------

Показатели неонатального скрининга в Чувашии сопоставимы с данными других центров и варьируют с небольшим разбросом в пределах 1:8000, что не противоречит ранее полученным данным о примерной частоте МВ на территории РФ 1:10000 [5]. Учитывая «потери» на каждом их этапов скрининга, в том числе и в Чувашии, реальная частота МВ должна быть несколько выше и приближается к 1:6500 [5].

Возраст самого младшего больного на август 2013 года был равен 7 мес., самого старшего – 30,4 года, средний возраст составил  $14,6 \pm 9,3$ г, медиана возраста 15,0 (18,1) лет. Количество пациентов старше 18 лет в ЧР 19 человек (37,3%). Диагноз МВ устанавливался в среднем в возрасте  $5,7 \pm 6,6$  лет (медиана 1,6 (11,3) лет).

При генетическом обследовании выявлены следующие генотипы: E92K/E92K, E92K/F508del, F508del/F508del, E92K/W401X, E92K/N1303K, E92K/CFTRdel11-11, F508del/unknown, E92K/unknown и unknown/ unknown. Аллельная частота мутаций представлена в табл. 2.

Таблица 2

Аллельная частота мутаций среди больных муковисцидозом в Чувашии (N=76)

Мутация	Аллельная частота, %
E92K	52,6
F508del	29,0
N1303K	1,3
W401X	1,3
CFTRdel11-11	1,3
Не выявленные мутации	14,5

Примечание: N-общее число аллелей

Общая доля выявленных аллелей составила 85,5%. Встречаемость E92K среди всех генотипов составила 76,3 %, а F508del - 44,7%. Среди 34 генотипов, среди которых можно определить «тяжесть», у 29 (85,3%) выявлялся «мягкий» генотип и только у 5 (14,7 %) - «тяжелый».

Мутация E92K (р. Glu92Lys, с.274G>A) ассоциирована с распространенностью у тюркских народов [7], но ни в одном этносе или в географическом регионе мира такой высокой аллельной частоты ее до настоящего момента не выявлялось. Кроме того, ряд других мутаций, преимущественно встречающихся в определенных народностях зарегистрированы в соответствующих этносах с гораздо меньшей частотой, чем E92K у чувашей [6]. Распространенность «этнической» мутации E92K почти в два раза превышает частоту самой частой мутации в мире - F508del, в то время, как ни в одном регионе мира, где регистрируется это нозология, такого соотношения ранее не отмечалось. Необходимо отметить, что в обследуемой группе есть 5 пациентов (три гомозиготы по F508del, одна

гетерозигота по F508del и неизвестной мутации, один больной с обеими не выявленными мутациями) семьи которых являлись переселенцами из европейской части страны, и по этнической принадлежности, не отмечавшие в родословной чувашские корни. Открытие E92K, как частой мутации в Чувашии, продиктовало включение ее в спектр генетической панели рутинно обследуемых мутаций Медико-генетического Научного Центра РАМН. Это в свою очередь позволило верифицировать E92K в других регионах страны, где она была обнаружена в достаточном количестве, так аллельная частота в Москве и Московской области составила 1,4%, [3], в ярославском регионе – 0,94%. [1].

Другой важной особенностью генетического профиля обследованной группы явилось относительно малое число выявленных мутаций: E92K, F508del, N1303K, W401X, CFTRdele1-11 суммарная аллельная частота которых очень высокая – 85,5 %, за счет доминирования E92K и F508del (на их долю приходится 81,6%), в то время как в других этносах и странах представительство мутаций МВ намного более разнообразное, а общее число мутаций в мире уже насчитывает около 2000 [7]. Это обстоятельство объясняется достаточно генетической однородностью, и в том числе значительным преобладанием мутации E92K среди чувашских больных. «Тяжелые» мутация W401X и CFTRdele1-11 ранее на территории России не описаны и, можно предположить, что они, возможно, тоже будут встречаться с большей частотой среди чувашских больных.

Значительное доминирование E92K определило клиническую картину МВ в обследуемой группе. Как известно, клинические эффекты мутаций определяются механизмом генетической «поломки» (сдвиг рамки считывания, стоп-мутация, миссенс-замена, крупная делеция или инсерция), в связи с этим замена глутаминовой аминокислоты на лизин в 4 экзоне, который кодирует соответствующий трансмембранный домен белка муковисцидозного трансмембранного регулятора, приводит к его незначительной дисфункции [2]. Органом-мишенью, дифференцирующим «тяжесть» мутаций на «мягкие» и «тяжелые» является поджелудочная железа, «мягкие» мутации не приводит к ее поражению, или панкреатическая недостаточность развивается очень поздно, а «тяжелые» мутации - к раннему развитию панкреатической недостаточности.

E92K – «мягкая» мутация [7], а известный эффект доминирования «мягкой» мутации над «тяжелой» привел к формированию подавляющего числа «мягких» генотипов в исследованной группе. Эффект протективного влияния «мягких» мутаций на функцию поджелудочной железы формирует предположение о том, что, возможно, реальная частота МВ при проведении неонатального скрининга в Чувашии занижена, в связи с тем, что в основе этого метода лежит детекция концентрации иммунореактивного трипсина, образовавшегося в результате аутолиза ткани поджелудочной железы внутриутробно. В

подтверждение этой гипотезы проведенная недавно работа Кусовой З.А. выявила, что одной из причин ложноотрицательного скрининга являлось наличие «мягкого» генотипа [5].

Сравнительный анализ частоты различных осложнений среди взрослых и детей представлен в табл. 3.

Таблица 3

Частота различных легочных и внелегочных осложнений

Осложнение	В общем по группе (N=51)	Дети (N=32)	Взрослые (N=19)	P
Кровохарканье/легочное кровотечение	6 (11,8%)	1 (3,1%)	5 (26,3%)	0,01
Пневмоторакс в анамнезе	0	0	0	НП
Цирроз печени с портальной гипертензией	2 (3,9%)	1 (3,1%)	1 (5,3%)	0,7
Меконеальный илеус в анамнезе	0	0	0	НП
Сахарный диабет	0	0	0	НП

Примечание: НП - не применимо

Значительно меньшее число осложнений со стороны органов пищеварения, таких как цирроз печени с портальной гипертензией, отсутствие сахарного диабета и меконеального илеуса, также являлось следствием значительного превалирования в обследованной группе «мягких» генотипов. Относительная гиподиагностика МВ в детском возрасте, в том числе возможный «пропуск» «мягких» генотипов с E92K при неонатальном скрининге и запоздание диагностики по симптомам из-за отсутствия панкреатической недостаточности, сформировала относительно высокую долю взрослых больных в обследуемой группе. Протективное действие «мягкой» мутации на выживаемость больных явилось дополнительным фактором, влияющим на долю пациентов старше 18 лет.

С первых недель жизни ребенка, больного МВ, происходят изменения со стороны бронхолёгочной системы в виде гипертрофии бронхиальных слизистых желез и гиперплазии бокаловидных клеток. В результате этих ранних изменений развивается обтурация периферических дыхательных путей, что приводит к нарушению механизма самоочищения бронхов. В условиях мукостаза и бронхиальной обструкции у детей с МВ в нижние отделы респираторного тракта проникает большое количество патогенных микроорганизмов. Развитие хронической синегнойной инфекции нижних дыхательных путей сопровождается нарастанием респираторной симптоматики и прогрессивным ухудшением функции легких. Необходимо отметить относительно высокую долю инфицирования респираторного тракта *P.aeruginosa*, что, вероятно, обусловлено приверженностью к лечению в стационаре. С другой стороны, малая доля больных с инфекцией *B.cereacia* говорит о достаточной сегрегации больных и успешных профилактических мероприятиях, направленных на перекрестное инфицирование.

Частота инфицирования дыхательных путей различной флорой представлена в табл. 4.

Таблица 4

Этиологическая структура патогенов по данным бактериологического исследования у больных муковисцидозом в Чувашии

	В общем по группе (n=51)	Дети (n=32)	Взрослые (n=19)	P
<i>S.aureus</i> в монокультуре, n, % от общего	10 (19,6 %)	8 (25%)	2 (10,5%)	0,21
<i>P.aeruginosa</i> в монокультуре	15 (29,4%)	7 (21,9%)	8 (42,1%)	0,37
<i>P.aeruginosa</i> в сочетании с другой микрофлорой, отличной от <i>B.ceracia</i>	9 (17,6%)	7 (21,9%)	2 (10,5%)	0,26
<i>B.ceracia</i> в монокультуре или в сочетании с другой микрофлорой	2 (3,9%)	0	2 (10,5%)	0,06
Другая микрофлора	15 (29,4%)	10 (31,3%)	5 (26,3%)	0,71

Примечание: здесь и далее - доли больных представлены от общего числа больных в каждой группе

У большинства больных отмечалась монокультура *S. aureus* либо *P.aeruginosa*, у 9 больных (17,7%) высевалась микст-инфекция вышеупомянутых микроорганизмов. *P. aeruginosa* высевалась как в монокультуре, так и в сочетании с другими микроорганизмами у 24 больных (47,1%). Также встречалась хроническое или интермиттирующее инфицирование дыхательных путей следующими микроорганизмами: *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia liquefaciens*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas putida*, *Streptococcus piogenes*, *Streptococcus epidermidis*. Наряду с бактериальной флорой у 19 больных (37,3 %) отмечался высев грибов рода *Candida*.

В общем по группе ОФВ<sub>1</sub> и ФЖЕЛ составили  $67,3 \pm 25,6$  и  $78,1 \pm 21,1\%$  от должного, соответственно. Средние показатели ОФВ<sub>1</sub> и ФЖЕЛ у взрослых составили  $50,6 \pm 23,7$  и  $66,2 \pm 23,5\%$  от должного, соответственно, что достоверно ниже чем у детей, где они были равны  $80,9 \pm 18,2$  и  $87,9 \pm 18,1\%$  от должного, соответственно ( $p < 0,001$  и  $p = 0,007$ ).

Анализ выживаемости: за период 1993-2012гг умерло 26 пациентов со средним возрастом смерти  $7,4 \pm 7,9$  лет, медиана выживаемости за обозначенный период составила 25,1г.

#### Выводы:

1. Особенностью генетического профиля больных муковисцидозом в Чувашской республике является наличие ограниченного числа мутаций муковисцидоза со значительным преобладанием «мягкой» мутации E92K.
2. Доминирование «мягких» генотипов среди больных в Чувашской республике определило более позднюю диагностику заболевания, значительно меньшее число осложнений со стороны органов пищеварения и относительно высокую долю взрослых больных.

## Список литературы

1. Ашерова И.К., Капранов Н.И. Регистр как средство улучшения качества медицинской помощи больным муковисцидозом. // Педиатрическая фармакология.-2012.- № 3.- с. 96-100.
2. Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. Спб: Интермедика, 2002- 256 с.
3. Красовский С.А., Амелина Е.Л., Черняк А.В. И др. Роль регистра московского региона в ведении больных муковисцидозом. // Пульмонология.- 2013.-№ 2.-с. 27-32.
4. Красовский С.А., Никонова В.С., Каширская Н.Ю. и др. Клинико-генетическая, микробиологическая и функциональная характеристика больных муковисцидозом, проживающих в Москве и Московской области // Вопросы современной педиатрии.- 2013.- №12.- с. 17-23.
5. Кусова З.А. Эффективность программы массового обследования новорожденных на муковисцидоз: Автореф. дис.... канд. мед. наук. -Москва, 2011.
6. Петрова Н.В. Молекулярно-генетические и клинико-генотипические особенности муковисцидоза в российских популяциях: Автореф. дис.... докт. биол. наук. -Москва, 2009.
7. Castellani С., Cuppens Н., Macek Jr. et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. //J of Cyst. Fibr. -2008.-№ 7.- p.179-186.

### Рецензенты:

Бушуева Э.В., д.м.н., профессор кафедры педиатрии ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», г.Чебоксары;

Кириллов А.Г., д.м.н., доцент кафедры педиатрии ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», г.Чебоксары.