Сведения об авторах:

Мельяновская Юлия Леонидовна, научный сотрудник;

тел.: 89169244225; e-mail: melcat@mail.ru; ORCID: 0000-0002-8814-5532

Кондратьева Елена Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая научно-клиническим отделом муковисцидоза;
тел.: 89162553385; e-mail: elenafpk@mail.ru; ORCID: 0000-0001-6395-0407

Куцев Сергей Иванович, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, директор;
тел.: 84956120037; e-mail: mgnc@med-gen.ru; ORCID: 0000-0002-3133-8018

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616.2-02.7+616-084/085

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15040>

ISSN – 2073-8137

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА РАБОТЫ ХЛОРИДНОГО КАНАЛА С ВПЕРВЫЕ ОПИСАННЫМ ПАТОГЕННЫМ ВАРИАНТОМ D579Y (c.1735G>T)

Е. И. Кондратьева, Ю. Л. Мельяновская, Н. В. Петрова, Р. А. Зинченко, С. И. Куцев

Медико-генетический научный центр им. академика Н. П. Бочкова,
Москва, Российская Федерация

CLINICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS AND A FUNCTIONAL ASSESSMENT OF THE WORK OF THE CHLORIDE CHANNEL WITH THE FIRST DESCRIBED PATHOGENIC VARIANT D579Y (c.1735G>T)

Kondratyeva E. I., Melyanovskaya Yu. L., Petrova N. V., Zinchenko R. A., Kutsev S. I.

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Целью исследования явилось описание клинической картины муковисцидоза у носителей варианта D579Y (c.1735G>T). По данным национального Регистра больных муковисцидозом РФ 2017 года, у трех пациентов из неродственных семей обнаружен вариант c.1735G>T, который находился в компаунде с вариантом c.1521_1523delCTT (p.Phe508del). У всех больных определялись высокие показатели потового теста и тяжелое клиническое течение заболевания. Установлено, что вариант c.1735G>T относится к «тяжелым» вариантам гена *CFTR* с отсутствием функции хлоридного канала.

Ключевые слова: муковисцидоз, определение разности кишечных потенциалов, генетические варианты, ген *CFTR*, белок *CFTR*

The aim of the study was to describe the clinical picture of cystic fibrosis in carriers of the D579Y variant (c.1735G>T). According to the 2017 National Register of Cystic Fibrosis Patients of the Russian Federation, three patients from unrelated families were found to have the c.1735G>T variant, which was in the compound with the c.1521_1523delCTT variant (p.Phe508del). All patients had high levels of sweat test and severe clinical course of the disease. It was found that c.1735G>T belongs to the «severe» variants of the *CFTR* gene with no chlorine channel function.

Keywords: cystic fibrosis, intestinal current measurement, genetic variants, *CFTR* gene, *CFTR* protein

Для цитирования: Кондратьева Е. И., Мельяновская Ю. Л., Петрова Н. В., Зинченко Р. А., Куцев С. И. КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА РАБОТЫ ХЛОРИДНОГО КАНАЛА С ВПЕРВЫЕ ОПИСАННЫМ ПАТОГЕННЫМ ВАРИАНТОМ D579Y (c.1735G>T). *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(2):166-169. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15040>

For citation: Kondratyeva E. I., Melyanovskaya Yu. L., Petrova N. V., Zinchenko R. A., Kutsev S. I. CLINICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS AND A FUNCTIONAL ASSESSMENT OF THE WORK OF THE CHLORIDE CHANNEL WITH THE FIRST DESCRIBED PATHOGENIC VARIANT D579Y (c.1735G>T). *Medical News of North Caucasus*. 2020;15(2):166-169. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15040> (In Russ.)

ДН – дыхательная недостаточность
МВ – муковисцидоз
МЗСД – МВ-зависимый сахарный диабет
ОНПН – околоносовые пазухи носа
ОРКП – определение разности кишечных потенциалов
СОП – стандартная операционная процедура
цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

CFTR – ген муковисцидозного трансмембранного регулятора
CFTR – канал и белок
DIDS – 4,4'-диизотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота
IBMX – 3-изобутил-1-метилксантин
 Δ ISC – ток короткого замыкания

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз (cystic fibrosis) – заболевание, обусловленное патогенными генетическими вариантами в гене MBTR (муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости) (CFTR – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) и наследуемое по аутосомно-рецессивному типу. В связи с генетическим дефектом поражаются почти все жизненно важные органы и системы. По данным неонатального скрининга, частота муковисцидоза в России в среднем составляет 1 на 10 000 новорожденных [1], с вариациями в регионах страны.

Ген CFTR расположен на длинном плече 7-й хромосомы в регионе 31.1 (7q31.1) и включает 27 экзонов. Белок CFTR относится к АТФ-связывающим кассетным белкам, состоит из пяти доменов: двух мембранно-охватывающих (MSD1 и MSD2), двух нуклеотид-связывающих (NBD1 и NBD2) и регуляторного домена (R) [2, 3]. Функционирует CFTR как цАМФ-зависимый хлорный канал, участвующий в переносе ионов хлора, регуляции других ионных каналов и мембранного транспорта [4]. Нарушение функции CFTR приводит к блокировке транспорта ионов хлора, увеличению абсорбции ионов натрия, нарушению электролитного состава секрета. Следствием этого является снижение или прекращение секреции жидкости через апикальную мембрану клеток эпителия.

Клинические проявления заболевания разнообразны и характеризуются хроническим, прогрессирующим поражением всего дыхательного тракта, экзокринной, реже – эндокринной недостаточностью поджелудочной железы, нарушениями работы желудочно-кишечного тракта и гепатобилиарной системы, снижением репродуктивной функции (прежде всего у мужчин) и рядом других проявлений [5].

Многообразие клинических проявлений муковисцидоза обусловлено разнообразием вариантов нуклеотидной последовательности гена CFTR [6]. На веб-сайте международного проекта CFTR2 указано 352 патогенных варианта гена (по состоянию на 10 января 2020 г.). В Регистре больных муковисцидозом РФ за 2017 год представлены 196 патогенных варианта CFTR, 94 из них встречались неоднократно [7].

Цель исследования: описать клиническую картину заболевания у пациентов, несущих в своем генотипе редкий вариант нуклеотидной последовательности гена CFTR – с.1735G>T (D579Y).

Материал и методы.

Для оценки клинической картины использовались данные национального Регистра больных муковисцидозом РФ за 2017 год [10], выписки из историй болезни (форма 003/у, приказ Минздрава СССР от 04.10.1980 г. № 1030), амбулаторной карты пациента (форма 025/у-04, утвержденная приказом Минздравсоцразвития России от 22.11.2004 г. № 225). Проект «Регистр больных муковисцидозом Российской Федерации» одобрен Комитетом по этике ФГБНУ «МГНЦ» 20 декабря 2012 г. (председатель этического комитета – проф. Л. Ф. Курило). Все пациенты с муковисцидозом и/или их представители подписывали форму согласия пациента (родителя пациента) с муковисцидозом на участие в Регистре муковисцидоза.

Данные в Регистр вносились согласно требованиям Европейского регистра [11]. При анализе оценивали: анамнез заболевания (возраст установления диагноза, показатели хлоридов пота при проведении потового теста), микробный пейзаж, нутритивный статус, данные спирометрии, осложнения муковисцидоза (МВ-зависимый сахарный диабет – МЗСД, цирроз печени, назальные полипы, кровохарканье и легочные кровотечения, эпизоды пневмоторакса), аллергический бронхолегочный аспергиллез, проводимую терапию.

Геномную ДНК пациентов для секвенирования выделяли из лейкоцитов венозной крови с соблюдением рекомендаций фирмы «Promega» (USA) с использованием реактивов «Wizard Genomic DNA Purification Kit». Анализ последовательности гена CFTR проведен секвенированием по Сэнгеру.

Использована информация о патогенных вариантах гена CFTR следующих баз данных: «МГНЦ» по генетике [12], CFTR1, CFTR2, Exome Aggregation Consortium, Genome Aggregation Database, Exome Variant Server, 1000 Genomes Project, dbSNP, dbVar, OMIM, Human Gene Mutation Database, Clin Var, Human Genome Variation Society, DECIPHER.

Для установления или подтверждения клинической значимости вновь обнаруженного варианта нуклеотидной последовательности гена CFTR использовали метод определения разности кишечных потенциалов (ОРКП), для чего применяли биопсийный материал прямой кишки пациента. Протокол метода ОРКП полностью соответствовал европейским стандартным операционным процедурам (СОПам) – V2.7_26.10.11 [13]. Функциональная активность CFTR определялась на мембранах эпителиальных клеток ректальных (кишечных) биоптатов в ответ на введение стимуляторов: амилорида, форсколина/IBMX (для определения функции хлорного канала), генистеина, карбахола, DIDS и гистамина. Исследование и форма информированного добровольного согласия были одобрены Комитетом по этике ФГБНУ «МГНЦ» Минобрнауки России 15 октября 2018 года (председатель этического комитета – проф. Л. Ф. Курило). Контролем полученных данных служили результаты исследования «Multicenter Intestinal Current Measurements in Rectal Biopsies from CF and Non-CF Subjects to Monitor CFTR Function» [14].

Рис. 1. Хроматограмма фрагмента 12-го экзона (с.1735G>T)

Результаты и обсуждение. Патогенный генетический вариант D579Y (с.1735G>T) представляет собой замену гуанина на тимин в положении 1735 в 13-м экзоне (в 12-м согласно прежней номенклатуре) (рис. 1). Он описан как вариант с неясным клиническим значением, его класс не известен в CFTR1 [15] и ClinVar [16], а в CFTR2 информация о нем отсутствует.

В регистре пациентов с МВ 2017 года имеются данные о 3 больных (24, 16 и 9 лет), имеющих в генотипе данный аллель, что составляет 0,1 % аллельной частоты генетических вариантов. Их генотипы находятся в компаунд-гетерозиготном состоянии с

вариантом F508del. У всех пациентов наблюдаются тяжелое клиническое течение и высокие показатели потового теста.

У двух взрослых характеристика заболевания включала: положительный результат потовой пробы (105 и 95 ммоль/л), наличие хронической панкреатической недостаточности, хронической синегнойной инфекции, полипоза ОНПН, бронхоэктазов. При проведении спирометрии ОФВ₁ был выше 80 % от должного.

Приводим историю болезни ребенка 9 лет с вариантом с.1735G>T (генотипом F508del/с.1735G>T), наблюдающегося в нашем центре. Диагноз: муковисцидоз, смешанная форма. Хронический гнойно-обструктивный бронхит. ДН 0 степени. Бронхоэктазы обоих легких S8-9. Полипозный пансинусит (полипотомия в ноябре 2018 г.). Хроническая панкреатическая недостаточность. Микробиологический диагноз: хроническая стафилококковая инфекция, интермиттирующий высев *P. aeruginosa*, *Burkholderia gladioli* (ноябрь 2018 г.). Генетический диагноз: F508del/с.1735G>T (класс не установлен, нет в базе CFTR2). Осложнения: дефицит витамина D.

Диагноз муковисцидоза установлен по неонатальному скринингу, результатам потовой пробы на аппарате Нанодакт (122 ммоль/л), панкреатической эластазы-1 (менее 15 мкг/г кала). Длительно наблюдается транзиторный высев *P. aeruginosa*, в 2018 году выявлена *Burkholderia gladioli*. Проведена эрадикационная антибактериальная терапия (цефтазидим внутривенно, ингаляции тиамфеникола (флуимуцил-антибиотика), бисептол перорально) с положительным эффектом (*Burkholderia gladioli*, по данным ПЦР-диагностики, не обнаруживалась). На КТ легких в ноябре 2018 года имелись бронхоэктазы обоих легких в S8-9, спустя год отмечается затруднение носового дыхания, в легких жесткое дыхание, единичные хрипы, появление «часовых стекол». По данным УЗИ органов брюшной полости, определялись диффузные изменения поджелудочной железы.

Ребенок получает панкреатин по 10 000 ЕД/кг массы тела, урсодезоксихолевую кислоту, бронхолитики, муколитики (ингаляции Дорназы-альфа, маннитол), колистиметат натрия ингаляционно, внутривенную антибактериальную терапию, терапию полисинусита (мометазон).

После подписания информированного согласия на проведение биопсии толстого кишечника проведен тест определения разницы кишечных потенциалов и зарегистрированы следующие ответы на введение стимуляторов (рис. 2, табл.):

– при добавлении амилорида изменение тока короткого замыкания (ΔISC) практически отсутствует и составляет $2,5 \pm 0,61 \mu A/cm^2$. Амилорид блокирует натриевые каналы (ENaC), которые экспрессируются на

Рис. 2. Метод ОКП у больного с генотипом F508del/с.1735G>T. При введении амилорида и форсколина/IBMX ответ отсутствует, на добавление гистамина и карбахола ток короткого замыкания изменяется в отрицательную сторону

Таблица
Показатели плотности тока короткого замыкания (ΔISC) при введении стимуляторов у пациента, несущего в генотипе вариант с.1735G>T, $\mu A/cm^2$

Показатель	Амилорид	Форсколин/IBMX	Генистеин	DIDS	Гистамин
Биоптат больного № 1	-2	2,5	2	2	8,5
Биоптат больного № 2	-3,5	2	1,5	1,5	2
Биоптат больного № 3	-2	2	2	1,5	6
$M \pm m$ больного	$-2,5 \pm 0,61$	$2,17 \pm 0,2$	$1,83 \pm 0,2$	$1,83 \pm 0,2$	$5,5 \pm 2,32$
Контроль PI-CF*	$-5,2 \pm 2,9$	$6,1 \pm 3,9$	-	-	$8,6 \pm 6,0$
F508del/F508del*	$-18,39 \pm 5,62$	$3,06 \pm 0,89$	$1,83 \pm 0,35$	$1,83 \pm 0,35$	$21,5 \pm 5,46$

Примечание: PI-CF – муковисцидоз с панкреатической недостаточностью; * – данные многоцентрового исследования больных с нуклеотидными последовательностями гена CFTR I и II классов с панкреатической недостаточностью [14].

клетках эпителия в ответ на снижение ионов хлора в околоклеточном пространстве, и вызывает снижение ΔISC [17];

– при внесении стимулятора форсколина/IBMX, активирующего цАМФ-зависимые хлорные каналы (CFTR), ответ был равен $2,17 \pm 0,2 \mu A/cm^2$;

– на введение гистамина ток короткого замыкания изменялся в отрицательную сторону, что отражает отток ионов калия из клеток больного [18], при этом плотность тока достигала $5,5 \pm 2,32 \mu A/cm^2$;

– ответа на генистеин и DIDS не зарегистрировано.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии функции хлорных каналов эпителия у пациента с генотипом F508del/D579Y, а показатели ΔISC при добавлении форсколина были ниже, чем в случаях вариантов гена CFTR с панкреатической недостаточностью, относящихся к I или II классам [14].

Закключение. Таким образом, впервые проведен анализ течения MB у трех неродственных больных, имеющих в генотипе патогенный вариант D579Y (с.1735G>T) в компаунде с вариантом с.1521_1523delCTT (p.Phe508del), а также оценка функции белка CFTR. Отмечены тяжелые клинические проявления болезни с высокими показателями потовой пробы, низкими уровнями эластазы-1 кала, наличием бронхоэктазов, полипоза ОНПН. По данным метода ОКП, наблюдается отсутствие функционирования хлорного канала (CFTR), что позволяет отнести данный вариант к «тяжелым».

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. Н. П. Бочкова».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

- Капранов Н. И., Каширская Н. Ю. Муковисцидоз. М.: «МЕДПРАКТИКА-М», 2014. [Kapranov N. I., Kashirskaya N. Yu. Mukovistsidoz. M.: «MEDPRAKTIKA-M», 2014. (In Russ.)].
- Ивашченко Т. Э., Баранов В. С. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. СПб.: Интермедика, 2002. [Ivashchenko T. E., Baranov V. S. Biokhimicheskiye i molekulyarno-geneticheskiye osnovy patogeneza mukovistsidoza. Spb.: Intermedika. 2002. (In Russ.)].
- Loubieres Y., Grenet D., Simon-Bouy B. [et al.]. Association between genetically determined pancreatic status and lung disease in adult cystic fibrosis patients. *Chest*. 2002;121:1:73-80.
- Mishra A., Greaves R., Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin. Biochem. Rev.* 2005;26:135-153.
- Национальный консенсус «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» Координаторы: Кондратьева Е. И., Каширская Н. Ю., Капранов Н. И., 2016. [Natsional'nyy konsensus «Mukovistsidoz: opredeleniye, diagnosticheskiye kriterii, terapiya» Koordinatory: Kondrat'yeva Ye. I., Kashirskaya N. Yu., Kapranov N. I., 2016. (In Russ.)].
- Strausbaugh S. D., Davis P. B. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin. Chest Med.* 2007;28(2):279-288. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2007.02.011>
- Кондратьева Е. И., Петрова Н. В., Красовский С. А., Зинченко Р. А., Поляков А. В. [и др.]. Характеристика мутаций больных муковисцидозом в Российской Федерации по данным регистра 2017 года и возможности таргетной терапии. *Вопросы практической педиатрии*. 2018;13:6:58-66. [Kondrat'yeva E. I., Petrova N. V., Krasovsky S. A., Zinchenko R. A., Polyakov A. V. [et al.]. Characterization of mutations of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation according to the register in 2017 and the possibility of targeted therapy. *Voprosy prakticheskoy pediatrii*. – *Clinical Practice in Pediatrics*. 2018;13:6:58-66. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.20953/1817-7646-2018-6-58-66>
- Cystic Fibrosis Mutation Database. Mutation Details for c.1083G>A. Available at: <http://www.genet.sickkids.on.ca/MutationDetailPage.external?sp=2175>. Accessed January 22, 2020.
- Петрова Н. В., Марахонов А. Ю., Васильева Т. А., Каширская Н. Ю., Кондратьева Е. И. [и др.]. Особенности спектра мутаций, выявленных при комплексном исследовании гена CFTR у российских больных муковисцидозом. *Альманах клинической медицины*. 2019;47(1):38-46. [Petrova N. V., Marakhonov A. Yu., Vasilieva T. A., Kashirskaya N. Yu., Kondrat'yeva E. I. [et al.]. Features of the spectrum of mutations identified in a comprehensive study of the CFTR gene in Russian patients with cystic fibrosis. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. – *Almanac of clinical medicine*. 2019;47(1):38-46. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2019-47-004>
- Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2017 год. Под ред. А. Ю. Воронковой, Е. Л. Амелиной, Н. Ю. Каширской, Е. И. Кондратьевой, С. А. Красовского [и др.]. М.: «МЕДПРАКТИКА-М», 2019. [Register of cystic fibrosis patients in the Russian Federation. 2017 year. Edited by Voronkova A. Yu., Amelina E. L., Kashirskaya N. Yu., Kondrat'yeva E. I., Krasovsky S. A. [et al.]. M.: MEDPRAKTIKA-M, 2019. (In Russ.)].
- The European Cystic Fibrosis Society Patient Registry. Available at: <https://www.ecfs.eu/ecfspr>. Accessed January 22, 2020.
- Консенсус по клиническим эффектам генетических вариантов. Режим доступа: <http://seqdb.med-gen.ru>. Ссылка активна на 22.01.2020 [Konsensus po klinicheskim efektam geneticheskikh variantov. Available at: <http://seqdb.med-gen.ru>. Accessed January 22, 2020. (In Russ.)].
- Derichs N., Sanz J., Von Kanel T., Stolpe C., Zapf A. [et al.]. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax*. 2010;65:594-599. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.125088>
- Clancy J. P., Szczesniak R. D., Ashlock M. A., Ernst S. E., Fan L. [et al.]. Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and Non-CF subjects to monitor CFTR function. *Plos One J.* 2013;8(9):e73905.
- Cystic Fibrosis Mutation Database. Mutation Details for c.1735G>T Available at: <http://genet.sickkids.on.ca/MutationDetailPage.external?sp=303>. Accessed January 22, 2020.
- ClinVar Genomic variation as it relates to human health. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/53363>. Accessed January 22, 2020.
- van Barneveld A., Stanke F., Ballmann M., Naim H. Y., Tümmeler B. Ex vivo biochemical analysis of CFTR in human rectal biopsies. *Bioch. Bioph. Acta*. 2006;1762:393-397. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.01.007>
- Veeze H. J., Sinaasappel M., Bijman J., Bouquet J., de Jonge H. R. Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 1991;101:398-403.

Сведения об авторах:

Кондратьева Елена Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая научно-клиническим отделом муковисцидоза; тел.: 89162553385; e-mail: elenafpk@mail.ru; ORCID: 0000-0001-6395-0407

Мельяновская Юлия Леонидовна, научный сотрудник; тел.: 89169244225; e-mail: melcat@mail.ru; ORCID: 0000-0002-8814-5532

Петрова Ника Валентиновна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетической эпидемиологии; тел.: 84993206090; e-mail: npetrova63@mail.ru

Зинченко Рена Абульфазовна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории генетической эпидемиологии; тел.: 84993241224; e-mail: renazinchenko@mail.ru

Куцев Сергей Иванович, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, директор; тел.: 84956120037; e-mail: mgnc@med-gen.ru; ORCID: 0000-0002-3133-8018