

Молекулярная эпидемиология наследственной патологии в десяти популяциях Карачаево-Черкесской Республики

Макаов А.Х.¹, Зинченко Р.А.^{2,3}, Хлебникова О.В.², Михайлова Л.К.⁴,
Петрова Н.В.², Гундорова П.², Петрина Н.Е.², Васильева Т.А.²,
Марахонов А.В.^{2,5}, Адян Т.А.², Поляков А.В.², Гинтер Е.К.^{2,6}

¹ — Муниципальное бюджетное лечебно-профилактическое учреждение «Хабезская центральная районная больница», Хабез Карачаево-Черкесской Республики, e-mail: makaov@yandex.ru

² — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, e-mail: renazinchenko@mail.ru

³ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» МЗРФ, Москва, e-mail: renazinchenko@mail.ru

⁴ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н.Приорова» МЗРФ, Москва, e-mail: cito-uchsovet@mail.ru

⁵ — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)», e-mail: marakhonov@generesearch.ru

⁶ — Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская академия последиplomного образования» МЗРФ, Москва, e-mail: ekginter@mail.ru

Представлены результаты медико-генетического обследования населения 10 популяций Карачаево-Черкесской Республики (КЧР) по эпидемиологии (включая молекулярную эпидемиологию) ряда наследственных заболеваний. Методами ПЦР, MLPA и секвенированием по Сенгеру проведена подтверждающая ДНК диагностика 181 пациенту и изучена молекулярная эпидемиология трех наиболее частых наследственных аутосомно-рецессивных заболеваний (муковисцидоз, нейросенсорная тугоухость и фенилкетонурия) у основных этнических групп КЧР (карачаевцы, русские, черкесы, абазинцы, ногайцы). Оценена частота трех заболеваний по данным скрининга новорожденных, которая составила: муковисцидоз 1:2647 чел., нейросенсорная тугоухость — 1:1551, фенилкетонурия 1:1638. Методами секвенирования по Сенгеру и NGS проведена диагностика 2 редких аутосомно-доминантных заболеваний (изолированная аниридия и метатропная спондилоэпиметафизарная дисплазия) в КЧР. Для аниридии и метатропной дисплазии описаны впервые выявленные мутации.

Ключевые слова: генетическая эпидемиология, молекулярная эпидемиология, муковисцидоз, фенилкетонурия, нейросенсорная тугоухость, Республика Карачаево-Черкессия, этнографические группы КЧР

Введение

В последние годы интенсивное развитие медицинской генетики и молекулярной биологии диктуют обществу и современной медицине необходимость изменения врачебного и научного мышления для лучшего понимания роли генов в этиопатогенезе, лечении, эпидемиологии и профилактике заболеваний человека [1]. Использование современных диагностических возможностей в генетико-эпидемиологических исследованиях значительно расширяет представления о молекулярной эпидемиологии моногенной наследственной патологии (МНП) в различных популяциях и этнических группах.

Для многих нозологических форм МНП показана дифференциация не только в распространенности (частоте) по популяциям, но также наличие генетической гетерогенности (аллельной, локусной) заболеваний. Для МНП генетическая гетерогенность заболеваний может быть обусловлена популяционно-демографической структурой регионов, особенностями этногенеза народов, что показано как в зарубежных работах [2, 3], так и в России [4, 5].

В данной статье представлены результаты медико-генетического обследования населения 10 популяций Карачаево-Черкесской Республики по изучению эпидемиологии (включая молекулярную эпидемиологию) наиболее частых наследственных заболеваний.

Материалы и методы исследования

Проведено медико-генетическое обследование населения КЧР: г.Черкесска, г.Карачаевска, Усть-Джегутинского, Карачаевского, Малокарачаевского, Прикубанского, Абазинского, Хабезского, Адыге-Хальбского и Ногайского районов. Суммарная численность обследованного населения составила 317 956 чел., из которых 136 990 (43,08%) — карачаевцы, 77 383 (24,34%) — русские, 46 758 (14,71%) — черкесы, 30 014 (9,44%) — абазинцы, 12 458 (3,92%) — ногайцы и 14 354 (4,51%) — представители других национальностей. Обследовано все население рассматриваемой выборки независимо от национальности. Исследование проведено в соответст-

вии с протоколом генетико-эпидемиологических исследований, неоднократно представленным в наших публикациях [4, 5].

Подтверждающая ДНК-диагностика проведена сотрудниками лабораторий генетической эпидемиологии и ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ». ДНК-диагностика выполнена различными методами: ПЦР, MLPA, секвенирование по Сэнгеру, таргетное высокопроизводительное секвенирование клинически важных генов. ДНК-диагностика проведена 182 пациентам: муковисцидоз — 16 больных, несиндромальная нейросенсорная тугоухость — 111 пациентов, фенилкетонурия — 50 пациентов, аниридия — 4 пациента и метатропная дисплазия — 1 больной.

Все пациенты подписали письменное информированное согласие на добровольное участие в обследовании. В случае несовершеннолетних детей информированное согласие получено у их родителей. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ».

Результаты и обсуждение

Объектом исследования и последующего ДНК-анализа послужили 3 частых аутосомно-рецессивных заболевания муковисцидоз, нейросенсорная тугоухость и фенилкетонурия, по которым проводится скрининг новорожденных, а также 2 редкие нозологические формы (изолированная аниридия и метатропная спондилоэпиметафизарная дисплазия) выявленные в популяции КЧР.

Муковисцидоз (МВ). Муковисцидоз выявлен у 21 пациента из 20 неродственных семей. Оценка распространенности данного заболевания в популяциях сталкивается с определенными трудностями, так как продолжительность жизни пациентов снижена. Распространенность заболевания в 10 популяциях КЧР составила 1:15140, среди карачаевцев 1:6849. Частота МВ, оцененная при скрининге новорожденных, составила 1:2647 (16 пациентов/охват 42345 новорожденных 2007—2015 гг.). Молекулярно-генетический анализ проведен 16 пациентам с МВ (ген *CFTR*). Национальный состав пациентов: 1 русская семья и 15 карачаевских. В русской семье определен генотип F508del/2184insA. Выявлена высокая доля (93,33%) *CFTR* мутации W1282X у больных карачаевцев (28 из 30 аллелей). Тринадцать пациентов гомозиготны по мутации W1282X, двое — гетерозиготные компаунды (идентифицированы вторые аллели: R1066C и R709X). Таким образом, ни у одного больного МВ карачаевца, самая распространенная в Европе и российских популяциях мутация, F508del, не обнаружена. Анализ гаплотипов ДНК-маркеров IVS1CA, IVS6aGATT, IVS8CA и IVS17bCA показал, что источники проникновения мутации W1282X в Карачаево-Черкессию и восточно-европейские регионы России различны.

Нейросенсорная тугоухость (ННТ). Несиндромальная нейросенсорная тугоухость выявлена в 156 семьях (205 больных). Распространенность заболевания составила $6,45 \pm 0,45/10000$ (1:1551 человек). У всех пациентов отмечена прелингвальная несиндромальная нейросенсорная тугоухость 3—4 степени, либо глухота. Подтверждающая ДНК-диагностика выполнена 111 пациентам (из 102 семей) с ННТ. Изучена частота мутации c.35delG в гене *GJB2* у основных этнических групп КЧР (карачаевцы $n = 36$, русские $n = 54$, черкесы $n = 10$, абазинцы $n = 9$, ногайцы $n = 4$). Частота мутаций c.35delG составила 27,31% (26 гомозигот, 7 гетерозигот). У русских пациентов частота мутации c.35delG составила 45,37% (23 гомозитных носителя, три гетерозиготных (49/108)), у карачаевцев 6,94% (2 гомозит, один гетерозиготный носитель (5/72)), у черкесов 40% (3 гомозитных носителя, два гетерозиготных (8/20)), у абазинцев 16,67% (1 гомозитный и один гетерозиготный носитель, 3/18), у ногайцев 0% (0/8). Таким образом, мутация c.35delG в гене *GJB2* характерна для русского населения региона и реже выявляется у титульной нации республики — карачаевцев, что необходимо учитывать при проведении ДНК-анализа пациентам с ННТ и медико-генетическом консультировании [6].

Фенилкетонурия (ФКУ). Фенилкетонурия выявлена у 60 больных (50 карачаевцев, 6 русских, 2 черкесов, 2 абазин) в 52 семьях. Распространенность заболевания в республике составила $1,89 \pm 0,24/10000$ (1:5299 чел.), среди карачаевцев $3,65 \pm 0,52/10000$ (1:2740 чел.). По данным скрининга новорожденных (2007—2015 гг.) частота ФКУ — 1:1638 (28 пациентов/охват 45873 новорожденных 2007—2015 гг.). У 50 пациентов (карачаевцы ($n = 40$), русские ($n = 5$), черкесы ($n = 2$), абазинцы ($n = 2$)) проведена подтверждающая ДНК-диагностика. Выявлена высокая частота (86,25%) мутации R261X (69 из 80 аллелей) у карачаевцев. Тридцать один пациент оказались гомозитным по мутации R261X и семеро — гетерозиготные компаунды со второй идентифицированной мутацией: R413P (6,25%), P211T (3,75%), F331S (2,5%), IVS4-1G>A (1,25%). Частая для европейских и русских популяций мутация R408W у карачаевцев не найдена. У русских больных ФКУ выявлены пять различных генотипов (R408W/Y414C; R408W/IVS10-11G>A; R408W/c.664_665delGA; ex5del/IVS1+5G>T; S349P/R158Q), у черкесов два (IVS10-11g>a/E390G; R413P/c.1089delG), у абазинцев два (R413P/R261X; R413P/L48S). Таким образом, для коренного населения республики — карачаевцев — частыми являются мутации R261X, R413P, P211T, F331S, которые встретились более одного раза.

Редкие нозологические формы: ДНК-диагностика методами секвенирования и NGS

Аниридия. В результате генетико-эпидемиологического обследования населения г.Черкесска КЧР, выявлены две семьи (4 больных) с врожденной изолированной

ной аниридией. Врожденная аниридия — тяжелый наследственный порок развития с аутомно-доминантным (АД) типом наследования. Глазные проявления заболевания складываются из комплексного поражения роговицы, хрусталика, радужной оболочки, декомпенсации внутриглазного давления, гипоплазии фовеа и диска зрительного нерва. Возникновение аниридии в 90% случаев связано с мутациями в гене *PAX6*, локализованном на хромосоме 11 в локусе 11p13 [7]. Проведено прямое двунаправленное секвенирование кодирующей последовательности гена *PAX6* и MLPA-анализ региона хромосомы 11p13, включающего *PAX6*, *WT1* и другие гены. В первой семье аниридией поражены два сибса и их мать (семейный случай). У пробанда (одного из сибсов) и матери в экзоне 8 гена *PAX6* обнаружена известная по литературным данным нонсенс-мутация с.607C>T (одна из трех самых частых мутаций), p.Arg203Ter (R203X) в гетерозиготном состоянии. Она зарегистрирована в базах данных о мутациях человека, в том числе, в HGMD (*HGMD accession CM950911*). Во второй семье — в единичном случае врожденной аниридии — обнаружена ранее не описанная гетерозиготная делеция пяти экзонов гена *PAX6*: 31,778912_31,794631del.

Метатропная дисплазия (ОМIM # 156530) является редкой спондилоэпиметафизарной дисплазией с аутомно-доминантным типом наследования. Как отдельная нозологическая форма впервые была описана Magoteaux и др. в 1966 [8]. Клиническая картина заболевания характеризуется удлинённым туловищем и короткими конечностями, быстро прогрессирующим кифосколиозом, приводящим к карликовости во взрослом возрасте, сниженной приспособленностью пациентов. Заболевание выявлено у черкесской девочки. При помощи NGS определена ранее не описанная мутация p.Pro82Leu (NG_017090.1: g.23856C> T, с.245C> T) в экзоне 1 гена *TRPV4* в гетерозиготном состоянии *de novo*. Мутация ранее не была зарегистрирована, не была выявлена ни у одного из родителей пораженного ребенка. Прогнозируемый функциональный эффект мутации оценен PolyPhen как нарушающий функцию с вероятностью 0,989. Кроме того, мутация с.245C > T не была обнаружена среди 100 хромосом 50 здоровых людей, принадлежащих черкесской популяции. Полученные результаты подтверждают аутомно-доминантный тип наследования МД. Однако, согласно данным ОМIM [9], в семьях с МД вероятность повторного рождения больного ребенка составляет 1:20, что дает основание подозревать гонадный мозаицизм в каждом случае мутации *de novo* в гене *TRPV4*.

Выводы

Изучение молекулярной эпидемиологии в разных популяциях/этнусах важно как с практической, так и с теоретической точек зрения. С практической точки зрения проведение подтверждающей ДНК-диагностики позволяет не только поставить диагноз, а в некоторых случаях уточнить тип наследования (в случае гетерогенных заболеваний) и количество больных в родословной, но и дает возможность семье планировать дальнейшее рождение здоровых детей, что особенно важно при тяжелых инвалидизирующих заболеваниях. С научной точки зрения молекулярная эпидемиология на основании аллельной (локусной) гетерогенности позволяет выявлять дифференциацию популяций/этнических групп даже в случаях схожей распространенности в них конкретных наследственных болезней. Кроме того, молекулярная эпидемиология (спектры и частоты мутаций) косвенным образом отражает особенности формирования популяций и влияние в них основных факторов популяционной динамики.

Список литературы

1. Passarge E. Color Atlas of Genetics // Stuttgart: Georg Thieme (4th editions). 2013:497 p.
2. Orphanet Reports Series: Diseases listed by decreasing prevalence or number of published cases. URL:<http://www.orpha.net/> (дата обращения 05.02..02.2016).
3. Dong-Dong Wu and Ya-Ping Zhang. Different level of population differentiation among human genes. BMC Evolutionary Biology. 2011;11(16). doi:10.1186/1471-2148-11-16.
4. Зинченко РА, Ельчинова ГИ, Галкина ВА, Кириллов АГ, Аброкова АВ, Петрова НВ, Тимковская ЕЕ, Зинченко СП, Шокарев РА, Морозова АА, Близначев ЕА, Вассерман НН, Степанова АА, Поляков АВ, Гинтер ЕК. Дифференциация этнических групп России по генам наследственных болезней. Медицинская генетика. 2007;6(2):29-37.
5. Гинтер ЕК, Мамедова РА, Ельчинова ГИ, Брусинцева ОВ, Кадошникова МЮ, Петрова НВ, Букина АМ, Алалыкин АМ. Отягощенность аутомно-рецессивной патологией популяций Кировской области и ее связь с инбридингом. Генетика. 1993;29(6):1042-1046.
6. Зинченко Р.А., Гинтер Е.К. Особенности медико-генетического консультирования в различных популяциях и этнических группах. Медицинская генетика. 2008;7(10):20-29.
7. Gronskov K, Olsen J, Sand A et al. Population-based risk estimates of Wilms tumor in sporadic aniridia. A comprehensive mutational screening procedure of PAX6 identifies 80% of mutations in aniridia. Hum Genet. 2001;109:11-18.
8. Nishimura G, Lausch E, Savarirayan R, Shiba M, Spranger J, Zabel B, Ikegawa Sh, Superti-Furga A, Unger Sh. TRPV4-associated skeletal dysplasias. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2012;160C(3):190-204.
9. Online Mendelian Inheritance in Man. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (дата обращения 05.02.2016).

Molecular epidemiology of hereditary disease in ten populations of Karachay-Cherkess Republic

Makaov A.Kh.¹, Zinchenko R.A.^{2,3}, Khlebnikova O.V.², Mikhailova L.K.⁴,
Petrova N.A.², Gundorova P.², Petrina N.E.², Vasilyeva T.A.²,
Marakhonov A.V.^{2,5}, Adyan T.A.², Polyakov A.V.², Ginter E.K.^{2,6}

¹ — Municipal Budgetary Health Care setting «Habezskaya central district hospital», Habez, Karachai-Cherkess Republic, 369400, e-mail: makaov@yandex.ru

² — Federal state scientific budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, 115478, e-mail: marakhonov@gensearch.ru

³ — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, e-mail: renazinchenko@mail.ru

⁴ — Federal state budgetary Institution «Central Research Institute NN Priorova» Health Ministry, Moscow, e-mail: cito-uchsovet@mail.ru

⁵ — Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow, 141701

⁶ — Russian Medical Academy of Postgraduated Education, Moscow, 125993, Russia, E-mail: ekginter@mail.ru

The paper presents the results of the medical genetic examination of 10 populations of the Karachay-Cherkess Republic (KCR) describing the epidemiology (including molecular epidemiology) of hereditary diseases. Molecular confirmation of diagnosis was performed for 181 patients by PCR, MLPA and Sanger sequencing. Molecular epidemiology of three the most common inherited autosomal recessive diseases (cystic fibrosis, sensorineural hearing loss and phenylketonuria) was studied in main ethnic groups KCR (Karachays, Russians, Cherkess, Abazins, Nogais). The frequencies of the three diseases were estimated according to the newborn screening data: cystic fibrosis — 1:2647 people, sensorineural hearing loss — 1:1551, phenylketonuria — 1:1638. Two rare autosomal dominant diseases were diagnosed in KCR and confirmed with NGS (isolated aniridia and metatropic spondyloepimetaphyseal dysplasia). This allowed to identify novel previously unreported causative mutations in both cases.

Keywords: genetic epidemiology, molecular epidemiology, cystic fibrosis, phenylketonuria, sensorineural hearing loss, Karachay-Cherkessia Republic, ethnic groups KCR