

Проект национального консенсуса* «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» Раздел «Генетика муковисцидоза. Молекулярно-генетическая диагностика при муковисцидозе»

Петрова Н.В.¹, Кондратьева Е.И.¹, Красовский С.А.^{1,2}, Поляков А.В.¹, Ивашенко Т.Э.³, Павлов А.Е.⁴, Зинченко Р.А.¹, Гинтер Е.К.¹, Куцев С.И.¹, Одинокова О.Н.⁵, Назаренко Л.П.⁵, Капранов Н.И.¹, Шерман В.Д.¹, Амелина Е.Л.², Ашерова И.К.⁶, Гембицкая Т.Е.⁷, Ильенкова Н.А.⁸, Каримова И.П.⁹, Мерзлова Н.Б.¹⁰, Намазова-Баранова Л.С.¹¹, Неретина А.Ф.¹², Никонова В.С.¹, Орлов А.В.¹³, Протасова Т.А.¹⁴, Семейкин С.Ю.¹⁵, Сергиенко Д.Ф.¹⁶, Симонова О.И.¹¹, Шабалова Л.А.¹, Каширская Н.Ю.¹

Координаторы: Капранов Н.И.¹, Кондратьева Е.И.¹, Каширская Н.Ю.¹
Ответственные редакторы: Петрова Н.В.¹, Кондратьева Е.И.¹, Красовский С.А.^{1,2}

* Обсуждение консенсуса проходило на XII Национальном конгрессе, апрель 2015 г. Москва, заседании научного совета экспертов Общероссийской общественной организации «Всероссийская ассоциация для больных муковисцидозом» и лабораторий эпидемиологии и ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» 16 ноября 2015 г.

- ¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, 115478, ул. Москворечье, д.1
- ² — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 105077, ул. 11-я Парковая, д.32
- ³ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, 199034, Менделеевская линия, д.3
- ⁴ — Компания «ПАРСЕК ЛАБ», Санкт-Петербург, 199034, Биржевая линия д.16
- ⁵ — Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр, Томск, 634050, ул. Набережная реки Ушайки, д.10
- ⁶ — Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Ярославской области «Детская клиническая больница №1», Ярославль, 150003, пр. Ленина 12/76
- ⁷ — НИИ пульмонологии ГБОУ ВПО СПбГМУ им. академика И.П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург, 197022, ул. Льва Толстого, д. 6-8
- ⁸ — ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, 660022, ул. Партизана Железняка
- ⁹ — ГБУЗ «Челябинская областная детская клиническая больница» Министерства здравоохранения Челябинской области, Челябинск, 454076, ул. Блюхера, д.42
- ¹⁰ — ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, 614990, ул. Петропавловская, д.26
- ¹¹ — ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва, 119991, Ломоносовский пр-т, д.2, стр.1
- ¹² — ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Воронеж, 394036, ул. Студенческая, д.10
- ¹³ — ГБУЗ «Детская Городская Больница Святой Ольги», Санкт-Петербург, 194156, ул. Земледельческая, д.2
- ¹⁴ — ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», Кемерово, 650066, пр. Октябрьский, д.22
- ¹⁵ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российская детская клиническая больница» Минздрава России, Москва, 117513, Ленинский пр-т, д.117
- ¹⁶ — ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Астрахань, 414000, ул. Бакинская, д.121

Представлены результаты работы группы генетиков ФГБНУ «МГНЦ» и экспертов национального консенсуса «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия». Решение о старте проекта было принято 06.02.2013 на заседании научного совета Общероссийской общественной организации «Всероссийская ассоциация для больных муковисцидозом». Представленный раздел является одним из определяющих в диагностике муковисцидоза (МВ) и основой для таргетной терапии заболевания с использованием фармакогенетических тестов. Консенсус представляет обобщенный российский и международный опыт по генетической диагностике МВ и состояний, ассоциированных с геном *CFTR*. Представлены современная классификация мутаций гена *CFTR*, их клиническое значение, подходы к анализу патогенности. Дан анализ многообразия мутаций гена *CFTR* в Российской Федерации на основе данных Национального регистра за 2014 год, представлены особенности спектра мутаций гена *CFTR* у представителей различных национальностей. Описаны российские и зарубежные панели для выявления наиболее частых мутаций и рекомендации по проведению ДНК-диагностики. Впервые представлены сведения по пренатальной и преимплантационной диагностике заболевания, единые требования к бланку генетического заключения.

Ключевые слова: муковисцидоз, ген *CFTR*, мутации, ДНК-диагностика

Введение

Муковисцидоз (МВ) — частое моногенное заболевание, обусловленное мутациями гена *CFTR* (*ABCC7*). Ген *CFTR* содержит 27 экзонов и расположен в регионе 31.1 длинного плеча хромосомы 7 (7q31.1). Значительные достижения в развитии методов и технологий молекулярно-генетического тестирования позволяют в большинстве случаев успешно осуществлять молекулярно-генетическую диагностику. Наибольшую трудность в настоящий момент представляет оценка вклада в развитие заболевания редких и ранее не идентифицированных мутаций, а также определение связи генотип-фенотип и влияния генов-модификаторов на тяжесть заболевания.

Типы генетических мутаций

Выявленные в гене *CFTR* мутации по типам распределяются следующим образом: миссенс-мутации составляют 39,61%; мутации со сдвигом рамки считывания — 15,60%; мутации, нарушающие сайт сплайсинга — 11,36%; нонсенс-мутации — 8,32%; делеции/инсерции без сдвига рамки считывания — 1,99%; промоторные мутации — 0,75%; обширные перестройки, охватывающие несколько экзонов — 2,59%; варианты последовательности (полиморфизмы) — 13,30%, изменения последовательности, клинические последствия которых не доказаны — 6,38% всех аллелей [1]. Случаи мутаций *de novo* и однородительской дисомии хромосомы 7, несущей мутантный ген *CFTR*, единичны [2].

Связь мутаций в гене *CFTR* с клиническими проявлениями МВ

В соответствии с клиническими проявлениями все мутации в гене *CFTR* можно разделить на четыре группы (далее приведены примеры наиболее частых мутаций, относящихся к разным группам; названия мутаций представлены согласно традиционной номенклатуре):

А. Мутации, приводящие к муковисцидозу: (F508del, R553X, R1162X, 2184insA, 2184delA, 3120+1G>A, I507del, 1677delTA, G542X, G551D, W1282X, N1303K, 621+1G>T, 1717-1G>A, A455E, R560T, G85E, R344W, R347P, 711+1G>T, 711+3A>G(*), 1898+1G>A, S549N, 3849+10kbC>T, E822X, 1078T, 2789+5G>A, 3659delC, R117H-T5(*), R117H-T7(*), D1152H(*), L206W(*), TG13-T5(*);

Б. Мутации, приводящие к *CFTR*-ассоциированным заболеваниям: (R117H-T5(*), R117H-T7(*), TG13-T5(*), TG12-T5(*), D1152H(*), S977F, R297Q(*), L997F, M952I, D565G(*), G576A(*), TG11-T5(**), R668C-G576A-D443Y, R74W-D1270N;

В. Мутации, не имеющие клинического проявления: (I148T, R75Q, 875+40A/G, M470V, E528E, T854T, P1290P, 2752-15G/C, I807M, I521F, F508C, I506V, TG11-T5(**);

В настоящее время считается, что мутации S1235R, I1027T, R31C, 7T, G576A, R668C, V754M, L997F, R1162L не приводят к муковисцидозу, но в некоторых случаях могут встречаться при *CFTR*-ассоциированных заболеваниях. Соответствующие сведения включены в базу данных CFTR2 [CFTR2.org];

Г. Мутации с не доказанным или неясным клиническим проявлением (многие миссенс-мутации).

Наблюдается частичное перекрытие групп А и Б. Так, некоторые мутации, отмеченные значком (*), встречаются как у пациентов с МВ, имеющих сохранную функцию поджелудочной железы, так и у пациентов с *CFTR*-ассоциированными моносимптомными болезнями. Например, у пациентов-носителей мутации D1152H и какой-либо мутации, приводящей к типичному МВ, наблюдается варьирование клинического проявления заболевания от двустороннего отсутствия семявыносящих канальцев до МВ с сохранной функцией поджелудочной железы, но с тяжелым поражением легких. На разнообразии клинических проявлений у больных с такими «пограничными» мутациями оказывают влияние различные факторы: прогрессирование заболевания с возрастом, окружающая среда, гены-модификаторы [2].

В зависимости от механизма, нарушающего функцию белка *CFTR*, мутации гена *CFTR* подразделяют на шесть классов [2, 3]:

Класс I. Нарушение синтеза белка. Результатом мутаций этого класса является нарушение транскрипции мРНК. К нему относятся мутации с наиболее серьезными фенотипическими проявлениями в связи с тем, что они приводят либо к нарушению синтеза стабильного протеина, либо к продукции аномального укороченного протеина вследствие образования кодона терминации. К этому классу относят нонсенс-мутации, мутации сдвига рамки считывания вследствие делеций или инсерций и мутации, приводящие к альтернативному сплайсингу мРНК.

Класс II. Нарушение созревания белка. Мутации класса II приводят к неправильному фолдингу молекулы белка и нарушению ее транспорта к апикальной мембране клетки. В результате происходит деградация молекул *CFTR* в эндоплазматическом ретикулуме и молекула белка не достигает апикальной мембраны. Самой распространенной мутацией этого типа является мутация F508del. Различные миссенс-мутации также приводят к нарушению фолдинга молекулы белка.

Класс III. Нарушение регуляции хлорного канала. Мутации этого класса приводят к синтезу белка *CFTR*, который транспортируется к клеточной мембране, но не отвечает на стимуляцию цАМФ. Мутации класса III локализованы в нуклеотид-связанных доменах и регуляторном домене белка *CFTR*.

Класс IV. Нарушение проводимости хлорного канала. К этому классу в большей степени относятся миссенс-мутации, располагающиеся в мембран-связанных

доменах. Мутации класса IV приводят к изменению проводимости хлорного канала вследствие сокращения времени открытия ионного канала и, соответственно, снижения ионного потока.

Класс V. Снижение количества функционального белка. К классу V относятся мутации, при которых продуцируется пониженное количество нормального транскрипта, или снижается уровень функционального белка, или понижен уровень транспорта молекул белка CFTR. Мутации этого класса нарушают механизм сплайсинга, и транскрипты образуются как в результате aberrантного, так и нормального сплайсинга.

Класс VI. Снижение времени нахождения белка на поверхности клетки. Класс VI включает мутации, приводящие к синтезу протеина с измененной стабильностью в результате потери 70—98 С-концевых аминокислотных остатков [4—7].

Мутации I—III классов гораздо сильнее влияют на функцию белка CFTR, чем мутации IV или V классов, и ассоциированы с классическим МВ. Но следует отметить, что одна и та же мутация может вызывать более чем один механизм нарушения функции CFTR-канала.

В настоящее время ряд исследователей выделяет седьмой класс мутаций. К классу VII относят мутации, в результате которых нарушено образование иРНК (информационной РНК). Это могут быть обширные перестройки гена *CFTR* (делеции, инсерции), охватывающие несколько экзонов и нарушающие нормальную структуру гена и нормальный сплайсинг (примером является распространенная в России делеция *CFTR*del2,3(21kb)), либо мутации, изменяющие донорный или акцепторный сайты сплайсинга одного экзона (например, 1717-1G>A) [8, 9]. Однако большинство специалистов считает нецелесообразным выделение этих мутаций из состава I класса.

Ассоциация генотипа и фенотипа

Значительное варьирование фенотипических проявлений МВ у больных может быть обусловлено действием большого числа факторов, включая разнообразие генотипов гена *CFTR*, влияние генов-модификаторов, факторов внешней среды, в том числе положительного и отрицательного эффекта от лечения [5, 10]. Достоверно известно, что сохранение функции поджелудочной железы является хорошим маркером остаточной активности хлорного канала CFTR [5, 10].

Мутации I, II и III классов, при которых белок CFTR практически полностью отсутствует на апикальной мембране, либо его функция полностью нарушена относятся к «тяжелым» и приводят к существенным нарушениям внешнесекреторной функции поджелудочной железы у больных. Мутации IV и V классов, при которых сохраняется остаточная функция хлорного канала, относятся к «мягким» [4, 11, 12].

Сочетание в генотипе двух «тяжелых» в отношении нарушения функции поджелудочной железы мутаций (например, F508del) в гомозиготном или компаундном состоянии приводит к панкреатической недостаточности, тогда как наличие одной «тяжелой» и одной «мягкой» или двух «мягких» мутаций чаще встречается у больных с сохраненной остаточной функцией поджелудочной железы. «Мягкие» мутации доминируют над «тяжелыми» в отношении панкреатического фенотипа [4, 5, 10, 11]. К мутациям, при которых функция поджелудочной железы остается относительно сохраненной, относят: 3849+10kbC>T, E92K, L138ins, R334W, 2789+5G>A, 3272-16T>A, 3849G>A, R347P, S1159P, S945L, S1159F, L1335P, R117H, 4428insGA, D1152H, E217G, 4382delA, Q98R, A141D, A120T, R1066H, 3272-26A>G, W19G, L864R, p.Phe1078Ile, Q1476X, P205S, P988R, K1468R, 1898+3A>G, 3272-11A>G, Y1032C, A455E, G178R, R352Q, R117C, 711+3A>G, D110H, D565G, G576A, L206W, V232D, D1270N.

Пациенты-носители «мягких» мутаций с высокой вероятностью имеют лучший нутритивный статус, но и более высокий риск развития панкреатита, чем больные с двумя «тяжелыми» мутациями [2]. В ряде исследований было отмечено, что показатель смертности больных, имеющих в генотипе две «тяжелые» мутации, значимо выше, чем больных, имеющих хотя бы одну «мягкую» мутацию. Частично это связывают с большей степенью снижения функции легких и нутритивного статуса, более тяжелой степенью панкреатической недостаточности и ранней колонизацией *P. aeruginosa* у больных, имеющих две «тяжелые» мутации. Предполагают, что генотип по гену *CFTR* может служить независимым фактором прогноза продолжительности жизни больного МВ [12, 13]. Однако, принимая во внимание широкую вариабельность тяжести поражения легких у больных МВ в течение жизни, следует учитывать, что со временем у больных с мутациями IV, V, VI классов функция легких может значительно снижаться. У взрослых пациентов с мутациями IV, V, VI классов можно наблюдать тяжелое поражение легких, тогда как у некоторых больных с двумя мутациями I, II или III классов функция легких может оставаться относительно сохраненной в течение длительного времени [2].

Следует иметь в виду, что разделение мутаций на «тяжелые» и «мягкие» является условным и используется в научных исследованиях, в частности эпидемиологических. Использование же его для оценки клинического прогноза конкретного пациента является некорректным в силу ряда причин:

- 1) в гене *CFTR* обнаружено значительное количество мутаций, частота которых очень низка, что не позволяет проследить их ассоциацию с фенотипом;
- 2) только часть известных мутаций строго ассоциирована с конкретными клиническими проявлениями;
- 3) отдельные мутации могут характеризоваться вариабельностью клинических проявлений;

4) пациенты, гомозиготные по отдельной мутации (например, F508del), обычно строго ассоциированной с определенной формой МВ, могут иметь менее выраженную степень проявления основных симптомов вследствие ранней диагностики и современной терапии по сравнению с пациентами, диагноз у которых был установлен до введения неонатального скрининга.

На основании имеющихся данных можно сделать следующие выводы:

- фенотип заболевания зависит как от генотипа по гену *CFTR*, так и от сопутствующих факторов (других генов, факторов окружающей среды);
- генотип не позволяет однозначно предсказать тяжесть течения и прогноз заболевания у конкретного индивида;
- диагноз МВ не всегда может быть поставлен или отвергнут только на основании результата молекулярно-генетического тестирования;
- при постановке диагноза должны браться в расчет клинические проявления заболевания и дополняться оценкой функции белка CFTR (потовый тест, разность назальных потенциалов или биоптатов прямой кишки) и результатами генетического анализа [2, 7, 14].

Интерпретация результатов молекулярно-генетического анализа

Аннотация генетических вариантов и интерпретация результатов ДНК-тестирования должны выполняться специалистом в области генетики МВ. Для определения клинической значимости обнаруженных генетических вариантов следует использовать базу данных CFTR2.org [15] и Консенсус по клиническим эффектам генетических вариантов (база данных SeqDB <http://seqdb.med-gen.ru/>), а также рекомендации настоящего Консенсуса и имеющиеся стандарты и руководства [16–19].

Интерпретация генетических вариантов с неопределенной клинической значимостью должна проводиться с большой осторожностью и при наличии опыта у специалиста. Обо всех неизвестных ранее клинически-значимых находках следует сообщать куратору базы данных SeqDB (<http://seqdb.med-gen.ru/>), либо самостоятельно регистрировать новую информацию на данном ресурсе, используя «Руководство по использованию базы данных SeqDB» (<http://seqdb.med-gen.ru/docs/>). База данных SeqDB создана и поддерживается представителями сообщества специалистов в области генетики МВ.

Диагностические критерии МВ

В диагностических критериях заболевания генетической диагностике отводится важная роль, однако диагноз может быть поставлен без данного исследования. Для подтверждения диагноза достаточно двух признаков, по одному из каждого блока:

- 1.1. Уровень хлорида в поте выше 59 ммоль/л, и/или
- 1.2. две мутации в гене *CFTR* в транс положении, вызывающие МВ, и
 - 2.1. неонатальная гипертрипсиногенемия или
 - 2.2. характерные клинические признаки, включая (но не ограничиваясь) распространенные бронхоэктазы, положительную культуру мокроты на связанные с МВ микробные патогены (особенно *P.aeruginosa*), экзокринную панкреатическую недостаточность, синдром потери солей; обструктивную азооспермию (мужчины), наблюдавшиеся с рождения или появившиеся позже [20, 21, 22, 23].

Неопределенный диагноз при положительном неонатальном скрининге на МВ

Относительно недавно Европейское общество по муковисцидозу предложило выделять группу детей после неонатального скрининга с новым диагнозом: *неопределенный диагноз при положительном неонатальном скрининге на муковисцидоз (CFSPID)* и выработало новые рекомендации для наблюдения за данной группой детей. В рекомендациях по муковисцидозу США (Cystic Fibrosis Foundation) для этой группы детей используется термин *CFTR-зависимый метаболический синдром (CFTR-related metabolic syndrome, CRMS)*.

Рекомендовано после неонатального скрининга детей с положительным иммунореактивным трипсиногеном (ИРТ) без клинических проявлений заболевания разделять на две группы:

А — имеющих нормальные хлориды пота (<30 ммоль/л) и две мутации в гене *CFTR*, из которых, по крайней мере, одна имеет «неясные» фенотипические последствия;

В — имеющих пограничные значения хлоридов пота и одну или ни одной мутации в гене *CFTR*.

Наблюдение за детьми с данным диагнозом осуществляется в центрах МВ. В возрасте 2 лет им рекомендовано проведение потовой пробы, так как у большинства из них к 3 годам могут появиться клинические симптомы МВ [24, 25].

ДНК диагностика при CFTR-связанных нарушениях

Под CFTR-связанными нарушениями (CFTR-related disorders) принято понимать клинические состояния, ассоциированные с нарушением функции гена *CFTR*, но при этом не соответствующие полностью диагностическим критериям МВ [22, 23, 26].

К таким состояниям относятся двустороннее врожденное отсутствие семявыносящих протоков, рецидивирующий острый или хронический панкреатит, диссеминированные бронхоэктазы [23, 26]. Обязательным условием постановки диагноза является наличие хотя бы од-

ной идентифицированной мутации в гене *CFTR* [22]. Однако клиническая практика показывает, что почти у 75% больных с диссеминированными бронхоэктазами диагностируется МВ, и нередко больной с бесплодием при дообследовании оказывается больным МВ.

Высказано предположение, что в основе патофизиологических изменений при *CFTR*-связанных нарушениях лежит нарушение бикарбонатной проводимости канала *CFTR*. Канал *CFTR* осуществляет проведение не только ионов хлорида (Cl^-), но и ионов бикарбоната (HCO_3^-). Экспериментально показано, что бикарбонатная проводимость канала *CFTR* повышается посредством *WNK1-SPAK* активации [27]. Полное нарушение функции *CFTR* как хлорного канала при «тяжелых» мутациях приводит к клинической картине МВ. При таких генетических вариантах, как R74Q, R75Q, R117H, R170H, L967S, L997F, D1152H, S1235R, D1270N, проводящие свойства *CFTR* для хлоридов сохраняются. Однако наличие этих вариантов в молекуле *CFTR* нарушает активационный механизм *WNK1-SPAK*, что приводит к селективному нарушению функции *CFTR* как бикарбонатного канала. При этом поражаются органы, использующие, как полагают, *CFTR* для секреции бикарбоната, что повышает риск развития панкреатита, синусита и мужского бесплодия [27].

Генетические особенности врожденного двустороннего отсутствия семявыносящих протоков (ВДОСП; CBAVD)

Около 3% случаев бесплодия у мужчин обусловлено наличием ВДОСП. Заболеваемость ВДОСП составляет приблизительно 1:1000 мужчин. Установлено, что в большинстве случаев, изолированное ВДОСП является аутосомно-рецессивным генетическим расстройством, связанным с мутациями в гене *CFTR* с сохранением остаточной функции белка *CFTR*. Для ВДОСП характерно носительство в транс-положении одной «тяжелой» и одной «мягкой» мутации или двух «мягких» мутаций, а также «мягкой» мутации и мутации с неопределенной клинической значимостью или двух мутаций с неопределенной клинической значимостью [23].

У мужчин с ВДОСП в европейских популяциях наиболее распространенными являются два компаундных гетерозиготных генотипа: мутация F508del в транс-положении с вариантом IVS8-5T (28%) или с мутацией R117H (6%). Частота F508del при ВДОСП варьируется от 12 до 33%. Вариант IVS8-5T обнаружен во многих случаях ВДОСП даже в популяциях, где МВ встречается редко. Частота аллеля IVS8-5T у мужчин с ВДОСП составляет 25–40%, что в 5–8 раз выше, чем в общей популяции. Генотип, гомозиготный по этому аллелю, распространен при ВДОСП. Для ВДОСП характерно сочетание мутации R117H с аллелями IVS8-5T и IVS8-7T в цис-положении (комплексные аллели — R117H-5T и R117H-7T). Комплексный аллель R117H-5T часто встречается у пациентов с МВ, в то время как аллель R117H-7T, как правило, не связан с МВ. Повторы IVS8-TG_n (IVS8-TG12 или TG13)

в цис-положении с IVS8-5T также встречаются при ВДОСП. У пациентов с ВДОСП были обнаружены комплексные аллели: G576A-R668C, D443Y-G576A-R668C, R74W-V201M-D1270N и S1235R-IVS8-5T [23].

Ген CFTR

и рецидивирующий (или хронический) панкреатит

Панкреатит может быть обусловлен мутациями в ряде генов и встречаться как у людей без МВ, так и на его фоне. Мутации в гене *CFTR* встречаются у 32–48% больных хроническим панкреатитом с аутосомно-рецессивным типом наследования и у 10–15% больных МВ с сохраненной функцией поджелудочной железы. Больные МВ с «мягкими» мутациями чаще имеют панкреатит.

Помимо мутаций в гене *CFTR* при панкреатите встречаются мутации в генах *SPINK1* (ингибитор сериновой протеазы, тип Казал 1; serine protease inhibitor, Kazal type 1), *PRSSI* (катионный трипсиноген), *AIAT* ($\alpha 1$ -антитрипсин).

Предполагают возможность дигенного наследования панкреатита: часто у пациентов с панкреатитом обнаруживают гетерозиготное носительство мутаций в генах *CFTR* и *PRSSI* или *SPINK1*.

Генетический диагноз — фармакогенетическая терапия

Препараты, действие которых направлено на восстановление функции белка *CFTR*, называются *CFTR*-модуляторами и делятся на группы [29]:

- корректоры *CFTR*: цель — увеличить количество и доставку белка *CFTR* к поверхности клетки;
- потенциаторы *CFTR*: цель — увеличить активность ионного канала *CFTR*, расположенного на поверхности клетки;
- препараты со свойствами модуляторов и потенциаторов;
- вещества, способствующие «прочтыванию» стоп-кодонов *CFTR*-mRNA и предотвращению преждевременной терминации синтеза молекулы белка, используются при лечении пациентов, имеющих нонсенс-мутации (мутации I класса).

В связи с многообразием мутаций гена *CFTR* и различными их последствиями разработка этиотропной и патогенетической терапии, направленной на восстановление функции гена, изначально была сложной задачей и шла по нескольким направлениям:

1. Препараты для носителей мутаций класса I;
2. Препараты для носителей мутаций класса II и наиболее часто встречающейся мутации F508del;
3. Препараты для носителей «мягких» мутаций;
4. Препараты, работающие при всех классах мутаций.

В настоящее время идут исследования (3 фаза) по терапии, направленной на восстановление функции белка при мутациях класса I (Аталурен (PTC124)). Успеха уже удалось добиться при разработке препаратов, направ-

ленных на коррекцию последствий определенного вида мутаций II—V классов: потенциаторов и корректоров. Мишенью потенциаторов являются молекулы мутантного белка CFTR, располагающиеся в апикальной мембране. Действие потенциаторов направлено на восстановление (активацию) функции ионного канала, образованного мутантным белком CFTR (мутации III—IV классов). Первым препаратом стал ивакафтор (Калидеко, VX-770) компании Vertex Pharmaceuticals Incorporated. Препарат получил одобрение FDA для лечения детей, больных МВ, старше 2 лет и взрослых, имеющих одну из 10 мутаций: G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N, S549R или R117H. Корректоры — лекарственные средства, позволяющие мутантному белку CFTR пройти через систему внутриклеточного контроля качества и занять правильное расположение на апикальной мембране (мутации II класса) — 4-фенилбутират/генистин; VX-809. Для терапии пациентов со II классом мутаций (генотип F508del/F508del) разработан комбинированный (корректор + потенциатор) препарат Оркамби (V809 и V770), он показан пациентам старше 12 лет. Идут исследования по снижению возрастных ограничений [7, 29].

Таким образом, разработанные препараты стали новым шагом в терапии МВ и улучшении качества и увеличении продолжительности жизни больных. Исследования в области этиопатогенетической фармакотерапии МВ продолжаются (<http://investors.vrtx.com>).

Другие гены, связанные с развитием МВ

У некоторых пациентов с МВ не удается выявить мутации в гене *CFTR* в обоих аллелях. Это наблюдается в 1—1,5% случаев при полной клинической картине заболевания.

Частично это может быть объяснено тем фактом, что в большинстве случаев проводится исследование лишь кодирующей части гена *CFTR*, и иногда также смежных экзон-интронных участков. Мутации, расположенные в регуляторных участках интронов и промоторных областях гена, в большинстве случаев не исследуются и не анализируются. Распространенность крупных структурных изменений гена (делетий и дупликаций) до настоящего времени также не изучена [2].

Необходимо упомянуть, что МВ характеризуется не только нарушением секреции хлоридов, но и повышенной абсорбцией натрия в дыхательных путях. Транспорт ионов натрия осуществляется через чувствительный к амилориду натриевый канал, состоящий из трех субъединиц. Известно, что повышенная экспрессия гена *Scnn1b*, кодирующего одну из субъединиц, приводит к развитию муковисцидозоподобного состояния в легких у мышей [31]. Это позволяет предположить, что нарушения гена *SCNN1B* могут вызывать заболевание и у людей. По крайней мере у двух пациентов с нетипичным МВ, у которых не идентифицированы мутации

в кодирующей области гена *CFTR*, выявлены функционально значимые мутации в гене *SCNN1B* [32]. Генетические факторы, лежащие в основе других случаев МВ без мутаций в гене *CFTR*, остаются невыясненными [2].

Гены-модификаторы

Различия в характере течения заболевания у больных с одинаковым генотипом по гену *CFTR* наблюдаются как среди неродственных индивидов, так и между сибсами, испытывающими равное влияние таких средовых факторов, как условия проживания, социально-экономический статус, методы лечения. В мультицентровых исследованиях Европы и США выявлена достоверно более высокая конкордантность клинических проявлений (тяжесть бронхолегочного процесса, поражение печени, наличие в анамнезе мекониевого илеуса и синдрома дистальной интестинальной обструкции, нутритивный статус) у монозиготных близнецов по сравнению с дизиготными и просто сибсами, а также значительный диапазон вариабельности характера течения МВ внутри пар сибсов [7, 33]. Приведенные данные свидетельствуют о возможном влиянии на спектр и тяжесть клинических проявлений МВ других, в том числе генетических факторов, отличных от гена *CFTR*. Модифицирующее действие могут оказывать как гены, продукты которых регулируют экспрессию, функцию и утилизацию белка CFTR, так и гены, продукты которых участвуют в процессах, задействованных в патогенезе клинических проявлений МВ.

В результате полногеномного анализа ассоциаций выявлены два кластера генов, расположенных в регионах хромосом 11p13 (гены *APIP*, *EHF*, *ELF5*, *PDHX*) и 20q13.2 (гены *CBLN4*, *MC3R*, *CASS4*, *CSTF1*, *AURKA*), модулирующих тяжесть поражения легких при МВ; показано, что гены *SLC26A9*, *SLC6A14*, *SLC9A3*, *SLC44A4*, *MSRA*, *ADIPOR2* являются модификаторами мекониевого илеуса, а ген *ARRDC3* — регулятором массы тела и энергозатрат у мужчин; для генов *SLC26A9*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B* и *IGF2BP2* показана ассоциация с МВ-зависимым диабетом [33].

В результате поиска генов-кандидатов выявлены ассоциации гена *MNL2* со снижением функции легких при МВ, с ранним поражением *P.aeruginosa* и продолжительностью жизни; для генов *TGFBI*, *IFRD1*, *IL-8*, *EDNRA* показана ассоциация с тяжестью поражения легких; гены *CAPN10*, *TCF7L2* ассоциированы с МВ-зависимым диабетом, а гены *SERPINA1*, *SERPINA1* — с поражением печени при МВ (цирроз с портальной гипертензией) [33].

Частота и распределение мутаций

В постоянно обновляемой базе данных (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>) Консорциума по генетическому анализу МВ (CFGAC) представлено более 2000 вариантов нуклеотидной последовательности, выявленных в гене

CFTR [1]. Только часть из них напрямую связана с развитием заболевания [15; <http://seqdb.med-gen.ru/>].

Наиболее распространенной мутацией гена *CFTR* является F508del, ранее обозначаемая как ΔF508. По имеющимся данным, ее частота составляет более 65% в объединенной мировой выборке обследованных больных МВ. В Европе наблюдается снижение частоты мутации F508del с северо-востока на юго-запад. Около 20 прочих мутаций встречаются в мировой выборке с частотой выше 0,1%. Распространенность отдельных мутаций может существенно варьировать в конкретных регионах и популяциях, что является следствием эффекта дрейфа генов в различных религиозных, этнических или географических изолятах.

В России наиболее частой мутацией также является F508del, составляющая около 52% от общего числа мутантных аллелей в объединенной выборке больных МВ. Ее частота варьирует от 40 до 60% в разных регионах. К настоящему времени у российских пациентов с МВ выявлено 120 различных мутантных аллелей гена *CFTR* (табл. 1), большинство из которых являются весьма редкими [34]. Десять наиболее частых мутаций у российских больных составляют 71,08% от всех мутантных аллелей. Две мутации были определены у 69,3% от числа больных, у которых проводилось генетическое исследование, одна — у 23,4%, ни одной мутации не удалось выявить у 7,3% больных [34].

Приведенные в табл. 1 данные дают общее и несколько смещенное представление о разнообразии и частоте мутаций у российских пациентов с МВ, что связано с рядом особенностей проведения тестирования:

- ДНК-тестирование не является обязательным этапом при диагностике МВ, в том числе и в ходе неонатального скрининга в России, и выполняется по желанию родителей ребенка. Поэтому во многих регионах обследованы не все больные с установленным диагнозом;

- ДНК-тестирование большей части пациентов выполнялось на панелях, включающих ограниченный спектр мутаций (от 11—16 до 30 мутаций);

- в ряде случаев у пациентов с МВ не удается обнаружить двух мутаций, что может быть связано с их отсутствием в стандартных тест-системах, несовершенством алгоритмов ДНК-тестирования, с существованием неизвестных ранее генетических вариантов, атипичных случаев МВ или МВ-подобных состояний, связанных с нарушением работы иных генов.

На основании сведений об эпидемиологической генетике МВ можно сделать следующие предположения:

- частота и спектр мутаций, ассоциированных с развитием МВ, варьируют в зависимости от региона проживания и этнической принадлежности обследуемых пациентов с МВ;

- отсутствуют репрезентативные сведения о спектре и частотах мутаций в гене *CFTR* для всей российской популяции и ряда регионов.

Для расчета вклада отдельных мутаций и их связи с развитием заболевания необходимо продолжить работу по созданию общероссийского регистра пациентов с МВ с внесением в него информации о результатах молекулярно-генетического тестирования всех диагностированных пациентов вне зависимости от формы проявления, возраста манифестации и региона проживания.

Этнические особенности спектра мутаций в гене *CFTR* у российских больных МВ

Спектр и относительные частоты мутаций гена *CFTR* могут существенно варьировать не только в разных обследуемых регионах, но и в разных этнических группах. В недавно проведенной работе, в которой исследованы больные МВ из Республики Чувашия [35], показано, что преобладающей по частоте мутацией у чувашских пациентов является мутация E92K, ранее обнаруживаемая в странах юго-восточного Средиземноморья, в частности, в Турции [26, 36]. Мутация E92K обнаружена на 55,6% мутантных хромосом (20/36) у 18 обследованных чувашских пациентов, тогда как относительная доля мутации F508del составила 25% (9/36). Анализ здоровых индивидов показал, что гетерозиготным носителем мутации E92K является каждый 68-й житель Чувашии (5/343, т.е. 1:68), а мутации F508del — каждый 86-й [35]. Мутация E92K встречается у пациентов из разных популяций Волго-Уральского региона (Чувашия — 53,19%, Удмуртия — 6,76%, Татарстан — 2,38%, Башкирия — 1,37%, Самарская область — 3,06%, Пермский край — 0,75%, Оренбургская область — 1,96%), в Ханты-Мансийском АО — 3,85%, а также во многих других регионах РФ [34]. Высокая доля мутации E92K у чувашей, вероятно, объясняется эффектом основателя и прохождением популяции чувашей через «бутылочное горлышко» в XIV веке.

Мутация W1282X встречается в разных регионах мира. Предполагают, что мутация W1282X произошла в результате единичного мутационного события в популяции ближневосточных евреев до их переселения в Европу. Наибольшей величины ее частота достигает в популяции евреев-ашкенази Израиля (до 50% мутантных аллелей у больных с МВ). Распространение мутации W1282X в других регионах Европы и мира связывают с расселением евреев-ашкенази. Относительно высокая доля этой мутации наблюдается в регионах с высоким уровнем урбанистического населения. Аналогичную тенденцию можно наблюдать и в России: в Москве — 2,93%, Смоленске — 2,94%, Новосибирске — 2,56%, Кемеровской области — 2,17% [34]. Интересным фактом является недавно обнаруженная высокая доля мутации W1282X у больных МВ карачаевцев (18 из 20 аллелей, 90%). Частота мутации W1282X в выборке здоровых карачаевцев из Карачаево-Черкессии составила 1,8% (6/660 хромосом). Проникновение мутации W1282X на Восточный Кавказ можно связать

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

с миграцией евреев из Византии через северное Причерноморье или Грузию в раннем средневековье, или через Персию или Иран в позднем средневековье. Высокую долю мутации W1282X в этой популяции можно объяснить эффектом основателя [37]. Кроме «урбани-

стической» привязанности также очевиден вектор распространения мутации W1282X с юга на север с максимальной частотой в кавказских республиках (в частности в Карачаево-Черкессии) и минимальной встречаемостью севернее Москвы.

Таблица 1

Аллельная частота мутаций муковисцидоза в РФ (регистр 2014 г.)

№	Мутация	Частота, %	№	Мутация	Частота, %	№	Мутация	Частота, %
1	F508del	51,53	42	604insA	0,08	83	Q290X	0,03
2	CFTRdele2,3	5,93	43	624delT	0,05	84	L864R	0,03
3	E92K	2,62	44	I506T	0,05	85	Q359K-T360K	0,03
4	3849+10kbC>T	2,14	45	A96E	0,05	86	2790-2A>G	0,03
5	2184insA	1,80	46	3859delC	0,05	87	E403D	0,03
6	W1282X	1,80	47	1716+1G>A	0,05	88	F1078I	0,03
7	2143delT	1,69	48	2184delA	0,05	89	4095+1G>T	0,03
8	N1303K	1,43	49	Y84X	0,05	90	S549N	0,03
9	G542X	1,16	50	1898+2T>C	0,05	91	Y569D	0,03
10	1677delTA	0,98	51	D579Y	0,05	92	Q1476X	0,03
11	L138ins	0,95	52	E217G	0,05	93	P205S	0,03
12	R334W	0,85	53	Q493R	0,05	94	583delC	0,03
13	394delTT	0,85	54	4022insT	0,05	95	CFTRdele1-11	0,03
14	3821delT	0,45	55	CFTRdele8	0,05	96	CFTRdele 12-13,16	0,03
15	2789+5G>A	0,37	56	Y569H	0,05	97	W496X	0,03
16	S466X*	0,37	57	4382delA	0,05	98	324delC	0,03
17	S1196X	0,37	58	1898+1G>C	0,05	99	P988R	0,03
18	3272-16T>A	0,34	59	Q98R	0,05	100	1525-1G>A	0,03
19	W1282R	0,29	60	3321delG	0,03	101	K1468R	0,03
20	3944delGT	0,21	61	I1226R	0,03	102	574delA	0,03
21	3849G>A	0,19	62	R1158X	0,03	103	1717-1G>A	0,03
22	712-1G>T	0,19	63	A141D	0,03	104	1898+3A>G	0,03
23	621+1G>T	0,19	64	4005+1G>A	0,03	105	2043delG	0,03
24	R553X	0,16	65	A120T	0,03	106	R851X	0,03
25	1367del5	0,16	66	2118del4	0,03	107	CFTRdele 19-22	0,03
26	4015delA	0,13	67	CFTRdele2	0,03	108	2183AA>G	0,03
27	G85E	0,13	68	R1066H	0,03	109	D572N	0,03
28	W1310X	0,13	69	2114delT	0,03	110	175delC	0,03
29	S1159P	0,13	70	3272-26A>G	0,03	111	G480S	0,03
30	R347P	0,13	71	4025delG	0,03	112	4374+1G>A	0,03
31	CFTRdup 6b-10	0,11	72	L812X	0,03	113	G461E	0,03
32	S945L	0,11	73	3457delA	0,03	114	3272-11A>G	0,03
33	R1066C	0,11	74	4005+1G>T	0,03	115	1248+1G>A	0,03
34	1898+1G>A	0,08	75	T604I	0,03	116	1366delG	0,03
35	R1162X	0,08	76	c.3532-3535dup	0,03	117	1725delT	0,03
36	S1159F	0,08	77	1027delG	0,03	118	K598ins	0,03
37	L1335P	0,08	78	W401X	0,03	119	1812-1G>C	0,03
38	R785X	0,08	79	R75X	0,03	120	Y1032C	0,03
39	R117H	0,08	80	R709X	0,03			
40	4428insGA	0,08	81	G551D	0,03			
41	D1152H	0,08	82	W19G	0,03			

Мутацию 394delTT называют «нордической» («северной») мутацией, она распространена с высокой частотой в странах, расположенных по побережью Балтийского моря и связанных с ним речных путей (в Швеции, Норвегии,

Дании, Финляндии, Эстонии, России и т.д.). В России эта мутация обнаружена также в регионах проживания тюркоязычных народов, в этногенезе которых прослеживается угро-финский элемент (Татарстан — 1,59%, Башкирия —

Таблица 2

Спектр мутаций в гене *CFTR* в этнических группах больных муковисцидозом РФ

Мутация	Этносы
F508del	Чеченцы (3/36) Осетины (1/4) Дагестанцы (7/18) Армяне (7/26) Черкесы (1/2) Татары (27/60) Башкиры (2/3) Грузины (4/16) Калмыки (1/2)
1677delTA	Чеченцы (21/36) Ингуши (4/4) Дагестанцы (1/18) Армяне (4/26) Грузины (3/16)
W1282X	Чеченцы (1/36) Осетины (1/4) Карачаевцы (18/20; 90%) Татары (2/60) Еврей-ашкеназы (30–50%) ¹
G542X	Армяне (6/26) Татары (1/60)
R334W	Чеченцы (1/36) Греки (1/2)
E92K	Чуваши (20/36; 55,6%) ² Чеченцы (1/36) Татары (2/60) Башкиры (1/3)
R347P	Дагестанцы (1/18)
R117H	Дагестанцы (1/18)
A96E (с.287C>A)	Дагестанцы (3/18)
S1159F	Дагестанцы (2/18)
с.1262delC (p.Thr421IlefsX21)	Дагестанцы (1/18)
CFTRdele2,3(21kb)	Армяне (1/26) Татары (2/60) Грузины (1/16)
2184insA	Армяне (1/26)
с.3084_3088delinsATG	Осетины (2/4)
R1066C	Карачаевцы (1/20)
R709X	Карачаевцы (1/20)
394delTT	Татары (2/60)
3849+10kbC>T	Татары (2/60) Грузины (1/16)
3821delT	Татары (1/60)
N1303K	Татары (1/60)
S466X(TGA)-R1070Q	Татары (1/60)
2789+5G>A	Татары (1/60)
с.1725delT (p.Phe575LeufsX4)	Калмыки (1/2)
I506T	Иранцы (2/2)

Примечание. ¹ — [34]; ² — [35].

1,37%, Нижегородская обл. — 1,41%, Оренбургская обл. — 1,96%, Самарская область — 1,02%) [34].

Мутация 1677delTA, впервые обнаруженная у грузинских пациентов [26, 38], распространена на Кавказе среди пациентов, относящихся и к другим этническим группам: у чеченцев, ингушей, армян и др. (табл. 2).

В небольшой группе пациентов из Дагестана неоднократно выявлены мутации: A96E, S1159F, R1066C, 1248+1G>A (последняя мутация также однократно встретилась у осетина).

В НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ (г. Томск) систематически проводится анализ спектра мутаций гена *CFTR* у больных МВ из сибирского региона (среди обследованных пациентов преобладают русские). Помимо основного наиболее частого генного дефекта F508del следующие мутации выявляются с частотой >4%: CFTRdele2,3(21kb), E92K, 2184insA, R1066C; с частотой >2%: G542X, 3849+10kbC>T, R1162X, 2143delT, L138ins, E217G, и функционально значимый вариант 5T (IVS8-5T); с частотой ~1%: 2184delA, 394delTT, W1282X, N1303K, R347P, R553X, 3821delT, R117C, Y569C, 3791delC, 2789+5G>A, L1335P, 4015delA, 4040delA, W1310X, R1158X, 1898+1G>C, 1898+1G>A, 1898+2T>C, S1196X, G228R, Q98R, 3944delGT, I148T, 4382delA и крупные внутригенные делеции/дупликации. Охарактеризованы мутации у представителей коренных народностей Сибири (буряты, хакасы, тувинцы, алтайцы). Спектр определённых у них мутаций: F508del, с.650A>G (E217G), R1066C, R1162X, с.293A>G (Q98R), с.682G>C (G228R); две последние — новые мутации [39].

Подход к генетическому тестированию

По рекомендациям Европейского Консенсуса по МВ [2] для обеспечения высокой эффективности диагностический метод должен обеспечивать выявление, по крайней мере, одной клинически значимой мутации в гене *CFTR* не менее чем у 90% больных МВ. При ДНК-диагностике необходимо обеспечивать качественное и достоверное обнаружение генетических вариантов в исследуемой популяции/регионе. Использование в ходе тестирования ограниченного набора мутаций может привести к возникновению ряда проблем, связанных с невысокой диагностической чувствительностью такого подхода в генетически гетерогенных популяциях, и необходимости разработки специфических диагностических панелей, включающих расширенный спектр мутаций.

Для обеспечения достоверности результатов проводимых исследований следует разработать алгоритм и стандарты проведения молекулярно-генетического тестирования и использовать лишь те диагностические методы и наборы реагентов, которые прошли необходимые клинические испытания и имеют подтвержденные в рамках тестирования на достоверной выборке образцов из российской популяции диагностические и аналитические характеристики

Также необходимо отметить важность создания и ведения регистра пациентов с МВ с обязательным внесением в него информации об определенном генотипе с целью разработки более оптимальных диагностических панелей для конкретных регионов.

Панели мутаций гена *CFTR*, используемые в Российской Федерации

1. В лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ «МГНЦ» (www.med-gen.ru) методом гетеродуплексного и рестрикционного анализа проводится тестирование панели 32 частых мутаций: CFTRdele2,3(21kb), G85E, 394delTT, R117H, E92K, A96X, L138ins, 604insA, 621+1G>T, R334W, R347P, S466X(TGA), I507del, F508del, 1677delTA, 1717-1G>A, G542X, G551D, R553X, 2143delT, 2183AA>G, 2184insA, 2789+5G>A, 3272-16T>A, S1159P(F), S1196X, 3667insTCAA, 3821delT, 3849+10kbC>T, W1282X, W1282R, 3944delGT, N1303K.

Выбор мутаций F508del, G542X, G551D, R553X, N1303K, W1282X, R334W, 3849+10kbC>T, 621+1G>T, R117H, 1717-1G>A обусловлен их высокой (более 0,5%) частотой в мировой выборке [26, 40]. Мутации I507del, 394delTT, G85E, R347P, 2789+5G>A были включены в панель на основании их высокой частоты в ряде популяций Европы [36]. Остальные мутации включены в панель на основании собственных исследований ФГБНУ «МГНЦ» и результатов, полученных исследователями из других регионов России [35, 37, 38, 41, 42; 43, 44, 45, 46].

Использование данной панели мутаций позволяет выявить до 80% мутантных аллелей гена *CFTR*: анализ проведен в выборке, включавшей более 1000 российских пациентов с точно установленным диагнозом МВ.

2. В НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ (www.medgenetics.ru) осуществляется тестирование группы частых для больных МВ из сибирского региона мутаций гена *CFTR*: F508del, I507del, 1677delTA, CFTRdele2,3(21kb), E92K, 3849+10kbC>T, R334W, R347P, G551D, R553X, G542X, 2143delT, 2184insA, 394delTT, 306delTAGA, 3821delT, L138ins, N1303K, W1282X, 3944delGT, 2176insC, 2183delAA, 2183AA>G. Если в рамках тестирования указанной панели мутация не обнаружена, выполняется тестирование с использованием коммерческого набора «Elucigene CF-EU2v1» (фирма «Gen-Probe», США) на 50 частых европейских мутаций [39].

3. Компанией Парсек Лаб (Санкт-Петербург) (www.parseq.pro) разработан метод диагностики мутаций гена *CFTR* методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения. В автоматическом режиме выявляется 319 мутаций, ассоциированных с развитием клинически-значимых проявлений МВ, а также широкий спектр мутаций с неподтвержденным/неизвестным клиническим эффектом (включая мутации *de novo*). Метод позволяет также обнаруживать крупные делеции/дупликации гена. Ограничением является невозможность определения длины poly(T)-poly(TG) тракта.

Метод прошел валидационные и верификационные испытания на выборке образцов из российской популяции. Диагностическая чувствительность составляет 99,31% и диагностическая специфичность — 100% [47].

4. Компанией АлкорБио (Санкт-Петербург) (www.alkor-bio.ru) разработана диагностическая панель «Муковисцидоз-БиоЧип», позволяющая тестировать 25 из числа распространенных мутаций гена *CFTR* методом гибридизации на микрочипе: CFTRdele2,3(21kb), G85E, 612+1G>T, R334W, R347P, R347H, 1078delT, F508del, 1677delTA, I507del, 1717-1G>A, G542X, G551D, R553X, 2143delT, 2183AA>G, 2184insA, 2789+5G>A, R1162X, S1196X, 3732delA, 3821delT, 3849+10kbC>T, W1282X, N1303K [48].

5. Компанией «Центр молекулярной генетики» (<http://www.dnalab.ru/diseases-diagnostics/cystic-fibrosis>) используется диагностическая панель для идентификации 30 мутаций: CFTRdele2,3(21kb), F508del, I507del, 1677delTA, 2143delT, 2184insA, 394delTT, 3821delT, G542X, W1282X, N1303K, L138ins, R334W, 3849+10kbC>T, 604insA, 3944delGT, S1196X, 621+1G>T, E92K, 3272-26A>G, 4015delA, 4022insT, W1282R, 2785+5G>A, 3272-16T>A, S466X, 1898+1G>A, 3120+1G>A, R347P, S945L. Суммарная информативность системы составляет около 89,5% от общего числа поврежденных хромосом, при этом вероятность выявить хотя бы одну мутацию у больного — 98,8%, обе мутации — 79,6%.

Качество и достоверность результатов молекулярно-генетического тестирования в значительной степени зависят от комплекса факторов:

- наличия стандартов и контрольных образцов для проверки качества исследования в лаборатории;
- спектра тестируемых генетических нарушений гена *CFTR*;
- метода, используемого для проведения исследования;
- диагностических характеристик используемой панели мутаций в гене *CFTR* для популяции, в которой проводится исследование;
- квалификации специалиста, выполняющего лабораторную часть исследования;
- квалификации специалиста, выполняющего интерпретацию и трансляцию результатов тестирования;
- наличия внешнего контроля качества;
- использования стандартного и однозначного алгоритма ДНК-тестирования в общей схеме диагностики МВ.

Стратегия молекулярной диагностики МВ

Согласно выработанным Консорциумом по МВ рекомендациям [2], стратегия молекулярной диагностики МВ включает несколько этапов.

На первом этапе проводится поиск мутаций, наиболее частых в популяции, к которой принадлежит обследуемый. Для многих стран Европы и Америки определены специфичные панели, обычно включающие 25—35 мутаций, позволяющие выявить до 75—90% всех мутан-

тных аллелей гена *CFTR*. Применяемые в России панели представлены в разделе «Панели мутаций гена *CFTR*, используемые в Российской Федерации».

На втором этапе проводят расширенный поиск более редких мутаций, используя секвенирование по Сэнгеру или высокопроизводительное секвенирование генома (MPS/NGS).

В ФГБНУ «МГНЦ» (Москва) и НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ (Томск) на втором этапе используют метод секвенирования по Сэнгеру для выявления мутаций в гене *CFTR* пациентов, у которых на первом этапе не были идентифицированы одна или обе мутации. Компания Парсек Лаб (Санкт-Петербург) (www.parseq.pro) на втором этапе проводит диагностику мутаций гена *CFTR* методом высокопроизводительного секвенирования нового поколения.

Третий этап. Обычными сканирующими методами, в том числе и секвенированием, можно выявить нарушения последовательности гена, незначительные по протяженности: нуклеотидные замены, небольшие делеции/инсерции. Перестройки, охватывающие несколько экзонов/интронов, такими методами не выявляются. Это можно сделать, используя следующие технологии: MLPA — мультиплексную лигазную зондовую амплификацию, либо QFMP — количественную флуоресцентную мультиплексную ПЦР.

К настоящему времени у российских пациентов с МВ выявлены несколько протяженных делеций: CFTRdeleprom.-10, CFTRdele2-8, CFTRdele5-6a, CFTRdele5-10, CFTRdele12-13,16, у нескольких пациентов выявлена делеция CFTR6b-10, а также протяженные дупликации: CFTRdup6b-10, CFTRdup23,24, CFTRduprom-10.

Следует учитывать, что согласно данным Европейского Консенсуса по МВ проведение расширенного молекулярного исследования гена *CFTR* позволяет выявить мутацию в 98%. Результаты поиска мутаций в гене *CFTR* у российских пациентов, проведенного в соответствии с представленной стратегией, согласуются с данными Европейского Консенсуса [41]. И все-таки остается небольшое число пациентов, у которых одна или даже обе мутации не идентифицированы. Это может быть связано либо с тем, что использованные методы не позволили проанализировать регионы гена, где располагаются мутации, либо с явлением однородительской дисомии, либо с фенотипами МВ. В таких случаях при проведении сегрегационного анализа сцепленных с геном *CFTR* ДНК-маркеров можно определить статус носительства определенных гаплотипов членами обследуемой семьи и подтвердить или опровергнуть обусловленность заболевания нарушениями в гене *CFTR*. Так, выявлены две семьи из Германии, в которых дети с МВ унаследовали от родителей оба гена *CFTR*, такие же, как и их здоровые сибсы; а также две семьи из США, где больные сибсы различались по обоим родительским копиям гена *CFTR* [2].

Пренатальная диагностика МВ.

Организация пренатальной диагностики МВ в РФ

Особенного внимания заслуживает пренатальная диагностика (ПД) МВ в семьях высокого риска. Отличительной чертой молекулярной диагностики является ее универсальность. Это означает, что диагностика может проводиться на любой стадии онтогенеза, в том числе до рождения, и материалом для ДНК-анализа могут быть любые клетки и ткани плода.

Благодаря успехам медицины, зародыш человека доступен для исследований, а значит, и для диагностики, практически на любой стадии развития. Выбор инвазивного метода определяется сроком беременности, инструментальной и методической оснащенностью центра ПД, а также квалификацией акушера-оператора. Для забора плодного материала обычно используют один из трех основных методов. К таковым относятся трансабдоминальная аспирация ворсин хориона/плаценты, амниоцентез или кордоцентез. Образцы ДНК выделяют из биоптатов хориона (плаценты), клеток амниотической жидкости или лимфоцитов пуповинной крови плода. При необходимости для молекулярного анализа можно использовать соскоб клеток с цитологических препаратов, ранее использованных для кариотипирования зародыша.

Принимая во внимание высокую точность методов молекулярной диагностики, их большую чувствительность необходимо помнить, что ее эффективность в значительной мере предопределена соблюдением следующих основных правил:

1. Необходимость точного клинического диагноза у пробанда

Отсутствие точного клинического диагноза МВ у пробанда делает применение молекулярно-генетических методов при ПД некорректным (учитывая, что при невыявленных патологических мутациях у пробанда предполагается проводить косвенную пренатальную ДНК-диагностику по сцепленным ДНК-маркерам). К сожалению, несовершенство лабораторных методов, недостаточный опыт клиницистов и медицинских генетиков, консультирующих семьи высокого риска, нередко ведет к тому, что на инвазивную ПД направляются женщины, не относящиеся к группе высокого риска по этому заболеванию.

2. Своевременное обследование молекулярными методами больного и семьи высокого риска

Идентификация мутаций в гене *CFTR* в каждой семье — необходимое условие успешной ПД. Особенно важно, чтобы идентификация мутаций и молекулярное маркирование мутантных хромосом были проведены еще при жизни больного, и ДНК-обследование каждой семьи высокого риска осуществлено до наступления следующей беременности. Своевременное направление семей или образцов крови семей высокого риска до наступления следующей беременности в центры ДНК-диагностики для идентификации мутаций и выяснения информативности семьи является одним из необходимых условий успешного проведения ПД.

3. Выбор оптимального срока ПД

Решающим преимуществом молекулярной диагностики является возможность использовать для анализа любые ДНК-содержащие клетки организма или ткани. Анализ может быть проведен на любой стадии онтогенеза, начиная со стадии зиготы. На сегодняшний день можно диагностировать МВ в доимплантационном периоде. Материалом для диагностики являются полярные тельца зиготы или отдельные бластомеры дробящейся яйцеклетки, полученные микрохирургическим путем от доимплантационных зародышей — продуктов экстракорпорального оплодотворения.

Исходя из интересов женщины, оптимальным для ПД молекулярными методами считается I триместр (10—12 недели). Это, однако, требует детального ДНК-анализа семьи еще до наступления беременности. Нередко ДНК-диагностику проводят и во II-м триместре, особенно в частично информативных семьях, когда необходимо дополнить ДНК-диагностику соответствующими биохимическими исследованиями.

4. Получение незагрязненного материнскими тканями материала плода

При ПД важно предотвратить контаминацию плодного образца материнскими клетками, учитывая крайне высокую чувствительность метода полимеразной цепной реакции. Избежать загрязнения образцов плодных тканей материнскими клетками можно только путем тщательного отбора ворсин хориона или плаценты под бинокулярной лупой с последующим отмыванием физиологическим раствором. Особенно важно не допустить попадание материнской крови при заборе пуповинной крови плода путем кордоцентеза. Высокий уровень акушера-оператора и использование качественных реактивов на выявление примеси материнской крови позволяют избежать контаминации [49].

5. Четкость рекомендаций после ПД.

Исходом пренатальной ДНК-диагностики может быть подтверждение диагноза МВ у плода или его исключение (с максимальной вероятностью 99,9%). В последнем случае плод может быть гетерозиготным носителем или не иметь мутантного аллеля гена *CFTR*.

В любом случае, женщина (семья) должна быть в максимально сжатые сроки осведомлена о результатах диагностики и, соответственно, о вероятности рождения больного, гетерозиготного носителя или полностью здорового ребенка.

Окончательное решение о сохранении или прерывании беременности всегда остается прерогативой самой пациентки. При прерывании беременности настоятельно рекомендуется верификация диагноза молекулярными или другими доступными методами.

Нередко ПД молекулярными методами оказывается затруднена в семьях высокого риска, в которых больной МВ ребенок уже умер, а мутации гена *CFTR* не удалось идентифицировать. В таких семьях возможна ПД заболевания биохимическим методом.

Характерные изменения в спектре белков амниотической жидкости плодов с МВ выявляются в течение короткого периода (с 16 по 20 неделю беременности) и являются результатом нарушения проходимости кишечника плода вследствие транзиторного или персистирующего илеуса.

*Алгоритм и точность молекулярной ПД,
возможные источники ошибок*

В ПД молекулярными методами важно учитывать два основных источника ошибок:

- 1) контаминацию плодного образца материнскими клетками (о которой сказано выше);
- 2) возможность кроссинговера при использовании непрямого (косвенного) метода диагностики.

Опыт ПД МВ в России доказывает целесообразность применения как молекулярных, так и биохимических методов ПД.

Разработан оптимальный алгоритм ПД МВ в семьях высокого риска. Согласно данному алгоритму, в каждой семье проводятся молекулярные исследования для определения информативности, т.е. пригодности семьи для молекулярной диагностики.

На 1-м этапе обрабатываются варианты наиболее простой и надежной прямой молекулярной диагностики (идентификация мутаций). Достоверность молекулярной диагностики МВ прямым методом, т.е. путем идентификации мутаций в самом гене *CFTR*, очень высока и приближается к абсолютной. Несмотря на такую точность, учитывая все многообразие возможных изменений в геноме при созревании гамет (кроссинговер) и на начальных стадиях эмбриогенеза (мутагенный эффект) более оправданной является точность ответа около 99,9%.

На 2-м этапе (при наличии больного ребенка и отсутствии идентифицируемых мутаций) тестируются варианты косвенной диагностики (анализ внутригенных ДНК-маркеров: *IVS1CA*, *IVS6aGATT*, *IVS8CA*, *IVS17bCA*, *IVS17bTA*, и сцепленных с геном *CFTR* ДНК-маркеров: *XV-2c*, *KM19*, *CS7*, *J3.11*, *W30*). Следует учитывать, что при использовании внегенных полиморфных сайтов вероятность ошибки диагностики будет прямо пропорционально их расстоянию (и, соответственно, частоте кроссинговера) от гена *CFTR*. Точность не прямой диагностики достаточно высока, так как величина внутригенного кроссинговера, как правило, не превышает 0,1%, а частота кроссинговера между локусом гена *CFTR* и локусами используемых внегенных ДНК-маркеров менее 1%. Принципиально важно проанализировать в семье высокого риска достаточное количество полиморфных сайтов для точного определения, с каким конкретным аллелем наследуется мутантный ген. Оптимальным является подбор двух-трех информативных для семьи ДНК-маркеров. При использовании внегенных маркеров предпочтительно анализировать маркеры, фланкирующие локус гена. Точность ответа при косвенной диагностике варьирует от 99% до 99,9% в зависимости от использованного ДНК-маркера.

И, наконец, на 3-м этапе (если семья полностью неинформативна для ДНК-диагностики) проводится биохимическая диагностика по активности ферментов: двух пептидаз (гамма-глутамилтранспептидазы и аминопептидазы), а также кишечной формы щелочной фосфатазы в амниотической жидкости. Данный этап применяется в РФ в г. Санкт-Петербурге.

Все вышесказанное позволяет утверждать, что проблема ПД МВ в России решена, разработана оптимальная стратегия проведения ПД с применением комплексного подхода и всего спектра молекулярных и биохимических методов, позволяющих провести диагностику на любой стадии внутриутробного развития [38, 49, 50]. Однако требуется информационная и разъяснительная работа с семьями больных для определения носителей мутаций и их своевременного обращения для проведения ПД.

Преимплантационная диагностика

Преимплантационная диагностика — новое направление медицинской генетики, возникшее в 90-х годах благодаря развитию вспомогательных репродуктивных технологий (экстракорпорального оплодотворения) и методов молекулярной цитогенетики и молекулярной генетики для анализа генома единичных клеток. Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД), в том числе и МВ, может стать предпочтительным выбором при планировании семьи для пар, стремящихся избежать повторного рождения ребенка, пораженного наследственной патологией.

В настоящее время наиболее часто используемый подход для ПГД включает биопсию одного blastomera у трехдневного эмбриона, находящегося на стадии 6—10 клеток, полученного методом ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида). Blastomeres анализируют, и здоровые эмбрионы переносят в матку. Такой подход к диагностике снимает проблему медицинского прерывания беременности, возникающую при обнаружении поражения плода, выявленного при проведении ПД в первом или втором триместре беременности. Но процедура, проводимая на столь ранних сроках развития, может быть травматична для эмбриона, снижая его жизненный потенциал. Поэтому наблюдается тенденция к проведению биопсии трофобласта на стадии 5—6-дневной blastocysty. Однако проведение биопсии blastocysty более сложная процедура, чем биопсия blastomera, и к настоящему времени немногие центры изменили свой протокол [51].

По данным Европейского Совета по репродукции и эмбриологии человека (ESHRE), МВ — одно из наиболее частых показаний для проведения ПГД в мире, составляя почти 10% от всех показаний для моногенных заболеваний [51]. Наилучшие практические методические рекомендации для ПГД, включающие описание инфраструктуры, оборудования, материалов, молекулярных процедур, установлены и обновляются Консорциумом ESHRE [52]. В России ПГД сосредоточена в нескольких центрах вспомогательных репродуктивных технологий в Москве и Санкт-Петербурге [50].

1. Критерии направления пациентов для проведения молекулярно-генетического тестирования:

- новорожденные с положительным ИРТ и положительными или пограничными значениями потовой пробы, мекониевым илеусом;
- люди с пограничными значениями потовой пробы (см. раздел «Диагностика муковисцидоза. Потовая проба»);
- пациенты с клиническими проявлениями классического или моносимптомного МВ;
- CFTR-ассоциированные заболевания (панкреатит, бесплодие у мужчин);
- родственники больных МВ (для определения статуса носительства по желанию);
- мать больного МВ (до беременности, или во время беременности при наличии больного в семье);
- плод на 10–12-й неделе при подозрении на МВ (при наличии больного МВ sibsa), или обнаружении гиперэхогенного кишечника при УЗИ-обследовании);
- доноры для программ ЭКО.

2. Стандарты проведения молекулярно-генетических исследований при муковисцидозе

Требования к лаборатории, проводящей анализы на мутации гена *CFTR* [2, 14]:

- лаборатория должна быть способна к выполнению тестирования ДНК с использованием высушенных проб крови, цельной крови (с ЭДТА) и мазков буккального эпителия;
- анализ проб должен проводиться не реже 1 раза в неделю во избежание значительной задержки обработки;
- медицинское учреждение, где расположена лаборатория, должно иметь лицензию по специальности «клиническая лабораторная диагностика»;
- в региональной лаборатории в качестве стартового исследования следует применять панель для анализа ограниченного числа мутаций в гене *CFTR*, с помощью которой можно распознать не менее 1 аномального аллеля более чем у 90% пациентов с МВ в локальной популяции;
- если распознана лишь одна мутация, расширенный анализ ДНК (секвенирование гена и др. методы) должен быть доступен в региональной лаборатории или в других лицензированных лабораториях, имеющих опыт диагностики МВ;
- клиническую значимость обнаруженных генетических вариантов следует устанавливать с учётом рекомендаций настоящего Консенсуса.

3. Список требований к диагностическим панелям и методам с помощью которых проводится молекулярно-генетическое тестирование *CFTR*

В качестве стартового исследования, следует применять панель для анализа ограниченного числа мутаций в гене *CFTR*, с помощью которой можно распознать не менее 1 аномального аллеля у более чем 90% пациентов с МВ в локальной популяции [2, 16].

Десять наиболее частых мутаций у российских больных, по данным регистра МВ 2014 г., составляют 71,08% от всех мутантных аллелей, что также обеспечивает идентификацию, по крайней мере, одного мутантного аллеля не менее чем у 90% пациентов с МВ (91%) в общей российской выборке.

4. Бланк генетического заключения

Комитетом по контролю качества ESHG Quality committee [53] разработаны рекомендации по оформлению заключений диагностических генетических тестов.

Для корректной интерпретации результатов рекомендовано в направление для генетического тестирования включать оптимальное количество клинической информации. Цель исследования должна быть четко определена (например, подтверждение диагноза, установленное другими методами, дифференциальная диагностика нескольких заболеваний, тестирование носительства, пренатальное тестирование). Этническая принадлежность/ национальность индивида, родословная, составленная генетиком, и другая дополнительная информация может быть указана при необходимости.

Рекомендовано на каждого неродственного пациента заполнять отдельное заключение в целях сохранения конфиденциальности. Однако в случае рецессивных заболеваний, когда устанавливают риск для пары иметь пораженного ребенка, необходимо, чтобы оба индивида были обследованы одновременно. Если члены одной семьи обследуются одновременно, вопрос о заполнении индивидуальных или общих заключений зависит от заболевания, цели обращения и т.д.

Рекомендовано, чтобы заключение генетического обследования включало следующие разделы:

1. Административный

- Название (например, Результат молекулярно-генетического исследования *ФФФ* гена);
- Название лаборатории, выполняющей исследование и заполняющей заключение, и контакты
- Дата заполнения заключения

(Следует указать номера и общее число страниц, если заключение состоит из нескольких страниц (например, 1/3))

• Ф.И.О. и полный адрес врача, направившего пациента на исследование.

2. Идентификация обследуемого индивида и образца

- Фамилия, имя, отчество (полностью)
- Дата рождения (полностью)
- Пол
- обследуемый материал (ДНК, выделенная из..., кровь с ЭДТА, биоптат..., культивированные амниоциты, клетки ворсин хориона и т.д.)
- состояние образца (заморожен, гемолизирован и т.д.).

3. *Цель исследования.* Изложение цели исследования должно включать по крайней мере три аспекта:

- наименование заболевания или маркеры, которые были протестированы (например, муковисцидоз);
- тип тестирования (например, подтверждение диагноза, определение статуса носительства, пренатальная диагностика и т.д.);
- причина назначения тестирования (например, семейная история муковисцидоза).

4. Спецификация генетического тестирования

- названия использованных методов исследования;
- список протестированных мутаций, ДНК-маркеров, при секвенировании — исследованные регионы гена, референсная последовательность;
- если использован коммерческий набор, его название и версия;
- чувствительность метода в популяции, из которой происходит обследуемый индивид, если это возможно.

5. Результат

Результат должен быть ясно представлен в однозначной форме. Если проведено несколько исследований, каждый результат следует представлять отдельно. Не следует использовать термины «положительный» и «отрицательный», так как они могут быть истолкованы неоднозначно.

Для обозначения выявленных генетических вариантов следует использовать номенклатуру и референсную последовательность, рекомендуемую HGVS. Поскольку номенклатура и рекомендуемая референсная последовательность со временем меняются необходимо использовать также традиционные обозначения мутаций, в скобках указывая их.

Если выявлено более одного патогенного генетического варианта, следует указывать фазу сцепления (если она известна).

5. Интерпретация результата

Согласно рекомендациям Комитета по контролю качества ESHGQ [53], лабораторное заключение должно содержать информацию, которая позволила бы врачам-генетикам осуществить клиническую интерпретацию результата исследования с использованием литературных ресурсов (например, описан ли обнаруженный миссенс-вариант в базах данных, к какому классу отно-

сится, известно ли его клиническое значение; в случае необходимости можно рекомендовать проведение генеалогического/семейного исследования).

Список литературы

1. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>
2. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros.* 2008 May;7(3):179-196.
3. Pettit RS. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Modifying Medications. *Ann Pharmacother.* 2012 Jul-Aug;46 (7-8):1065-1075.
4. Zielenski, J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration.*2000; 67(2):117-133.
5. 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 Nov;26 (4):135-153.
6. Pettit RS, Fellner C. CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis. *P&T®.*2014 Jul; 39(7):500-511.
7. Griesenbach U, Alton EW. Recent advances in understanding and managing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction. *F1000 Prime Rep.* 2015 May 27; 7:64. (<http://f1000.com/prime/reports/m/7/64>).
8. Marson FA, Bertuzzo CS, Ribeiro JD Classification of CFTR mutation classes *Lancet Respir Med.* 2016 Aug;4(8):e37-8.
9. De Boek K, Amaral MD Progress in therapies for cystic fibrosis *lancet Respir Med.* 2016 Aug; 4(8):662-74.
10. Borowitz D, Durie PR, Clarke LL, et al. Gastrointestinal outcomes and confounders in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 Sep; 41(3):273-285.
11. Ahmed N, Corey M, Forstner G et al. Molecular consequences of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene mutations in the exocrine pancreas. *Gut.* 2003 Aug; 52 (8):1159-1164.
12. Koch C, Cuppens H, Rainisio M, et al. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr Pulmonol.* 2001 Jan; 31(1):1-12.
13. Koch C. Early Infection and Progression of Cystic Fibrosis Lung Disease. *Pediatr Pulmonol.* 2002 Sep;34 (3):232-236.
14. Smyth AR, Bell SC, Bojcin S et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. *J Cyst Fibros.* 2014 May; 13 Suppl 1:S23-42.
15. <http://www.cftr2.org>
16. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May; 17(5):405-424.
17. Wallis Y, Payne S, McAnulty C, et al. Practice Guideline for the Evaluation of Pathogenicity and the Reporting of Sequence Variants in Clinical Molecular Genetics. Available at <https://www.acgs.uk.com>.
18. *Clinical Genomics. A Guide to Clinical Next Generation Sequencing.* Edited by S. Kulkarni, J. Pfeifer. Elsevier Inc., Academic Press, London, UK.2015, pp. 470. ISBN: 978-0-12-404748-8.
19. Quintans B, Ordonez-Ugalde A, Cacheiro P, et al. Carracedo, A., Sobrido, M.J. Medical genomics: The intricate path from genetic variant identification to clinical interpretation. *Appl Transl Genom.*2014 Jun 16; 3(3):60-67.
20. Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros.* 2005 Mar;4(1):7-26.

21. Farrell P M, Rosenstein B J, White T B, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr.* 2008 Aug; 153(2):S4-S14.
22. DeBoeck K, Wilschanski M, Castellani C, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax.* 2006 Jul; 61(7):627-635.
23. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros.* 2011 Jun; 10 Suppl 2:S86-102.
24. Munck A, Mayell SJ, Winters V. Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis (CFSPID): A new designation and management recommendations for infants with an inconclusive diagnosis following newborn screening. *J Cyst Fibros.* 2015 Nov; 14(6):706-713.
25. Ooi CY, Castellani C, Keenan K et al. *Pediatrics.* 2015 Jun; 135(6):e1377-85.
26. World Health Organization. Classification of cystic fibrosis and related disorders, Report of a Joint Working Group of WHO/ICF(M)A/ECFS/ECFTN, 2001. *J Cyst Fibros.* 2002 Mar; 1(1):5-8.
27. LaRusch J, Jung J, General IJ, et al. Mechanisms of CFTR functional variants that impair regulated bicarbonate permeation and increase risk for pancreatitis but not for cystic fibrosis. *PLoS Genet.* 2014 Jul 17; 10(7):e1004376.
28. Witt H. Chronic pancreatitis and cystic fibrosis. *Gut.* 2003 May; 52 Suppl 2:ii31-41.
29. Pettit RS, Fellner C. CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis. *P T.* 2014 Jul; 39(7):500-511.
30. Кондратьева ЕИ. Инновационные методы терапии муковисцидоза. *Врач.* 2016 №2:77-81.
31. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med.* 2004 May; 10(5):487-493.
32. Sheridan MB, Fong P, Groman JD, et al. Mutations in the beta subunit of the epithelial Na⁺ channel in patients with a cystic fibrosis-like syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005 Nov 15; 14(22):3493-3498.
33. Gallati S. Disease-modifying genes and monogenic disorders: experience in cystic fibrosis. *Appl Clin Genet.* 2014 Jul 10; 7: 133-146.
34. Красовский СА, Каширская НЮ, Черняк АВ и др. Генетическая характеристика больных муковисцидозом в Российской Федерации по данным национального Регистра (2014г). *Пульмонология* 2016; 26 (2): 133-151.
35. Степанова АА, Абрикова АВ, Саваскина ЕН, Поляков АВ. Мутация р.Е92К — основная причина муковисцидоза у чувашей. *Генетика.* 2012; 48(7): 863-871.
36. Bobadilla JL, Macek M Jr, J.P. Fine J P, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations — correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002 Jun; 19(6):575-606.
37. Петрова НВ, Тимковская ЕЕ, Васильева ТА, и др. Особенности спектра мутаций в гене *CFTR* у больных муковисцидозом из Карачаево-Черкессии. *Медицинская генетика.* 2015; 14 (7): 32-36.
38. Иващенко ТЭ, Баранов ВС. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. *Спб.: Интермедика.* 2002. 256 с. ISBN 5-89720-043-2.
39. Одинокова ОН. Расширенный поиск мутаций гена *CFTR* в выборке больных муковисцидозом из Сибирского региона. Сборник тезисов VII ежегодной Северо-Западной с международным участием научно-практической конференции по муковисцидозу «Практика лечения муковисцидоза» (Санкт-Петербург, 27-28 мая 2016). 2016. с.9-13.
40. Castellani C, Benetazzo MG, Tamanini A et al. Analysis of entire coding region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in neonatal hypertrypsigenaemia with normal sweat test. *J Med Genet.* 2001 Mar; 38(3):202-205.
41. Петрова НВ, Васильева ТА, Тимковская ЕЕ и др. Анализ редких мутантных аллелей гена *CFTR* у российских больных. Сборник тезисов XI Национального конгресса «Муковисцидоз у детей и взрослых. Взгляд в будущее» (Москва, 24-25 мая 2013). 2013. с.66-67.
42. Корицина Г.Ф., Викторова Т.В., Байкова Г.В., Хуснутдинова Э.К. Анализ спектра мутаций и полиморфных локусов гена трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза в Башкортостане. *Генетика.* 2002; 38 (9): 1270-1275.
43. Рукавичкин Д.В. Клинико-генотипический полиморфизм муковисцидоза среди населения Краснодарского края: дисс. на соискание ученой степени к.м.н.: 03.00.15. Краснодар, 2007. 27 с.
44. Verlingue, N.I. Kapranov, B. Mercier et al. Complete screening of the coding sequence of the CFTR gene in a sample of CF patients from Russia: Identification of three novel mutations. *Hum Mutat.* 1995; 5(3):205-209.
45. Одинокова ОН. Молекулярная диагностика муковисцидоза в Сибирском регионе: поиск мутаций гена *CFTR*. Сборник статей и тезисов X Юбилейного Национального конгресса «Муковисцидоз у детей и взрослых». Ярославль, 2011. С.60.
46. Степанова АА, Красовский СА, Поляков АВ. Информативность поиска 19 частых мутаций в гене *CFTR* у российских больных муковисцидозом и расчетная частота заболевания в Российской популяции. *Генетика.* 2015; 52 (2): 231-241.
47. Simakova T, Bragin A, Zaytseva M, et al. NGS-based assay for frequent newborn inherited diseases: from development to implementation. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/050419>
48. Павлов АЕ, Апалько СВ, Воробьев ЕВ. Молекулярно-генетическая диагностика муковисцидоза в формате микрочипа. *Лаборатория.* 2012; (4):16-19.
49. Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней. Под ред. акад. РАМН, проф. Э.К. Айламазяна, чл.корр. РАМН, проф. В.С.Баранова. 2-е изд. М. МЕД пресс информ, 2007. 416 с.: ил. ISBN 5-98322-345.
50. <http://meduniver.com>
51. Girardet A, Viart V, Plaza S, et al. The improvement of the best practice guidelines for preim plantation genetic diagnosis of cystic fibrosis: toward an international consensus. *Eur J Hum Genet.* 2016 Apr 24(4):469-478.
52. Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod.* 2011 Jan; 26(1):33-40.
53. Claustres M, Kozich V, Dequeker E, et al. ESHG Quality committee. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet.* 2014 Feb 22(2):160-170.

Информация о конфликте интересов

Павлов А.Е. руководит ООО «ПАРСЕК ЛАБ».

Поляков А.В. руководит ООО «Центр молекулярной генетики».

Остальные авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Свои предложения по содержанию Проекта национального консенсуса «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» Раздел «Генетика муковисцидоза. Молекулярно-генетическая диагностика при муковисцидозе» следует направлять на электронную почту: cf.center.msk@gmail.com

National Consensus Project

«Cystic fibrosis: definition, diagnostic criteria, treatment»

Section «Genetics of Cystic Fibrosis. Molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis»

Petrova N.V.¹, Kondratyeva E.I.¹, Krasovsky S.A.^{1,2}, Polyakov A.V.¹, Ivachshenko T.E.³, Pavlov A.E.⁴, Zinchenko R.A.¹, Ginter E.K.¹, Kutsev S.I.¹, Odinokova O.N.⁵, Nazarenko L.P.⁵, Kapranov N.I.¹, Sherman V.D.¹, Amelina E.L.², Asherova I.K.⁶, Gembitskaya T.E.⁷, Ilyenkova N.A.⁸, Karimova I.P.⁹, Merzlova N.B.¹⁰, Namazova-Baranova L.S.¹¹, Neretina A.F.¹², Nikonova V.S.¹, Orlov A.V.¹³, Protasova T.A.¹⁴, Semykin S.Y.¹⁵, Sergienko D.F.¹⁶, Simonova O.I.¹¹, Shabalova L.A.¹, Kashirskaya N.Y.¹

¹ — Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, Russia; e-mail cf.center.msk@gmail.com

² — Federal Pulmonology Research Institute, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

³ — FSBSI «The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott», Saint Petersburg, Russia

⁴ — Parseq Lab Co. Ltd, Saint-Petersburg, Russia

⁵ — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

⁶ — Children's Clinical Hospital No.1, Yaroslavl, Russia

⁷ — Research Institute of Pulmonology, SPB State Medical University named Academic Pavlov, Saint Petersburg, Russia

⁸ — Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F.Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

⁹ — State Budgetary Healthcare Institution «Chelyabinsk regional children's clinical hospital», Chelyabinsk, Russia

¹⁰ — Perm State Medical University named after E.A.Wagner of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Perm, Russia

¹¹ — Federal State Autonomous Institution «Scientific Center of Children's Health» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

¹² — Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russia

¹³ — Children City Hospital St.Olga, St.Petersburg, Russia

¹⁴ — State autonomous health care institution «Kemerovo Regional Clinical Hospital named after S.V. Belyaev», Kemerovo, Russia

¹⁵ — Russian Children's Clinical Hospital, Moscow, Russia

¹⁶ — FGBOU VO «Astrakhan State Medical University» of Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russia

The results of researches made by the group of the leading geneticists from Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics» and the experts of national consensus «Cystic Fibrosis: definition, diagnostic criteria, treatment» are presented. The decision about starting of the project was made on 6th February 2013 at a meeting of the Scientific Council of the National social organization «All-Russian Association for patients with Cystic Fibrosis». Three consensus sections has been published already, this section (4) is one of the determinants in the diagnosis of cystic fibrosis and is the pharmacogenetic basis for targeted therapy for the disease. Consensus represents the generalized Russian and international experience in genetic diagnostics of cystic fibrosis, conditions associated with the *CFTR*. Modern classification of *CFTR* mutations and their clinical significance and approaches to the analysis of pathogenicity are described. Analysis of the diversity of the *CFTR* mutations in the Russian Federation based on the data from the National CF Patients Register for 2014 and the features of the frequencies of *CFTR* mutations in representatives of different nationalities is done. The Russian and foreign panels of the most common mutations and recommendations about the algorithm of DNA diagnostics are described. For the first time the information about prenatal and preimplantation diagnostics of the disease is presented. The unified requirements for the form of the genetic conclusion are described.

Keywords: cystic fibrosis, *CFTR*, mutations, DNA-diagnostics.