

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2025.07.100-103>

Итоги программы расширенного гентипирования пациентов с подозрением на муковисцидоз

Степанова А.А., Галеева Н.М., Щагина О.А., Рыжкова О.П., Красовский С.А., Воронкова А.Ю., Жекайте Е.К., Мельяновская Ю.Л., Кондратьева Е.И., Поляков А.В.

ФГБНУ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова
115522, г. Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1

У 632 пациентов со всей территории РФ с подозрением на МВ был проведен поиск мутаций в гене *CFTR*. Тестирование проводилось в три этапа: поиск частых мутаций, секвенирование и поиск крупных делеций/дупликаций в гене *CFTR*. Молекулярно-генетическая причина заболевания выявлена у 372 (58,8%) пробандов. У 243 из них на первом этапе тестирования. Высокая эффективность используемой системы поиска частых мутаций подтверждается также и тем фактом, что у 357 (96%) больных хотя бы один вариант был выявлен с помощью системы поиска частых мутаций. Однако при секвенировании и поиске крупных перестроек были выявлены патогенные варианты, встречающиеся с более высокой частотой, чем варианты в системе регистрации частых мутаций, что говорит о необходимости расширения данной системы. Уточнение и расширение спектра генетических вариантов, приводящих к МВ, дает возможность совершенствовать диагностическую систему, используемую для тестирования первого уровня при подозрении на МВ, тем самым сокращая время и материальные затраты на постановку молекулярно-генетического диагноза и получение персонализированной терапии.

Ключевые слова: муковисцидоз, МВ, *CFTR*, генетическое тестирование, F508del, частые мутации.

Для цитирования: Степанова А.А., Галеева Н.М., Щагина О.А., Рыжкова О.П., Красовский С.А., Воронкова А.Ю., Жекайте Е.К., Мельяновская Ю.Л., Кондратьева Е.И., Поляков А.В. Итоги программы расширенного гентипирования пациентов с подозрением на муковисцидоз. *Медицинская генетика* 2025; 24(7): 100-103.

Автор для корреспонденции: Степанова А.А.; **e-mail:** anna_stepanova@med-gen.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках научно-диагностической программы Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова при поддержке АО «Санофи Россия».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 15.07.2025

Принята: 30.07.2025

Results of the extended genotyping program for patients with suspected cystic fibrosis

Stepanova A.A., Galeeva N.M., Schagina O.A., Ryzhkova O.P., Krasovsky S.A., Voronkova A.Y., Zhekaite E.K., Melyanovskaya Y.L., Kondratyeva E.I., Polyakov A.V.

Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechie st., Moscow, 115522, Russian Federation

Mutations in the *CFTR* gene were searched for in 632 patients with suspected CF from all over the Russian Federation. Testing was carried out in three stages: search for common mutations, sequencing, and search for large deletions/duplications in the *CFTR* gene. The molecular genetic cause of the disease was identified in 372 (58.8%) probands. In 243 of them was at the first stage of testing. The high efficiency of the common mutation screening system is further supported by the fact that in 357 (96%) patients, at least one variant was detected using the common mutation screening system. However, sequencing and searching for large rearrangements revealed pathogenic variants that occur with a higher frequency than the variants in the common mutation screening system, which indicates the need to expand this system. Clarifying and expanding the spectrum of genetic variants leading to cystic fibrosis allows it possible to improve the diagnostic system used for first-level genetic testing in cases of suspected cystic fibrosis, thereby reducing the time and financial costs of establishing a molecular genetic diagnosis and obtaining personalized therapy.

Keywords: cystic fibrosis, CF, *CFTR*, genetic testing, F508del, common mutations.

For citation: Stepanova A.A., Galeeva N.M., Schagina O.A., Ryzhkova O.P., Krasovsky S.A., Voronkova A.Y., Zhekaite E.K., Melyanovskaya Y.L., Kondratyeva E.I., Polyakov A.V. Results of the extended genotyping program for patients with suspected cystic fibrosis. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2025; 24(7): 100-103. (In Russian).

Corresponding author: Stepanova A.A.; **e-mail:** anna_stepanova@med-gen.ru

Funding. The work was carried out under the scientific diagnostic program of the Research Centre for Medical Genetics with the support of JSC Sanofi Russia.

Conflict of Interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 15.07.2025

Accepted: 30.07.2025

Введение

Муковисцидоз (МВ) — аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное повреждениями гена *CFTR* и поражающее, в первую очередь, дыхательную, пищеварительную и репродуктивную системы. Симптомы заболевания могут проявляться в младенчестве, детстве или взрослом возрасте [1]. Широкое внедрение скрининга новорожденных на МВ и высокоэффективная таргетная терапия кардинально изменили прогноз течения заболевания [2].

На сегодняшний день базе данных HGMD® Professional версия 2024.3 в гене *CFTR* описано более 2300 мутаций [3]. В условиях персонализированной таргетной терапии выявление частых патогенных вариантов в гене для создания эффективных алгоритмов для наиболее быстрого выявления конкретных патогенных вариантов у больных МВ является наиважнейшей задачей.

Цели и задачи: определить диагностическую ценность расширенного генотипирования, включающего в себя скрининг частых мутаций, секвенирование кодирующей последовательности и поиск крупных делеций и дупликаций в гене *CFTR* у пациентов с подозрением на МВ. Для генетического тестирования первого уровня актуализировать диагностическую систему поиска наиболее частых мутаций в гене *CFTR* у больных МВ со всей территории РФ.

Пациенты и методы

Для анализа были получены образцы крови от 632 неродственных больных и 8 сибсов больных из различных регионов Российской Федерации с направительным диагнозом *муковисцидоз*. От пациентов или их законных представителей было получено информированное согласие на проведение исследования и публикацию результатов на условии анонимности.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью набора реактивов для выделения QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen по протоколу производителя.

Для исследования инсерционно/делеционных мутаций (с.54-5940_273+10250del21kb (CFTRdele2,3), с.1521_1523delCTT (F508del), с.2051_2052delAAinsG (2183AA>G), с.1545_1546delTA (1677delTA), с.2012delT (2143delT), с.2052dupA (2184insA), с.262_263delTT (394delTT), с.3691delT (3821delT), с.413_415dupTAC (L138ins), с.472_473insA (604insA), с.3816_3817delGT (3944delGT), с.3883delA (4015delA), с.3891dup (4022insT)) использовали методику мультиплексной амплификации.

Для регистрации точковых мутаций (с.1624G>T (G542X), с.3846G>A (W1282X), с.3909C>G (N1303K), с.1000C>T (R334W), с.3718-2477C>T (с.3717+12191C>T; 3849+10kbC>T), с.3587C>G (S1196X), с.489+1G>T (621+1G>T), с.274G>A (E92K), с.3140-26A>G (3272-26A>G), с.3844T>C (W1282R), с.2657+5G>A (2789+5G>A), с.3140-16T>A (3272-16T>A), с.1397C>G (S466X), с.1766+1G>A (1898+1G>A), с.2988+1G>A (3120+1G>A), с.1040G>C (R347P), с.2834C>T (S945L)) использовали метод мультиплексного аллель-специфичного лигирования с последующей амплификацией.

Дизайн олигонуклеотидных проб для лигирования и праймеров для амплификации осуществлен в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ, синтез — в ООО «Евроген».

Секвенирование гена *CFTR* проводилось методом массового параллельного секвенирования (МПС). Таргетная панель протяженностью 5793 п.н. включает 53 ампликона размером от 125 до 275 п.н. Расчетное покрытие кодирующих областей по данным программы Ion AmpliSeq Designer составляет 99,9%. Обработка результатов секвенирования проведена с использованием программного обеспечения «NGS-Data» (<http://www.ngs-data.ru>).

Анализ числа копий экзонов 1-27 гена *CFTR* проводили с помощью набора MRC-Holland SALSA MLPA probemix P091. Оценка результатов осуществлялась с помощью программы Coffalyser (<https://www.mlpa.com>).

Название выявленных изменений в гене *CFTR* присваивалось в соответствии с международной номенклатурой HGVS (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>), использовалась референсная последовательность кДНК, представленная на портале NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>): NM_000492.4. В названиях ранее описанных патогенных вариантов применялась также и «традиционная» номенклатура мутаций.

Клиническую значимость ранее не описанных вариантов нуклеотидной последовательности оценивали на основании российских рекомендаций для интерпретации данных, полученных методами МПС [4].

Результаты

С марта 2024 г. в МГНЦ в рамках программы расширенного генотипирования пациентов с МВ было направлено 640 пациентов (632 пробанда и 8 сибсов) со всей территории РФ для молекулярно-генетического подтверждения диагноза, а также точного генотипирования для подбора таргетных препаратов. Критериями

отбора пациентов в программу служили: подтвержденный диагноз муковисцидоз при положительной потовой пробе или пограничные значения потовой пробы при наличии клинических проявлений заболевания, или повышение ИРТ при положительной или пограничной потовой пробе.

В лаборатории ДНК-диагностики в рамках подтверждающей диагностики МВ проводились следующие анализы: поиск 30 частых мутаций в гене *CFTR*, при выявлении одного патогенного варианта в гене или отсутствии частых мутаций пациенту проводили исследование кодирующей последовательности гена *CFTR*. На третьем этапе пациентам с отсутствием подтвержденного молекулярно-генетического диагноза проводили количественный анализ гена *CFTR* для поиска протяженных делеций и дупликаций.

Молекулярно-генетическими методами диагноз МВ был подтвержден 372 (58,8%) пациентам, из них 243 пациентам – в результате поиска 30 частых мутаций, 106 – в результате секвенирования кодирующей последовательности гена *CFTR* и 23 – в результате поиска крупных делеций и дупликаций в гене *CFTR*.

У пациентов был выявлен 101 патогенный и вероятно патогенный вариант в гене *CFTR*, включая 3 варианта, приводящие к изменению длины белка без сдвига рамки считывания, 22 миссенс-замены, 21 нонсенс-замену, 19 вариантов, приводящих к сдвигу рамки считывания, 8 крупных перестроек, 20 мутаций сайта сплайсинга, 1 вариант, вызывающий повреждение иницирующего кодона, и 1 патогенный вариант, представляющий собой комплексный аллель. 51 патогенный вариант встретился более, чем на одной хромосоме.

Обсуждение

Из 372 пациентов с подтвержденным генетическим диагнозом у 357 один или оба патогенных варианта были выявлены в ходе первого этапа программы. То есть, у 96% больных МВ с подтвержденным молекулярно-генетическим диагнозом патогенные варианты хотя бы на одной хромосоме были выявлены с помощью системы регистрации 30 частых мутаций в гене *CFTR*. Таким образом, система регистрации 30 частых мутаций в гене *CFTR* высокоэффективна как тест первого уровня при подозрении на МВ у пациента.

Из 30 мутаций, входящих в систему частых мутаций, у больных встретились только 27. А патогенные варианты с.1243_1247del (1367del5), с.743+415_1392+2987dup26817bp (dup 7-11), с.3196C>T

(R1066C), g.[?_117144351-117144374_?del] (del ex2), с.1301C>G (S434X), с.1397C>G (S466X), с.3454G>C (D1152H), с.2435T>G (L812X) встретились более чем на четырех хромосомах (доля от поврежденных хромосом составила более 0,54%). То есть целесообразно добавить эти варианты в систему частых мутаций, чтобы можно было их выявлять на первом этапе тестирования, уменьшая стоимость и время диагностики.

Как и в большинстве популяций мира [5,6], а также в ранее проводимых исследованиях в российской популяции [7,8], наиболее частым патогенным вариантом в российской популяции является вариант в экзоне 11 гена *CFTR* с.1521_1523delCTT, р.(Phe508del). Мутация встретилась на 345 хромосомах, что составило 46,4% от всех поврежденных хромосом. За счет варианта р.(Phe508del) доля поврежденных хромосом с мутацией, приводящей к изменению длины белка составляет 47,7%. Вторым по частоте типом патогенных вариантов являются варианты, приводящие к укорочению, и, в основном, нефункциональному белку (нонсенс-замены, делеции/инсерции со сдвигом рамки считывания, крупные делеции/инсерции), совокупная доля которых составила 32,2%. Таким образом, у большей части российских больных МВ повреждения в гене *CFTR* относятся к мутациям I и II классов, обуславливая тяжелые фенотипические проявления классического МВ.

В условиях высокой этнической гетерогенности населения РФ определение спектра мутаций для генетического тестирования первого уровня является актуальной задачей. Уменьшая время и материальные затраты на подтверждение молекулярно-генетического диагноза, мы сокращаем путь пациента к получению высокоэффективной персонализированной терапии.

Литература

1. De Boeck K., Wilschanski M., Castellani C., et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*. 2006;61(7):627-635. doi:10.1136/thx.2005.043539.
2. Thakur S., Ankita., Dash S., et al. Understanding CFTR Functionality: A Comprehensive Review of Tests and Modulator Therapy in Cystic Fibrosis. *Cell Biochem Biophys*. 2024;82(1):15-34. doi:10.1007/s12013-023-01200-w
3. <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/all.php>
4. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А. с соавт. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). *Медицинская генетика* 2019; 18(2): 3-23, DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.3-23.
5. Matsui H., Grubb B.R., Tarran R., et al. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogen-

- esis of cystic fibrosis airways disease. *Cell*. 1998;95(7):1005-1015. doi:10.1016/s0092-8674(00)81724-9
6. Jalalirad M., Houshmand M., Mirfakhraie R., Goharbari M.H., Mirzajani F. First study of CF mutations in the CFTR gene of Iranian patients: detection of DeltaF508, G542X, W1282X, A120T, R117H, and R347H mutations. *J Trop Pediatr*. 2004;50(6):359-361. doi:10.1093/tropej/50.6.359
 7. Степанова А.А., Красовский С.А., Поляков А.В. Информативность поиска 19 частых мутаций в гене CFTR у российских больных муковисцидозом и расчетная частота заболевания в Российской Федерации. *Генетика*. 2016;52(2):231. DOI: 10.7868/S0016675816010136
 8. Petrova N.V., Kashirskaya N.Y., Vasilyeva T.A., et al. Analysis of CF-TR Mutation Spectrum in Ethnic Russian Cystic Fibrosis Patients. *Genes (Basel)*. 2020;11(5):554. doi:10.3390/genes11050554
 3. <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/all.php>
 4. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prohorchuk E.B., et al. Rukovodstvo po interpretatsii dannykh posledovatel'nosti DNK cheloveka, poluchennykh metodami massovogo parallel'nogo sekvenirovaniya (MPS) (redaktsiya 2018, versiya 2) [Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2)]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2019;18(2):3-23. (In Russ.)
 5. Matsui H., Grubb B.R., Tarran R., et al. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell*. 1998;95(7):1005-1015. doi:10.1016/s0092-8674(00)81724-9
 6. Jalalirad M., Houshmand M., Mirfakhraie R., Goharbari M.H., Mirzajani F. First study of CF mutations in the CFTR gene of Iranian patients: detection of DeltaF508, G542X, W1282X, A120T, R117H, and R347H mutations. *J Trop Pediatr*. 2004;50(6):359-361. doi:10.1093/tropej/50.6.359
 7. Stepanova A.A., Krasovsky S.A., Polyakov, A.V. Reliability of the search for 19 common mutations in the CFTR gene in Russian cystic fibrosis patients and the calculated frequency of the disease in Russian Federation. *Russ J Genet*. 2016; 52(2): 204–213. <https://doi.org/10.1134/S1022795416010130>
 8. Petrova N.V., Kashirskaya N.Y., Vasilyeva T.A., et al. Analysis of CF-TR Mutation Spectrum in Ethnic Russian Cystic Fibrosis Patients. *Genes (Basel)*. 2020;11(5):554. doi:10.3390/genes11050554

References

1. De Boeck K., Wilschanski M., Castellani C., et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*. 2006;61(7):627-635. doi:10.1136/thx.2005.043539.
2. Thakur S., Ankita., Dash S., et al. Understanding CFTR Functionality: A Comprehensive Review of Tests and Modulator Therapy in Cystic Fibrosis. *Cell Biochem Biophys*. 2024;82(1):15-34. doi:10.1007/s12013-023-01200-w