

А.А. Баранов¹, Н.И. Капранов², Н.Ю. Каширская², Л.С. Намазова-Баранова¹, В.Д. Шерман²,
О.И. Симонова¹, А.Ю. Томилова¹, К.В. Савостьянов¹, А.А. Пушков¹, А.Л. Владыкин³, Н.В. Шатохин³

¹ Научный центр здоровья детей, Москва, Российская Федерация

² Медико-генетический-научный центр РАН, Москва, Российская Федерация

³ ООО «Эбботт Лэбораториз», Москва, Российская Федерация

Проблемы диагностики муковисцидоза и пути их решения в России

Контактная информация:

Баранов Александр Александрович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор ФГБНУ «Научный центр здоровья детей»

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 134-30-83, e-mail: baranov@nczd.ru

Статья поступила: 12.10.2014 г., принята к печати: 24.11.2014 г.

Муковисцидоз — моногенное, аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями гена CFTR, характеризующееся выраженной генетической гетерогенностью и клиническим полиморфизмом, что подчеркивает необходимость комплексной диагностики с молекулярно-генетической верификацией окончательного диагноза. При муковисцидозе качество и продолжительность жизни пациента зависят от ранней диагностики и своевременной адекватной терапии. В статье освещены методы и протоколы диагностики муковисцидоза, возможности молекулярно-генетической диагностики патологии на современном этапе; проведен обзор диагностических наборов для ДНК-диагностики. В связи с отсутствием в панели зарегистрированных в Российской Федерации наборов некоторых характерных для российской популяции генов 20% пациентов остаются без уточнения имеющейся мутации. Для решения указанной проблемы необходимы разработка специфичных для РФ наборов для ДНК-диагностики, обеспечение генетической диагностики болезни, включая методы секвенирования, за счет федеральных средств, а также расширение объема информации и качества преподавания данного раздела студентам медицинских университетов, на курсах повышения последипломного образования соответствующих специалистов.

Ключевые слова: муковисцидоз, диагностика, молекулярно-генетический анализ, секвенирование, наборы для ДНК-диагностики, мутации, CFTR, дети.

(Педиатрическая фармакология. 2014; 11 (6): 16–23)

ВВЕДЕНИЕ

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз — наиболее часто встречающееся наследственное заболевание (1:2500–3000 новорожденных), резко сокращающее продолжительность и качество жизни пациентов без адекватного лечения [1, 2]. МВ распространен среди представителей всех расовых групп, но наиболее часто встречается у европеоидов. МВ — моногенное, аутосом-

но-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями гена CFTR, кодирующего муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Болезнь характеризуется выраженной генетической гетерогенностью и клиническим полиморфизмом с поражением экзокринных желез респираторного тракта, системы пищеварения (в первую очередь поджелудочной желе-

А.А. Baranov¹, N.I. Kapranov², N.Y. Kashirskaya², L.S. Namazova-Baranova¹, V.D. Sherman², O.I. Simonova¹,
A.Y. Tomilova¹, K.V. Savostyanov¹, A.A. Pushkov¹, A.L. Vladykin³, N.V. Shatokhin³

¹ Scientific Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

² Research Center of Medical Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

³ Abbott Laboratories, Moscow, Russian Federation

Diagnostic Problems of Mucoviscidosis and Ways of Solution in Russia

Mucoviscidosis is a monogenic autosomal recessive caused by the CFTR gene mutations and characterized by pronounced genetic heterogeneity and clinical polymorphism, which emphasizes the need in comprehensive diagnosis and molecular-genetic verification of the final diagnosis. Quality and duration of a mucoviscidosis patient depend on early diagnosis and timely adequate therapy. The article presents mucoviscidosis diagnostic methods and protocols and capabilities of the modern molecular-genetic pathological diagnosis; a review of DNA diagnostic sets has been performed. As sets of some of the genes typical to the Russian population have not been registered in the Russian Federation, mutations in 20% of the patients cannot be specified. In order to solve this problem it is necessary to develop DNA diagnostic sets specific for the Russian Federation, ensure genetic diagnosis of the disease, including sequencing methods at the expense of the federal budget, increase the amount of information and improve quality of teaching this discipline to students of medial universities and at postgraduate courses for appropriate specialists.

Key words: mucoviscidosis, diagnosis, molecular-genetic analysis, sequencing, DNA diagnostic sets, mutations, CFTR, children.

(Pediatricheskaya farmakologiya — Pediatric pharmacology. 2014; 11 (6): 16–23)

зы и печени), уrogenитального тракта и специфическим изменением потовых желез [3–6]. Базисная фармакотерапия МВ является комплексной и включает препараты, необходимые для эффективного контроля респираторных инфекций и дыхательной функции, а также для обеспечения адекватного нутритивного статуса, в частности минимикросферические ферменты поджелудочной железы для заместительной терапии во время каждого приема пищи в течение всей жизни пациента [4, 7].

Приоритетность проблемы МВ в Российской Федерации (РФ), к которой руководство страны относится со всей серьезностью, подтверждается тем, что с 2006 г. данное заболевание включено в Национальную программу по неонатальному скринингу (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 22.03.2006 № 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания»), а с 2007 г. утверждено постановление Правительства Российской Федерации от 17 октября № 682 «О централизованной закупке лекарственных средств, предназначенных для лечения больных гемофилией, муковисцидозом, гипофизарным нанизмом, болезнью Гоше, миелодисплазией, рассеянным склерозом, а также после трансплантации органов и (или) тканей».

ДЕМОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУКОВИСЦИДОЗА

Совершенствование лечебно-реабилитационных режимов, ранняя диагностика, введение во многих странах скрининга новорожденных способствовали тому, что за последние тридцать-сорок лет МВ из фатальной патологии детского возраста трансформировался в хроническую болезнь взрослых [8]. По данным исследователей из США, медиана продолжительности жизни возросла с 8 мес в 1957 г. до 16 лет в 1970 и 37,4 лет — в 2008 [9]; в Канаде — с 24 лет в 1982 г. до 48,1 лет в 2010 [10]. Предполагалось, что ожидаемая средняя продолжительность жизни пациентов с МВ, рожденных в 1990-х, должна превысить 40 лет, а в 2007–2008 гг. — приблизиться к 50 годам [11]. По данным Hodson (2007) и Wolfenden (2009) существует 50% вероятность того, что пациенты, достигшие возраста 40 лет, доживут до 53 лет, и 35% вероятность достижения ими 60 лет [1, 12].

В РФ средняя продолжительность жизни пациентов с МВ составляла в 1997 г. около 16 лет, в 2001 — 24 года, а в 2007 — 27 лет [13–16]. По данным Российского регистра больных МВ, средний возраст 1526 наблюдаемых в 2009 г. пациентов составил 10,2 года (min 0,09 лет, max 51,99 лет), при этом только 18,73% пациентов были старше 18 лет [17]. В то же время средний возраст пациентов, наблюдаемых в экономически развитых странах Европы, составляет 18–21 год [3, 18].

Следует отметить, что статистические показатели значительно разнятся в различных регионах России. Наиболее благоприятная ситуация в Москве и Московской области. Так, по данным Регистра Москвы и Московской области, в котором по состоянию на 31 декабря 2012 г. состояло на учете 400 пациентов (208 мужчин и 192 женщины) с подтвержденным диагнозом МВ, установленным на основании клинической картины и данных положительной потовой пробы и/или генетического исследования, средний возраст пациентов составил $13,3 \pm 10,1$ лет. Доля взрослых (лица

старше 18 лет) — 32%. Медиана возраста установления диагноза составила 1 год. У 13,3% взрослых пациентов диагноз установлен после достижения ими 18 лет. Средний уровень хлоридов пота при проведении потового теста на момент установления диагноза достигал $87,8 \pm 28,3$ ммоль/л. Медиана выживаемости за период 2003–2012 гг. составила 39,5 лет [17]. По данным И.К. Ашеровой, в 2011 г. в Ярославле и Ярославской области медиана возраста наблюдаемых больных составила 12,9 лет, доля взрослых пациентов старше 18 лет — 22,7%, медиана возраста постановки диагноза — 3,2 года, что превысило общероссийские показатели 2009 г. Медиана выживаемости составила 26,8 лет [19]. В Санкт-Петербурге медиана выживаемости больных с МВ на 2012 г. составила 30 лет [20].

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУКОВИСЦИДОЗА

Частота МВ в различных географических зонах значительно варьирует в зависимости от этнической принадлежности — от 1:600 (Бретань, Франция) до 1:400 000 (страны Юго-Восточной Азии) [1, 18]. По данным Всемирной организации здравоохранения, в среднем в мире МВ встречается с частотой 1:2500–3000 новорожденных [9, 21].

Значительный вклад в улучшение ранней диагностики и, как следствие, начала лечения, а также улучшения прогноза для пациентов с МВ принадлежит внедрению в РФ государственной программы неонатального скрининга, к выполнению которой приступили с 2006 г. в ряде регионов, а с 1 января 2007 г. — во всех субъектах РФ. По данным Министерства здравоохранения РФ, с 1 января 2007 г. по 31 декабря 2012 г. ориентировочная частота МВ в России составляет 1:10 000 новорожденных. Следует отметить, что не всем детям с повторными высокими значениями иммунореактивного трипсина (ИРТ) проводят потовые пробы, так как в ряде случаев родители отказываются от данного исследования (до 25% по разным регионам) [22]. По данным Всероссийского центра изучения общественного мнения (ВЦИОМ) от 2012 г., основными причинами отказа родителей пациентов от проведения диагностики врачами-педиатрами стационарной и поликлинической практики были названы «отрицание» диагноза (35%), нежелание проходить диагностические процедуры (30%), отсутствие финансовых возможностей (29%), так как даже потовый тест в 10% случаев оплачивается родителями пациента [www.wciom.ru].

Таким образом, можно предположить, что истинная частота МВ в России выше указанного значения.

НОЗОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ МУКОВИСЦИДОЗА

Согласно Международной классификации болезней 10-го пересмотра, МВ отнесен к разделу «Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ», класс IV [23]. Классификация МВ содержит четыре рубрики:

- E84.0 МВ с легочными проявлениями;
- E84.1 МВ с кишечными проявлениями;
- E84.8 МВ с другими проявлениями;
- E84.9 МВ неспецифичный (атипичный).

В настоящее время предполагается существенное изменение и дополнение нозологической классификации МВ в связи с обнаружением вовлеченности гена

CFTR в ряд других состояний и заболеваний. Группу заболеваний, при которых наблюдается ряд симптомов, но не все одновременно, характерных для классического МВ, на совместном совещании Всемирной организации здравоохранения, Международной Ассоциации по кистозному фиброзу (муковисцидозу) и Европейского тематического объединения по муковисцидозу в 2000 г. выделили в особую группу, связанную с полиморфизмом гена *CFTR*, носящим этиологический характер [23]. *CFTR*-зависимое заболевание (*CFTR*-related disease) — это клиническое состояние, связанное с дисфункцией белка *CFTR*, но не удовлетворяющее диагностическим критериям МВ [24]. К таким заболеваниям отнесены врожденное двустороннее отсутствие семявыносящих протоков, обструктивная азооспермия, диссеминированные бронхоэктазы, диффузный бронхит, эмфизема легких, аллергический бронхолегочный аспергиллез, хронический панкреатит, диффузный панbronхиолит, склерозирующий холангит, неонатальная гипертрипсиногемия с наличием хотя бы одной мутации в гене *CFTR* [23, 24].

В зависимости от механизма, нарушающего функцию белка, мутации гена *CFTR* подразделяют на пять классов [25]. Некоторые исследователи выделяют еще один — шестой класс [26].

- Класс I (нарушение синтеза белка *CFTR*) — мутации, результатом которых является нарушение транскрипции мРНК. К этому классу относятся мутации с наиболее серьезными фенотипическими проявлениями, поскольку синтез функционально активного белка *CFTR* полностью нарушен.
- Класс II — нарушение созревания белка *CFTR*. Мутации приводят к неправильному сворачиванию молекулы белка и нарушению ее транспорта к апикальной мембране клетки. В результате происходит деградация *CFTR*-молекул в эндоплазматическом ретикулуме: молекула белка не достигает эпителиальной мембраны.
- 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, что приводит к нарушению регуляции хлорного канала.
- Класс IV — нарушение проводимости хлорного канала. К этому классу в большей мере относятся миссенс-мутации, расположенные в мембраносвязанных доменах. Ген *CFTR*, содержащий эти мутации, кодирует протеин, который нормально транспортируется к клеточной мембране и правильно отвечает на стимуляцию, но генерирует пониженный хлорный поток. Мутации класса IV изменяют ионную проводимость хлорного канала и таким образом уменьшают время открытия каналов и ионный поток.
- Класс V — снижение количества функционального белка *CFTR*. 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 включает мутации, приводящие к синтезу белка *CFTR* с измененной стабильностью в результате потери С-концевых 70–98 аминокислотных остатков.

Известно, что на основании генофенотипических корреляций, а именно в соответствии со степенью нарушения экзокринной функции поджелудочной железы у больных МВ, все мутации делятся на 2 группы: тяжелые и мягкие [26, 27]. К тяжелым относят мутации I, II, III классов, при которых белок *CFTR* практически полностью отсутствует на апикальной мембране эпителиальных клеток, либо его функция существенно нарушена, что приводит к значительному нарушению экзокринной функции поджелудочной железы. Мутации IV, V классов относятся к мягким, при которых сохраняется остаточная функция хлорного канала, и наблюдается достаточная степень сохранности экзокринной функции поджелудочной железы [3, 24, 26–28].

Иногда у пациентов с *CFTR*-зависимыми заболеваниями выявляют одну тяжелую мутацию в одном аллеле гена *CFTR*, тогда как во втором аллеле гена обнаруживается мягкая мутация. Однако, в большинстве случаев в обоих аллелях гена обнаруживается мягкая мутация [29–32]. Спектр мутаций, наблюдаемый у пациентов с *CFTR*-зависимыми заболеваниями, соответствует спектру мутаций гена *CFTR* у больных МВ в популяции. Однако, распределение мутаций гена *CFTR* у пациентов с *CFTR*-зависимыми заболеваниями отличается от распределения мутаций при классическом МВ: мягкие мутации обнаруживаются с более высокой частотой, чем у пациентов с классическим МВ [33].

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ МУКОВИСЦИДОЗА

До открытия гена *CFTR* в 1989 г. диагностика МВ базировалась на выявлении у пациента хронического бронхолегочного инфекционно-воспалительного процесса, кишечного синдрома, обусловленного в первую очередь проявлениями экзокринной недостаточности поджелудочной железы, положительного потового теста и наличия МВ у родных братьев и сестер. При этом достаточным было сочетание двух из этих четырех признаков для постановки диагноза МВ [3].

Открытие гена *CFTR* и разработка лабораторных технологий для детекции мутаций позволили усовершенствовать диагностику МВ. Новые принципы диагностики МВ были суммированы в международных консенсусных документах [1, 34]. Критерии диагностики МВ включали два диагностических блока:

- 1) характерные клинические симптомы, или случай МВ в семье, или положительный результат неонатального скрининга по иммунореактивному трипсину;
- 2) повышенная концентрация хлоридов пота (> 60 ммоль/л), или две идентифицированные мутации гена *CFTR*, или положительный тест при определении разности назальных потенциалов (в пределах от -40 до -90 мВ).

Диагноз считался подтвержденным, если присутствовало хотя бы по одному критерию из каждого блока [3].

В 2006 г. De Voeck с соавт. [35] систематизировали клинические симптомы, которые требуют обязательного обследования пациентов для исключения МВ (табл. 1). При наличии у пациента высокоспецифичных клинических симптомов МВ необходимо проведение потовой пробы и молекулярно-генетической диагностики для исключения заболевания. При обнаружении менее специфичных симптомов, которые помимо МВ могут встречаться, например, при первичной цилиарной дискинезии

Таблица 1. Клинические симптомы, указывающие на наличие у пациента муковисцидоза [35]

Клинические симптомы, высокоспецифичные для МВ	Клинические симптомы, менее специфичные для МВ
Проявления со стороны желудочно-кишечного тракта	
<ul style="list-style-type: none"> • Мекониальный илеус • Экзокринная недостаточность поджелудочной железы у детей 	<ul style="list-style-type: none"> • Дефицит массы тела • Гипопротеинемия • Дефицит жирорастворимых витаминов • Синдром дистальной интестинальной обструкции • Ректальный пролапс • Билиарный цирроз • Портальная гипертензия • Желчнокаменная болезнь без гемолитических расстройств у детей • Первичный склерозирующий холангит • Экзокринная недостаточность поджелудочной железы у взрослых • Повторные панкреатиты
Проявления со стороны дыхательных путей	
<ul style="list-style-type: none"> • Стойкая (хроническая) респираторная инфекция с мукоидной формой <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Бронхоэктазы в верхних долях легкого • Персистирующая респираторная инфекция, вызванная <i>Burkholderia cepacia</i> • Назальные полипы у детей 	<ul style="list-style-type: none"> • Хроническая или повторная респираторная инфекция <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Achromobacter xylosoxidans</i> или <i>Haemophilus influenzae</i> • Наличие бронхоэктазов, и/или ателектазов, и/или инфильтратов, и/или очагов гиперинфляции в легких при рентгенографии грудной клетки • Кровохарканье, связанное с диффузным поражением легких, отличным от туберкулеза или васкулита • Хронический и/или продуктивный кашель • Аллергический бронхолегочный аспергиллез • Назальные полипы у взрослых • Радиологические признаки хронического пансинусита
Другое	
<ul style="list-style-type: none"> • Гипохлоремический алкалоз при отсутствии рвоты • Врожденное двустороннее отсутствие семявыносящих протоков 	<ul style="list-style-type: none"> • Симптом «барабанные палочки» • Остеопения/остеопороз до 40 лет • Атипичный сахарный диабет (не соответствующий диагностическим критериям сахарного диабета I или II типа)

Таблица 2. Диагностические критерии муковисцидоза ECFS (2013)

Положительная потовая проба (концентрация хлоридов пота выше 59 ммоль/л*
и/или
Две клинически значимые мутации гена <i>CFTR</i> согласно реестру <i>CFTR-2</i> (http://www.cftr2.org)
и
Неонатальная гипертрипсиногенемия
или
Характерные клинические проявления, такие как диффузные бронхоэктазы, высев из мокроты значимой для МВ патогенной микрофлоры (особенно <i>Pseudomonas aeruginosa</i>), экзокринная недостаточность поджелудочной железы, синдром потери солей, обструктивная азооспермия

Примечание. * — значения концентрации хлоридов пота указаны для прямого количественного метода по Гибсону–Куку. В РФ широко используются аппаратные методы с непрямым определением хлоридов пота, для которых проба является положительной при эквивалентных значениях концентрации хлоридов выше 80 ммоль/л [3, 43].

или гуморальном иммунодефиците, может потребоваться проведение других специфических тестов: радиологическое обследование органов грудной клетки, исследование легочных функций, бактериологический посев мокроты, определение фекального химотрипсина или эластазы 1, спермограмма у мужчин [35–39].

Учитывая научные достижения в понимании природы МВ и *CFTR*-зависимых заболеваний последнего десятилетия [35, 40, 41], в 2013 г. группа экспертов Европейского общества муковисцидоза (European Cystic Fibrosis Society, ECFS) под руководством Carlo Castellani подготовила проект новых стандартов диагностики

в редакции Alan R. Smyth и Scott Bell (<http://www.ecfs.eu/ecfs-standards-care/introduction>) (табл. 2).

ТРУДНОСТИ ДИАГНОСТИКИ МУКОВИСЦИДОЗА

МВ относится к группе наследственных заболеваний, когда диагностика на самых ранних этапах развития патологии не только необходима, но и возможна благодаря целому ряду современных подходов, одним из которых является неонатальный скрининг [42, 43]. В то же время нельзя не отметить, что диагноз МВ должен быть не только своевременным, но и точным. Следует свести к минимуму случаи как гипо- так и гипердиагностики.

Психологическое бремя, которое несет в себе диагноз для пациента и его семьи, порождает высокую ответственность перед гипердиагностикой МВ.

Диагностика классической формы МВ обычно не представляет собой сложностей. Классический фенотип больного является результатом наличия двух мутантных копий гена *CFTR* и характеризуется хронической бактериальной инфекцией дыхательных путей и придаточных пазух носа, стеатореей вследствие экзокринной недостаточности поджелудочной железы, мужским бесплодием, связанным с обструктивной азооспермией, а также повышенной концентрацией хлоридов потовой жидкости [1, 3]. Проблемы диагностики МВ, как правило, связаны с фенотипическим разнообразием его форм, обусловленным генетическим полиморфизмом заболевания наряду с влиянием генов-модификаторов, факторов внешней среды (принимаемых лекарственных препаратов, поллютантов, курения и др.) [44]. Пациенты с неспецифичным (атипичным) течением МВ имеют как минимум одну копию мутантного гена *CFTR*, при этом функция экспрессируемого белка *CFTR* остается частично сохранной, что может приводить к отсутствию у них явных признаков нарушения функции поджелудочной железы, а также к более низким показателям концентрации хлоридов пота вплоть до отрицательных результатов потового теста [33].

ГРУППЫ РИСКА ПО МУКОВИСЦИДОЗУ В РФ

Как уже было сказано выше, в Российской Федерации МВ включен в Национальную программу неонатального скрининга, поэтому *первой и основной группой риска* по заболеванию в настоящее время являются новорожденные с неонатальной гипертрипсиногенемией.

Протокол неонатального скрининга на МВ в РФ включает 4 этапа: определение иммунореактивного трипсина (ИРТ1), повторное определение иммунореактивного трипсина (ИРТ), потовый тест и ДНК-диагностику, при этом только первые три этапа являются обязательными в национальном протоколе и обеспечиваются государством. Поэтому ДНК-диагностика во многих случаях проводится ограниченно. Доступность ДНК-диагностики лимитирована высокой стоимостью и небольшим количеством лабораторий, способных провести этот анализ [22, 43, 45].

На примере популяции Москвы нами показано, что метод двукратного определения ИРТ в крови новорожденных соответствует критериям достоверности, но уступает протоколу ИРТ/ДНК [обследование проводилось с помощью набора, содержащего 11 наиболее часто встречаемых мутаций *CFTR*: *dele2,3* (21kb), *F508del*, *Idel507*, *1677delTA*, *2184insA*, *2143delT*, *2183AA>G*, *2184delA*, *394delTT*, *3821delT*, *L138ins*, составляющих 69,5% всех выявленных в РФ] по чувствительности (96,77 против 100%), большей вероятности ложноположительных (0,00178 против 0,000344) и ложноотрицательных показателей (0,03 против 0) [46].

Несмотря на то, что неонатальный скрининг по схеме ИРТ/ДНК даже при обследовании всего на 11 мутаций является более чувствительным, с экономической точки зрения остается оправданным до настоящего времени использование в России ИРТ1/ИРТ2-протокола [46].

Вторая группа риска состоит из пациентов с хроническими заболеваниями, имеющими схожие с МВ клини-

ческие проявления [3]. Последнее связано с тем обстоятельством, что в РФ неонатальный скрининг проводится только с 2006/2007 г., поэтому с определенной долей уверенности можно утверждать, что все еще остается достаточно большое количество больных МВ, длительно наблюдающихся у разных специалистов с другими диагнозами. К сожалению, группа риска продолжает свое пополнение за счет имеющих место ложноотрицательных результатов неонатального скрининга, а также за счет неявки отдельных пациентов с повторной гипертрипсиногенемией для проведения потового теста [22].

Выявление МВ именно в этой группе представляет собой основную проблему в РФ. Отсутствие должной настороженности по выявлению МВ, особенно его атипичных форм, у педиатров, терапевтов и врачей узких специализаций (гастроэнтерологов, пульмонологов, оториноларингологов, андрологов и т.д.) приводит к сохранению высокой доли недиагностированных, а значит, нелеченых пациентов во всех возрастных группах.

К примеру, только за последние 2 месяца 2013 г. на базе ФГБНУ «Научный центр здоровья детей» муковисцидоз был заподозрен у 5-дневного ребенка, находившегося в отделении недоношенных детей в связи с мекониальным илеусом; у 14-летнего подростка, находившегося в отделении неотложной педиатрии в связи с частыми инфекциями ЛОР-органов (аденоидами 3-й степени); у 5-летнего ребенка, проходившего обследование в отделении гастроэнтерологии в связи с задержкой физического развития, мальабсорбцией. При этом все подозрения были подтверждены положительными результатами молекулярно-генетических методов исследования гена *CFTR*.

Третью группу риска составляют лица, являющиеся родственниками больных МВ: особенно это касается сибсов больных МВ, которым обязательно необходимо проводить потовую пробу независимо от наличия или отсутствия у них клинических симптомов заболевания.

ВОЗМОЖНОСТИ ДНК-ДИАГНОСТИКИ МУКОВИСЦИДОЗА В РФ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Согласно данным, полученным в лаборатории генетической эпидемиологии ФГБУ «Медико-генетический научный центр» (МГНЦ), при обследовании более 1200 пациентов с подтвержденным клиническим диагнозом МВ из различных, в основном европейских, регионов РФ (> 80%) чаще других (с относительной долей более 0,5%) обнаруживались следующие 15 мутаций: *F508del* — 52,3%, *CFTRdele2,3* (21kb) — 7,7%, *3849+10kbC>T* — 3,1%, *W1282X* — 2,8%, *N1303K* — 2,1%, *2184insA* — 2,1%, *2143delT* — 2,0%, *1677delTA* — 1,7%, *G542X* — 1,7%, *E92K* — 1,3%, *L138ins* — 1,1%, *R334W* — 0,9%, *3821delT* — 0,8%, *394delTT* — 0,6%, *S1196X* — 0,5% [33, 47].

На первом этапе проведения ДНК-обследования на МВ в ФГБУ «МГНЦ» используется панель, включающая 28 мутаций, как наиболее частых в мире, так и считающихся специфичными для России: *F508del*, *CFTRdele2,3* (21kb), *3849+10kbC>T*, *W1282X*, *2143delT*, *2184insA*, *1677delTA*, *N1303K*, *G542X*, *R334W*, *E92K*, *L138ins*, *394delTT*, *3821delT*, *S1196X*, *2789+5G>A*, *G85E*, *2183AA>G*, *604insA*, *621+1G>T*, *R117H*, *R347P*, *R553X*, *3667insTCAA*, *G551D*, *I507del*, *1717-1G>A*, *2184delA*. Эти

мутации обуславливают до 82,5% мутантных аллелей в общей выборке обследованных больных МВ.

При отсутствии вышеуказанных 28 мутаций у больного МВ на втором этапе проводится расширенный поиск более редких мутаций, при этом используются обычно сканирующие методы, позволяющие выявить отклонения в нуклеотидной последовательности исследуемых фрагментов ДНК. Часто используют следующие методы:

- DGGE — денатурирующий градиентный гель-электрофорез;
- DHPLC — денатурирующая жидкостная хроматография высокого разрешения;
- HRMCA — анализ кривой плавления высокого разрешения;
- SSCP — полиморфизм конформации одноцепочечных фрагментов ДНК.

Каждый из методов имеет свои разрешающие возможности. После выявления аномального фрагмента ДНК сканирующими методами необходима верификация природы изменения с использованием метода секвенирования.

Так, при анализе методом секвенирования ДНК 65 пациентов (78 неидентифицированных аллелей гена *CFTR*) были выявлены 42 различные мутации, представляющие миссенс-мутации или небольшие делеции/инсерции (от 1 до 11 нуклеотидов).

Проведение расширенного исследования гена *CFTR* позволило выявить мутации в 98% случаев. Наличие небольшого количества пациентов, у которых одна или две мутации не были идентифицированы, может быть связано с тем, что при скрининге мутаций в большей мере исследуются только кодирующие участки и участки гена, непосредственно прилегающие к кодирующим. Внутренние области интронов и отдаленные области 5'- и 3'-регуляторных регионов не попадают в исследование. Кроме того, нельзя исключить и возможные мутации в регуляторных регионах, располагающихся вне гена *CFTR*, а также и фенокопии МВ (то есть сходные симптомы, обусловленные нарушениями в других генах). В таких случаях проведение сегрегационного анализа сцепленных ДНК-маркеров поможет определить статус носительства членов семьи.

Как видно на примере работы ФГБУ «МГНЦ», при использовании специально разработанной панели, включающей 28 мутаций, удается обнаружить лишь около 82,5% мутантных аллелей в общей выборке обследованных больных МВ. Почти 20% пациентов с МВ необходимо проводить дополнительное обследование по поиску более редких мутаций или полиморфизмов, в том числе с применением метода секвенирования, который пока рутинно в РФ не используется.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ДНК-НАБОРЫ, ЗАРЕГИСТРИРОВАННЫЕ В РФ, ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУКОВИСЦИДОЗА

Следует отметить, что диагностические панели, включающие специфичные для российской популяции мутации гена *CFTR* и используемые для ДНК-диагностики в различных научных медицинских учреждениях страны, не имеют коммерческой регистрации.

Из доступных и зарегистрированных в РФ коммерческих наборов, включающих определение более 30 мутаций, можно отметить набор компании «Эбботт»

по выявлению 32 наиболее часто встречаемых в мире мутаций и 4 полиморфизмов гена *CFTR* [48]. К сожалению, в него не входят многие мутации, специфичные для российской популяции: например, *CFTR*dels2,3, занимающая второе место по частоте в РФ, а также *E92K*, *1677delTA*, *2143delT*, *2184insA*, *L138ins*, *394delTT*, *604insA*, *3821delT*, *3944delTG*, *S1196X*, встречающиеся с частотой выше 0,1%.

В 2012 г. зарегистрирован отечественный набор «Муковисцидоз-БиоЧип» производства ГК «Алкор Био», позволяющий одновременно анализировать 25 мутаций гена *CFTR*. Однако, и в этот набор не вошли некоторые часто встречаемые в российской популяции мутации, что, несомненно, требует доработки теста [49].

Таким образом, имеющиеся в настоящее время на рынке РФ коммерческие наборы не могут обеспечить необходимый объем ДНК-обследования.

Учитывая, что генетическая диагностика МВ пока недоступна на всей территории РФ и, может быть, главное, не финансируется государством, специалисты вынуждены использовать ее крайне ограниченно и только после проведения потовой пробы. Это относится и к диагностике МВ в рамках неонатального скрининга, и в более поздние сроки установления диагноза, запоздренного по клиническим симптомам.

De Воек и соавт. предложили алгоритм комплексной диагностики МВ [35]. В случае обнаружения у пациента характерных клинических проявлений МВ или при наличии высоких значений повторного ИРТ при неонатальном скрининге должна быть проведена потовая проба. При положительном результате потовой пробы диагноз МВ подтверждается. Последующее ДНК-обследование не является обязательным, но обычно проводится, с одной стороны, для исследовательских целей, а с другой — для окончательного подтверждения диагноза и возможного планирования будущих беременностей в данной семье. В случае когда при положительной потовой пробе не будет найдено ни одной мутации, может потребоваться секвенирование гена *MB*. Во всех случаях, когда МВ маловероятен, должны быть исключены другие заболевания с аналогичной клинической картиной, такие как первичная цилиарная дискинезия, синдром Швахмана, гуморальный иммунодефицит [35]. При обнаружении единственной мутации в гене *CFTR*, наличии клинических проявлений или отсутствии альтернативного диагноза показано расширенное генетическое исследование. В связи с высокой стоимостью углубленного генетического обследования в мире используется сначала дополнительный диагностический метод определения разности назальных потенциалов или разности потенциалов в биоптате прямой кишки [40]. Это значительно сужает круг пациентов, включенных в программу секвенирования гена *MB*. К сожалению, в России эти два дополнительных высокоспецифичных для МВ метода в настоящее время не применяются. Пациенты с пограничными результатами потовой пробы, единственной мутацией гена *CFTR* и неопределенным результатом измерения разности назальных потенциалов представляют реальные трудности для диагностики. Они, по крайней мере, уже являются носителями мутаций, поэтому нуждаются в наблюдении (в том числе в центрах по изучению МВ) и симптоматическом лечении, а их семьи — в генетическом консультировании. Дальнейшей задачей для специ-

алистов является идентификация состояния пациентов с дисфункцией *CFTR* и определение, у кого из них имеется атипичный МВ или *CFTR*-зависимое заболевание [49].

ПУТИ ОПТИМИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МУКОВИСЦИДОЗА В РФ

1. Обеспечение финансирования обязательного проведения ДНК-диагностики за счет средств федерального бюджета на всей территории РФ.
2. Поиск новых мутаций в гене *CFTR*, характерных для российской популяции, с использованием метода секвенирования ДНК.
3. Разработка специфичных для РФ наборов для ДНК-диагностики, возможно, с удешевлением их стоимости и учетом этнических характеристик различных регионов.

По последнему направлению работы ведутся, особенно в рамках национальных программ по скринингу новорожденных. Развитие технологий молекулярно-генетического анализа привело к созданию перспективного метода секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS). Благодаря постоянно снижающейся стоимости, высокой производительности, а также широким возможностям мультиплексирования по образцам и тестируемым регионам технология NGS в ближайшем будущем должна прийти на смену целому спектру методов ДНК-диагностики. В свою очередь, внедрение тестирования социально значимых моногенных наследственных заболеваний, включенных в программу обязательной неонатальной диагностики методом таргетного ресеквенирования, может значительно улучшить качество диагностики этих заболеваний и стать отправной точкой для широкого внедрения данной технологии в клиническую лабораторную практику [50].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hodson M., Geddes D., Bush A. Cystic fibrosis. *London: Hodder Arnold*. 2007. P. 503.
2. Таточенко В.К., Рачинский С.В., Волков И.К., Фёдоров А.М. Практическая пульмонология детского возраста: Справочник. Москва. 2006. 250 с.
3. Капранов Н.И., Каширская Н.Ю. Муковисцидоз. Современные достижения и актуальные проблемы. Метод. рекомендации. Изд. 4-е. Москва. 2011. 124 с.
4. Симонова О.И. Комплексная терапия детей с муковисцидозом: рекомендации для педиатра. *Педиатрическая фармакология*. 2006; 3 (6): 44–50.
5. Баранов А.А., Володин Н.Н., Самсыгина Г.А. Рациональная фармакотерапия детских заболеваний. Т. 1. М.: Литтерра. 2007. 2400 с.
6. Горинова Ю.В., Симонова О.И., Томилова А.Ю., Рославцева Е.А. Алгоритм посиндромной комплексной терапии при муковисцидозе у детей: современный подход. *Вопросы современной педиатрии*. 2013; 12 (5): 30–38.
7. Sinaasappel M., Stern M., Littlewood J., Wolfe S., Steinkamp G., Heijerman H.G.M., Robberecht E., Doring G. Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2002; 1 (2): 51–75.
8. Царегородцев А.Д., Капранов Н.И., Каширская Н.Ю., Толстова В.Д. Муковисцидоз. Ребенок и лекарство. Справочное пособие для детских врачей (изд. второе). М.: Оверлей. 2008. 608 с.
9. Wilschanski M. Novel Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. *Discov Med*. 2013 Feb; 15 (81): 127–33.
10. Canadian Cystic Fibrosis Patient Data Registry Report. *Canadian Cystic Fibrosis Foundation*. 2010. P. 4.
11. Dodge J.A., Lewis P.A., Stanton M., Wilsher J. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947–2003. *Eur Respir J*. 2007; 29: 522–526.
12. Wolfenden L.L., Schechter M.S. Genetic and non-genetic determinants of outcomes in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2009; 10 (1): 32–36.
13. Красовский С.А., Черняк А.В., Никонова В.С., Кондратьева Е.И., Каширская Н.Ю., Воронкова А.Ю., Амелина Е.Л., Капранов Н.И., Шерман В.Д., Шабалова Л.А., Самойленко В.А., Усачёва М.В., Семькин С.Ю., Симонова О.И., Авакян Л.В., Горинова Ю.В., Кусова З.А. Выживаемость больных муковисцидозом в Московском регионе за период 2003–2012 гг. Сборник тезисов XI Национального конгресса по муковисцидозу «Муковисцидоз у детей и взрослых. Взгляд в будущее», 24–25 июня. Москва. 2013. С. 53–54.

Таким образом, появление зарегистрированных чувствительных диагностических наборов МВ на российском рынке позволит скорректировать схему неонатального скрининга с возможным переходом на более чувствительную с включением ДНК-тестирования параллельно с ИРТ-тестом (схема ИРТ1/ДНК). Замена ретеста ИРТ на генетический анализ позволит снизить вероятность ложного диагностирования, увеличить скорость постановки диагноза и уменьшить общие затраты на алгоритм неонатального скрининга [45, 46]. А ранее начало терапии — всегда залог более долгой и счастливой жизни пациента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, несмотря на существенные достижения в терапии МВ, которая в РФ проводится на уровне, сопоставимом с европейским, диагностика заболевания остается важной проблемой, не до конца проработанной. Это во многом объясняется ограниченной доступностью современных генетических методов диагностики. Необходимо обеспечить генетическую диагностику заболевания, включая методы секвенирования, по возможности — за счет федеральных средств, а также улучшить освещение проблемы МВ в программах обучения студентов медицинских университетов и ввести обязательное ознакомление с проблемой на курсах повышения последилового образования педиатров, неонатологов, пульмонологов, гастроэнтерологов, эндокринологов и хирургов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Статья подготовлена при участии компании Эбботт Лэбораториз.

Авторы Шатохин Н.В. и Владыкин А.Л. являются сотрудниками компании Эбботт Лэбораториз.

14. Красовский С.А., Черняк А.В., Амелина Е.Л., Никонова В.С., Воронкова А.Ю., Самойленко В.А., Науменко Ж.К., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И., Шерман В.Д., Шабалова Л.А., Чистякова В.П., Симонова О.И., Семькин С.Ю., Горинова Ю.В., Авакян Л.В., Петрова П.Н., Кусова З.А., Усачёва М.В., Самсонова М.В. и др. Динамика выживаемости больных муковисцидозом в Москве и Московской области за периоды 1992–2001 и 2002–2011 гг. *Пульмонология*. 2012; 3: 79–87.
15. Капранов Н.И., Каширская Н.Ю. Проблемы организации и совершенствования медицинской и социальной помощи больным муковисцидозом в России на современном этапе. *Лечебное дело*. 2010; 2: 12–17.
16. Амелина Е.Л., Черняк А.В., Черняев А.Л. Муковисцидоз: определение продолжительности жизни. *Пульмонология*. 2001; 3: 61–64.
17. Красовский С.А., Амелина Е.Л., Черняк А.В. и соавт. Роль регистра московского региона в ведении больных муковисцидозом. *Пульмонология*. 2013; 2: 27–32.
18. Mehtaa G., Macek M., Jr., Mehtaa A. Cystic Fibrosis across Europe: EuroCare CF analysis of demographic data from 35 countries. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2010; 9: S5–21.
19. Ашерова И.К. Снижение тяжести течения заболевания, повышение выживаемости и качества жизни больных муковисцидозом на основе совершенствования междисциплинарной специализированной помощи. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М. 2012.
20. Гембицкая Т.Е., Черменский А.Г., Бойцова Е.В. Муковисцидоз сегодня: достижения и проблемы, перспективы этиопатогенетической терапии. *Врач*. 2012; 2: 5–8.
21. Rowe S.M., Miller S., Sorscher E.J. Mechanisms of disease Cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1992–2001.
22. Кусова З.А., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И. Особенности массового скрининга новорожденных на муковисцидоз. *Русский медицинский журнал* (Человек и лекарство. Часть 1). 2010; 18 (5): 265–270.
23. Classification of cystic fibrosis and related disorders. Report of a Joint Working Group of WHO/ICF (M)/A/ECFS/ECFTN, World Health Organization. 2000. *J Cyst Fibros*. 2002; 1: 5–8.
24. Bombieri C., Claustres M., De Boek K. et al. Recommendations for classification of diseases as CF-related disorders. *J of Cystic Fibrosis*. 2011; 10 (2): S86–102.
25. 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 Fibr*. 2008; 8: 179–196.
26. Mishra A., Greaves R., Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev*. 2005; 26: 135–153.
27. Ahmed N., Corey M., Forstner G. et al. Molecular consequences of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene mutations in the exocrine pancreas. *Gut*. 2003; 52: 1152–1164.
28. Koch C., Cuppens H., Rainisio M. et al. Investigators of the European Register of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr Pulmonol*. 2001; 31 (1): 1–12.
29. Bombieri C., Benetazzo M., Saccomani A. et al. Complete mutational screening of the CFTR gene in 120 patients with pulmonary disease. *Hum Genet*. 1998; 103: 718–722.
30. Ziedalski T.M., Kao P.N., Henig N.R. et al. Prospective analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations in adults with bronchiectasis or pulmonary nontuberculous mycobacterial infection. *Chest*. 2006; 130 (4): 995–1002.
31. Tzetis M., Efthymiadou A., Strofalis S. et al. CFTR gene mutations — including three novel nucleotide substitutions — and haplotype background in patients with asthma, disseminated bronchiectasis and chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Genet*. 2001; 108: 216–221.
32. Mennicke K., Kligenberg R.D., Bals-Pratsch M. et al. Rational approach to genetic testing of cystic fibrosis (CF) in infertile men. *Andrologia*. 2005; 37: 1–9.
33. Петрова Н.В. Молекулярно-генетические и клинико-генотипические особенности муковисцидоза в российских популяциях. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М. 2009.
34. Rosenstein B.J., Cutting G.R. Cystic fibrosis Foundation Consensus Panel. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J Pediatr*. 1998; 132: 589–595.
35. De Boeck K., Wilschanski M., Castellani C., Taylor C., Cuppens H., Dodge J., Sinaasappel M. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*. 2006; 61: 627–635.
36. Симонова О.И., Горинова Ю.В., Лазарева А.В., Катосова Л.К., Буркина Н.И., Черневич В.П. Решение проблемы хронической синегнойной инфекции у детей с муковисцидозом. *Вопросы современной педиатрии*. 2014; 13 (1): 66–73.
37. Симонова О.И., Горинова Ю.В., Лазарева А.В. Первичный высев *Pseudomonas aeruginosa* при муковисцидозе — не приговор для больного. *Российский педиатрический журнал*. 2009; 4: 60–63.
38. Лазарева А.В., Ломинадзе Г.Г., Симонова О.И., Крыжановская О.А., Катосова Л.К. Динамика этиологического спектра возбудителей бронхолегочного воспаления у детей с муковисцидозом в период 2010–2012 гг. Сборник тезисов XI Национального конгресса «Муковисцидоз у детей и взрослых. Взгляд в будущее», 24–25 мая. 2013. С. 54–55.
39. Лазарева А.В., Катосова Л.К., Симонова О.И. Цитомикроскопическое исследование мокроты и трахеального аспирата, полученных от детей с бронхолегочной патологией и муковисцидозом, в оценке их пригодности для культурального исследования. *Вопросы диагностики в педиатрии*. 2009; 1 (4): 32–35
40. Kerem E., Conway S., Elborn S., Heijerman H. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros*. 2005; 4: 7–26.
41. Farrell P.M., Rosenstein B.J., White T.B., Accurso F.J., Castellani C., Cutting G.R. et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008; 153: S4–14.
42. Шерман В.Д., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И. Неонатальный скрининг на муковисцидоз. В кн.: Муковисцидоз. Под ред. Н.И. Капранова и Н.Ю. Каширской. Москва: Медпрактика-М. 2014. С. 80–99, 100–107.
43. Симонова О.И., Томилова А.Ю., Горинова Ю.В., Сурков А.Н., Рославцева Е.А., Намазова-Баранова Л.С. Муковисцидоз. Болезни детского возраста от А до Я. Т. 5. Москва. 2014. 89 с.
44. Кусова З.А., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И. Неонатальный скрининг на муковисцидоз. *Медицинская генетика*. 2010; 9: 36–40.
45. Кусова З.А. Эффективность программы массового обследования новорожденных на муковисцидоз. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М. 2011.
46. Красовский С.А., Никонова В.С., Каширская Н.Ю., Кондратьева Е.И., Черняк А.В., Капранов Н.И., Амелина Е.Л., Шерман В.Д., Самойленко В.А., Воронкова А.Ю., Шабалова Л.А., Симонова О.И., Усачёва М.В., Черников В.В. Клинико-генетическая, микробиологическая и функциональная характеристика больных муковисцидозом, проживающих в Москве и Московской области. *Вопросы современной педиатрии*. 2013; 12 (1): 17–23.
47. Cystic Fibrosis Genotyping Assay for Use with the ABI PRISM 3100/3100-Avant Genetic Analyzers. USA: *Celera 1401 Harbor Bay Pkwy Alameda*. CA 94502 04/2007. 2007. P. 68.
48. URL: <http://www.rusnanonet.ru/news/101009/Accessed July 3, 2014>.
49. Шерман В.Д., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И. Современный алгоритм диагностики муковисцидоза. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2014; 93 (4): 68–74.
50. Смирнов А.М., Зайцева М.А., Павлов А.Е. Перспективы применения метода NGS в клинической практике скрининга новорожденных. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2013; 2: 37–40.