

2. Львов, Д. К. Выделение вируса лихорадки Западного Нила от больных людей в период эпидемической вспышки в Волгоградской и Астраханской областях / Д. К. Львов, А. М. Бутенко, О. П. Вышемирский // Вопросы вирусологии – 2002. – № 3. – С. 9–12.

3. Львов, Д. К. Лихорадка Западного Нила / Д. К. Львов, В. Б. Писарев, В. А. Петров, Н. В. Григорьева. – Волгоград : ГУ Издатель, 2004. – 101 с.

Журавлев Виталий Иванович, кандидат медицинских наук, научный сотрудник, ФГУЗ «Астраханская противочумная станция» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Кубанская, д. 3, тел.: (8512) 33-37-00, e-mail: antichum@astranet.ru.

Харченко Геннадий Андреевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой детских инфекций, ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 31-05-46, e-mail: agma@astranet.ru.

Кимирилова Ольга Геннадьевна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры детских инфекций, ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 31-05-46, e-mail: agma@astranet.ru.

УДК616.24-002.191-053.3

© С.А. Красовский, Д.Ф. Сергиенко, А.А. Степанова, Н.В. Петрова, 2013

С.А. Красовский¹, Д.Ф. Сергиенко², А.А. Степанова³, Н.В. Петрова³

ГЕНО-ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

¹ФГУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии» ФМБА России

²ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России

³ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, г. Москва

Определено, что для «тяжелых» генотипов муковисцидоза характерно раннее установление диагноза, наоборот, при «мягком» генотипе – более позднее, преимущественно в подростковом и зачастую во взрослом возрасте. В структуре грамотрицательной флоры определена большая частота высева *Burkholderia cepacia* (В. серасия) среди пациентов с «тяжелым» генотипом. Не выявлено различий между «мягкими» и «тяжелыми» генотипами по респираторному и нутритивному статусу, частоте бронхолегочных осложнений, желчекаменной болезнью и остеопорозом. Сахарный диабет, цирроз печени, кишечная непроходимость встречались только у «тяжелых» генотипов.

Ключевые слова: муковисцидоз, «мягкие» генотипы, «тяжелые» генотипы, гено-фенотипические связи.

S.A. Krasovskiy, D.F. Sergienko, A.A. Stepanova, N.V. Petrova

GENO-PHENOTYPE RELATIONSHIP IN ADULT PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

It was determined that the «heavy» cystic fibrosis genotypes characterized by early-tion established the diagnosis, on the contrary, with a «soft» genotype – later, mostly in sub-sprout and often in adulthood. The structure of the gram-negative flora of ethylene higher rate of seeding *Burkholderia cepacia* among patients with «severe» genotype was defined. The differences between «soft» and «severe» genotypes on respiratory and Nutritive-Nome status, incidence of bronchopulmonary complications of cholelithiasis and osteoporosis was not revealed. Diabetes, cirrhosis of the liver, intestinaobstruction were exclusive to the «heavy» genotypes.

Key words: cystic fibrosis, «mild» genotypes «severe» genotypes, genotype-phenotype relation.

Введение. Муковисцидоз (МВ) – наследственная патология с аутосомно-рецессивным типом наследования, обусловленная мутацией гена МВ, которая приводит к нарушению функции расположенного в апикальной части мембран экзокринных желез хлорного канала. Секрет экзокринных желез приобретает чрезмерную вязкость и обезвоженность, что обуславливает ряд патологических про-

цессов в различных органах и системах: гнойно-обструктивный бронхит с формированием бронхоэктазов, аутолиз ткани поджелудочной железы, цирроз печени, желчекаменная болезнь, обструктивная азооспермия.

Ген MB располагается на длинном плече 7 хромосомы в области q31, имеет протяженность 250 000 пар нуклеотидных оснований, включает в себя 27 экзонов. До настоящего времени выделено более 1900 мутаций и полиморфизмов. Мутации гена муковисцидозного трансмембранного регулятора белка (MBTP), согласно Европейскому консенсусу, подразделяются на пять классов в зависимости от механизма, нарушающего функцию белка [4].

Мутации I–III классов (так называемые «тяжелые») определяют более глубокое нарушение функции, IV–V классов (так называемые «мягкие») – некоторую остаточную активность хлорного канала. В компаунд-гетерозиготном состоянии эффект «мягкой» мутации доминирует над эффектом «тяжелой». Среди взрослых пациентов доля «мягких» генотипов значительно выше, чем у детей [2], что определило актуальность настоящей работы.

Цель: выявить гено-фенотипические взаимосвязи у взрослых больных муковисцидозом, исследовать влияние «тяжести» генотипа на диагностику MB, респираторный и нутритивный статус, микробиологический профиль бронхиального дерева, наличие и частоту различных легочных и внелегочных осложнений.

Материалы и методы исследования. В исследование включено 286 взрослых больных, в том числе 34 умерших, с подтвержденным диагнозом муковисцидоз, у которых была возможность идентификации «тяжести» генотипа: для «тяжелого» обязательное наличие мутаций I–III класса, для «мягкого» – хотя бы одной мутации IV–V классов. Пациенты наблюдались в центрах MB Москвы и Астрахани.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью набора реактивов для выделения DNAprep100 (DIAtom™, Россия) по протоколу производителя. Для исследования одиннадцати инсерционно/делеционных мутаций (CFTRdels2,3, F508del, I507del, 1677delTA, 2143delT, 2184insA, 394delTT, 3821delT, L138ins, 604insA, 3944delTG) использовали методику мультиплексной амплификации. Для регистрации семи точковых мутаций (G542X, W1282X, N1303K, R334W и 3849+10kbC>T, S1196X, 621+1G>T, E92K) использовали метод аллель-специфичного лигирования с последующей амплификацией. 15 больным проведено определение нуклеотидной последовательности методом прямого автоматического секвенирования на приборе фирмы Applied Biosystems (США) согласно протоколу фирмы-производителя.

В ходе изучения анамнеза оценивали следующие данные: возраст установления диагноза и манифестации бронхолегочного и кишечного синдромов, хлориды пота при проведении потового теста, микробиологический профиль бронхиального дерева, наличие легочных и внелегочных осложнений (легочная гипертензия, гипоксемическая дыхательная недостаточность, сахарный диабет, цирроз печени, желчекаменная болезнь, низкая костная масса, кишечная непроходимость). Определяли антропометрические показатели (рост, масса тела). Нутритивный статус оценивался с помощью индекса массы тела (ИМТ, кг/м²). Функция внешнего дыхания проводилась одним специалистом в соответствии с критериями ERS/ATS на аппарате MasterScreen Body (Erich Jaeger GmbH, Германия). Оценивали следующие показатели: форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ₁). Изменение или сохранение функции поджелудочной железы подтверждалось на основании клинической картины (наличие или отсутствие стеатореи), исследования копрограммы и/или фекальной эластазы, панкреатической недостаточностью считали наличие в копрограмме достаточного количества нейтрального жира и/или уровень эластазы-1 менее 200 мкг/г.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ SPSS (SPSS Inc., США). В зависимости от вида распределения данные представлены как среднее значение (M), стандартное отклонение (SD) или медиана (Me) (интерквартильный размах). При сравнении средних значений или медиан применялись критерий Стьюдента (t) или критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение. «Мягкий» генотип определен у 90 больных, «тяжелый» у 196 пациентов. Наиболее частый «тяжелый» генотип F508del/F508del был выявлен у 88 больных, самый частый «мягкий» генотип F508del/3849+10kbC>T – у 26 пациентов.

Результаты сравнительного анализа «мягких» и «тяжелых» генотипов представлены в таблицах 1–3.

Таблица 1

Результаты сравнительного анализа: установление диагноза

Варианта	«Мягкие» генотипы	«Тяжелые» генотипы	р
Возраст установления диагноза, годы	14,6	1,9	< 0,001
Диагноз во взрослом возрасте, %	34,4	5,6	< 0,001
Хлориды пота, ммоль/л	88,2 ± 21,1	100,5 ± 29,3	0,04
Отрицательные или сомнительные хлориды пота, %	16,7	2,0	< 0,001
Возраст манифестации легочного синдрома, годы	4,0	1,0	0,01

Таблица 2

Результаты сравнительного анализа: общесоматический статус

Варианта	«Мягкие» генотипы	«Тяжелые» генотипы	р
Возраст, годы	24,0	22,0	0,001
Рост, см	173,0 ± 10,0	166,3 ± 9,0	0,002
ИМТ, кг/м ²	19,1 ± 2,95	18,38 ± 2,57	0,08
ОФВ ₁ , % от должного	61,3 ± 30,4	57,4 ± 24,7	0,67
ФЖЕЛ, % от должного	79,5 ± 28,6	76,4 ± 21,7	0,71
Гипоксемическая дыхательная недостаточность, %	11,1	8,2	0,53
Легочная гипертензия, %	12,2	11,7	0,54
Бронхиальная астма, %	11,1	8,2	0,49
Сахарный диабет, %	0	21,9	<0,001
Цирроз печени, %	0	6,1	0,014
Желчекаменная болезнь, %	10,4	10,2	0,89
Низкая костная масса, %	38,8	44,9	0,61
Панкреатическая недостаточность, %	11,1	99,0	< 0,001
Кишечная непроходимость, %	0	6,6	0,012

Таблица 3

Результаты сравнительного анализа: микрофлора бронхиального дерева

Варианта	«Мягкие» генотипы	«Тяжелые» генотипы	р
<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>) в монокультуре, %	14,4	16,3	0,69
Грамотрицательная флора, отличная от <i>B. ceratia</i> , как в монокультуре, так в сочетаниях между собой и/или с <i>S. aureus</i> , %	74,5	55,6	0,03
<i>B. ceratia</i> в монокультуре и/или в сочетании с другой флорой, %	11,1	28,1	0,02

Для «тяжелых» генотипов характерно ассиметричное распределение возраста установления диагноза с доминированием первых лет жизни, в то время как при «мягком» генотипе – установление диагноза более позднее с наибольшей частотой в подростковом возрасте. Диагноз МВ, устанавливаемый во взрослом возрасте, ассоциирован в основном с «мягким» генотипом, в то время как с «тяжелым» – достоверно реже.

При сопоставлении тяжести поражения и осложнений со стороны органов дыхания и пищеварения наиболее выраженные изменения отмечены в частоте панкреатической недостаточности, сахарного диабета, цирроза печени и кишечной непроходимости. Аналогичных симметричных изменений со стороны органов дыхания получено не было, однако инфицирование *B. ceratia* достоверно чаще выявлялось у «тяжелых» генотипов.

Проведенное исследование, как и большинство работ данной тематики в мире, продемонстрировало ряд фенотипических особенностей у больных с различной «тяжестью» генотипа [1, 3, 8, 10, 11, 12]. Эти особенности обусловлены как доминированием «мягкой» мутации над «тяжелой», так и разной чувствительностью тканей к дисфункции хлорного канала. Известно, что железы бронхолегочной системы более чувствительны к этой дисфункции по сравнению с поджелудочной железой и другими органами-мишенями желудочно-кишечного тракта [4, 9]. Таким образом, и «тяжелые», и

«мягкие» генотипы в данной работе имели поражение легких, в то время как только «тяжелые» генотипы манифестировали еще и поражением органов пищеварения.

Значительно более позднее установление диагноза у больных с «мягким» генотипом обусловлено рядом причин. Прежде всего, выпадением из классической диагностической триады МВ (легочный синдром, кишечный синдром, положительный потовый тест) всей симптоматики поражения желудочно-кишечного тракта, что приводит к отсутствию настороженности педиатров в отношении МВ. Во-вторых, дебют гнойно-обструктивного бронхита менее выражен и происходит позднее, чем у большинства «тяжелых». В-третьих, определенную роль играет не ярко выраженное повышение хлоридов, а в ряде случаев сомнительный и даже отрицательный результат при проведении потового теста, что является следствием менее выраженной дисфункции хлорного канала. Третье обстоятельство наиболее характерно для мутации 3849+10kbC>T, при которой по данным разных авторов до половины случаев наблюдается сомнительный или отрицательный потовый тест. Эта самая частая «мягкая» мутация в мире приводит к возникновению скрытого сайта инициации транскрипции, в результате чего образуется матричная РНК с дополнительным экзоном, кодирующим 38 аминокислот. Однако некоторая часть транскриптов мРНК продолжает соединяться правильно, что приводит к незначительному нарушению функции белка МВТР [5]. Уникальность данной мутации состоит еще и в том, что при ее наличии большинство мужчин с МВ не являются бесплодными, в то время как при других генетических комбинациях, в том числе и «мягких» генотипах, отмечается азооспермия.

Показана тесная взаимосвязь тяжести генотипа с различными проявлениями поражения органов пищеварения и отсутствие корреляции с выраженностью поражения легких. Похожие взаимосвязи были продемонстрированы в большинстве зарубежных работ [8, 10, 11, 12]. Отсутствие очевидных корреляционных зависимостей «тяжести» генотипа и поражения бронхолегочной системы обусловлено значительным влиянием различных внешних факторов: приверженностью к терапии, ее объемом и адекватностью, различным инфицированием респираторного тракта, социальным статусом и т.д. Вероятно, отсутствие различий в тяжести поражения легких обследуемых групп обусловлено поздней, а иногда и очень поздней диагностикой МВ среди «мягких» генотипов. Можно сделать предположение о том, что если бы диагноз у пациентов с «мягким» генотипом устанавливался в первые годы жизни, как у подавляющего большинства больных с «тяжелыми» генотипами, и, соответственно, раньше начиналось комплексное лечение и наблюдение, то, возможно, тяжесть поражения органов дыхания при «мягких» генотипах была менее выраженной, чем при «тяжелых». Косвенным доказательством этого предположения является полученный нами результат о достоверно большей доле больных инфицированных *V. серасіа* среди «тяжелых» генотипов. В ряде зарубежных работ также показано, что пациенты с «мягкими» генотипами имеют более благоприятный микробиологический фон и чаще инфицированы *S. aureus*. Полученный результат можно объяснить более тяжелой дисфункцией хлорного канала, приводящей к более глубокому нарушению реологических свойств мокроты и усилению ее вязкости, что в итоге благоприятствует инфицированию респираторного тракта более патогенными микроорганизмами. Возможно, эти обстоятельства привели к тому, что в некоторых работах зарубежных авторов все-таки отмечены преимущества респираторного статуса у больных с «мягким» генотипом [6, 7].

Важным результатом работы явилось выделение больных с «тяжелым» генотипом не только как пациентов с панкреатической недостаточностью, но и как больных с определенным риском развития других различных осложнений со стороны органов пищеварительной системы. Такие тяжелые осложнения МВ как сахарный диабет, цирроз печени и кишечная непроходимость встречались только в группе с «тяжелыми» генотипами. С другой стороны, желчекаменная болезнь развивалась симметрично в обеих группах, следовательно, среди пациентов с «мягкими» генотипами есть нарушение литогенности желчи, приводящее к камнеобразованию. Частота остеопороза, как и в большинстве зарубежных работ, сопоставима среди групп, что обусловлено тесной взаимосвязью состояния костной массы с функцией легких. Такой же тесной корреляцией функции бронхолегочной системы и питательного статуса можно объяснить отсутствие различий ИМТ между группами.

Выводы.

1. Для больных муковисцидозом с «мягким» генотипом характерно позднее установление диагноза.
2. Респираторный, как и нутритивный, статус у больных с «мягким» генотипом не отличаются от «тяжелых» генотипов.

3. Течение заболевания у больных с «мягким» генотипом не осложняется развитием сахарного диабета, цирроза печени и кишечной непроходимости, в то время как частота желчекаменной болезни и низкой костной массы сопоставима с «тяжелыми» генотипами.

Список литературы

1. Каширская, Н. Ю. Состояние желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы и гепатобилиарной системы у больных муковисцидозом (особенности клиники, диагностики, лечения и реабилитации) : дис. ... д-ра мед. наук / Н. Ю. Каширская. – М., 2001. – 325 с.
2. Красовский, С. А. Клинико-генетическая, микробиологическая и функциональная характеристика больных муковисцидозом, проживающих в Москве и Московской области / С. А. Красовский, В. С. Никонова, Н. Ю. Каширская // Вопросы современной педиатрии. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 17–23.
3. Петрова, Н. В. Молекулярно-генетические и клинико-генотипические особенности муковисцидоза в российских популяциях : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Н. В. Петрова. – М., 2009. – 42 с.
4. Castellani, C. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice / Castellani C., Cuppens H., Macek M. // J. Cyst. Fibros. – 2008. – Vol. 8. – P. 179–196.
5. Dugueperoux, I. The CFTR 3849+10kbC>T and 2789+5G>A alleles are associated with a mild CF phenotype / I. Dugueperoux, M. De Braekeleer // Eur. Respir. J. – 2005. – Vol. 25, № 3. – P. 468–473.
6. Gan, K. H. A cystic fibrosis mutation associated with mild lung disease / K. H. Gan, H. J. Veeze, M. W. Van Den Ouweland // N. Engl. J. Med. – 1995. – Vol. 333. – P. 95–99.
7. Highsmith, W. E. A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations / W. E. Highsmith, L. H. Burch, Z. Zhou et al. // N. Engl. J. Med. – 1994. – Vol. 331, № 15. – P. 974–980.
8. Kerem, B. The molecular basis for disease variability in cystic fibrosis / B. S. Kerem, E. Kerem // Eur. J. Hum. Genet. – 1996. – Vol. 4, № 2. – P. 65–73.
9. Mishra, A. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era / A. Mishra, R. Greaves, J. Massie // Clin. Biochem. Rev. – 2005. – Vol. 26, № 4. – P. 135–153.
10. Parad, R. B. Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by Pseudomonas aeruginosa infection and immune status and only modestly genotype / R. B. Parad, C. J. Gerard, D. Zurawski et al. // Infect. Immun. – 1999. – Vol. 67, № 9. – P. 4744–4750.
11. Salvatore, F. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis : The role of modifier genes / F. Salvatore, O. Scudiero, G. Castaldo // Am. J. Med. Genet. – 2002. – Vol. 111, № 1. – P. 88–95.
12. Zielenski, J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis / J. Zielenski // Respiration. – 2000. – Vol. 67, № 2. – P. 117–133.

Красовский Станислав Александрович, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории муковисцидоза, ФГУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии» ФМБА России, Россия, 105077, г. Москва, ул. 11-Парковая, д. 32, тел.: (495) 465-74-15, e-mail: sa_krasovsky@mail.ru.

Сергиенко Диана Фикретовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры факультетской педиатрии, ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 38-50-66, e-mail: agma@astranet.ru.

Степанова Анна Александровна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории ДНК-диагностики, ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Россия, 115478, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1, тел.: (499) 324-08-11, e-mail: cany@yandex.ru.

Петрова Ника Валентиновна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетической эпидемиологии, ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Россия, 115478, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1, тел.: (499) 320-60-90, e-mail: npetrova63@mail.ru.