

© ИЛЬЕНКОВА Н.А., ЧИКУНОВ В.В.

УДК 616.37-004-036:612.6.05 (571.51)

КЛИНИКО-ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ В КРАСНОЯРСКОМ КРАЕ

Н.А. Ильенкова, В.В. Чикунов

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.

Войно-Ясенецкого, ректор – д.м.н., проф. И.П. Артюхов;

краевая клиническая больница, Красноярск, гл. врач – Е.Е. Корчагин;

региональное отделение Российского центра муковисцидоза,

рук. – д.м.н., проф. Н.А. Ильенкова.

***Резюме.** Проведено клинико-лабораторное обследование 24 больных муковисцидозом, состоящих на учете в Региональном центре муковисцидоза. Дана характеристика полученных показателей в зависимости от мутации гена CFTR.*

***Ключевые слова:** муковисцидоз, ген CFTR.*

Определение частоты и спектра мутаций гена CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) в настоящее время является актуальной проблемой. Частота различных мутаций гена CFTR в различных регионах России не одинакова. У больных муковисцидозом (МВ) из европейских регионов России частота мутации delF508 составляет 45-57%, CFTRdele2,3(21kb) – 6,5%. Мутации 2143delT, 394delTT также являются относительно частыми для больных из Центрального региона России, где их суммарная доля составляет около 3,3-4,0%, в Северо-Западном регионе России их частота составляет 2,3% [1, 2, 3, 4].

Клиническая картина муковисцидоза разнообразна, зависит от возраста ребенка, тяжести поражения отдельных органов и систем, продолжительности заболевания и его осложнений, адекватности терапии, а также, по ряду литературных данных, от характера и типа мутаций гена CFTR [2, 5].

Целью настоящего исследования явилось изучение спектра генных мутаций у больных муковисцидозом в Красноярском крае, с последующим определением клинико-лабораторных признаков данного заболевания в зависимости от генотипа CFTR.

Материалы и методы

Проведено обследование 24 больных с муковисцидозом, состоящих на учете в Региональном центре муковисцидоза города Красноярска, из них 18 (75,0±8,8%) – со смешанной, 4 (16,7±7,6%) пациента – с легочной и 2 (8,3±5,6%) – с кишечной формой муковисцидоза. Возраст обследованных составил от 1 месяца до 24 лет, в среднем – 7,7±1,5 лет. Для выявления мутаций в гене CFTR проводилось выделение геномной ДНК из лейкоцитов цельной крови, нанесённых на фильтровальную бумагу, с использованием набора «ДНК-сорб В» (Россия) согласно общепринятым методикам. Анализ мутаций гена CFTR осуществляли амплификацией фрагментов ДНК методом ПЦР, с последующим анализом расщепления ферментами рестрикции, детекцией фрагментов ДНК (рис. 1). Проведение ПЦР-анализа 12 мутаций гена CFTR (*del21kb*, *delF508*, *dell507*, *1677delTA*, *2143delT*, *2184insA*, *394delTT*, *3821delT*, *G542X*, *N1303K*, *W1282X*, *R117H*) осуществляли с использованием набора «CF8», «CF4» (Россия). Комплексная оценка степени тяжести заболевания у больных муковисцидозом в баллах проводилась с использованием шкалы Швахмана-Брасфильда, в модификации С.В. Рачинского и Н.И. Капранова (1987). Для оценки веса и роста использовали перцентильные графические стандарты, полученные Национальным центром по статистике здоровья (США) и рекомендованные ВОЗ. Это позволило оценить индивидуальные антропометрические отклонения и сравнить их с данными зарубежных исследователей. Все измерения (рост, вес) производили по общепринятой методике (R.S. Gibson, 1990), определялся процент отклонения их от нормы с учетом возраста и пола с подсчетом весо-ростового индекса (ВРИ).

Статистическая обработка проводилась с помощью пакета программ «Biostat». Определение истинности гипотезы об отсутствии различий проводилось методами непараметрической статистики с помощью критерия Манна-Уитни и расчетом показателя χ^2 . Для средних значений рассчитан доверительный интервал (ДИ) с достоверностью 95%, качественные критерии указаны в виде процентных долей.

Результаты и обсуждение

Проведенный анализ и верифицированный спектр генных мутаций среди 24 больных муковисцидозом в Красноярском крае показал, что, как и в большинстве российских популяций, наиболее частой мутацией является delF508 – у 21 больного (87,5±6,8%); у 1 (4,2±4,1%) определялась CFTRdele2,3 (21kb), у 1 (4,2±4,1%) – 2143delT и у 1 (4,2±4,1%) □ 394delTT. У 2 детей из 24 (8,4±5,7%) нам не удалось определить мутации, которые, по-видимому, локализованы в других регионах гена CFTR на анализируемых хромосомах, при этом клинические признаки соответствовали муковисцидозу, потовые тесты определялись как «положительные». Известно, что в связи с большим числом возможных мутаций в гене CFTR нельзя исключить возможности присутствия не установленных мутаций у обследованных больных. Проведен анализ встречаемости мутаций в зависимости от генотипа: выявлено 11 гомозигот (10 больных из 24 (41,6±10,1%) с генотипом delF508/delF508; 1 (4,2±4,1%) – с CFTRdele2,3 (21kb)/CFTRdele2,3 (21kb)), 11 – компаунд-гетерозигот по мутации delF508 (у 9 из 24 (37,4±37,4%)–генотип delF508 /-; у 1 (4,2±4,1%) – del F508/ 2143delT; у 1 (4,2±4,1%) – del F508 /394delTT) и 2 (8,4±5,7%) пациента с неизвестными мутациями гена CFTR (генотип -/-).

Проведен анализ зависимости клинико-лабораторных проявлений от типа мутации гена CFTR. По результатам ДНК-типирования больные были подразделены на две группы, согласно CFTR генотипам: 1 группа – гомозиготы по мутации delF508 (delF508/delF508) – 10 человек, 2 группа – гетерозиготные компаунды по мутации delF508 и прочим мутациям (delF508/non delF508) – 11 человек. Для пациентов с генотипом delF508/delF508 была характерна ранняя (с

рождения) манифестация заболевания с кишечным синдромом – у 8 из 10 (80,0±12,6%). В то время как для больных с генотипом delF508/non delF508 характерно более позднее (во втором полугодии и старше года) начало, с преобладанием респираторного синдрома на старте заболевания – у 5 из 11 (45,5±15,0%) пациентов.

Клиническое обследование больных проводилось в период обострения заболевания, которое чаще протекало по типу обструктивного бронхита в сочетании с синдромом диареи в обеих группах сравнения: у 5 из 10 (50,0±15,8%) больных с генотипом delF508/delF508, с генотипом delF508/non delF508 у 6 из 11 (54,5±15,0%). Обострение по типу бронхита с обструкцией – у 3 из 10 (30,0±14,5%) и 4 из 11 (36,4±14,5%), соответственно. Изолированный кишечный вариант обострения встречался у 2 из 10 (20,0±12,6%) гомозигот по delF508 и у 1 из 11 (9,1±8,7%) – компаунда по мутации delF508. Анализ жалоб предъявляемых больными муковисцидозом, в зависимости от генотипа, показал, что у пациентов с delF508/delF508 наиболее часто встречались: жирный «зловонный» стул у 9 (90,0±9,5%); отмечалась плохая прибавка веса у 8 (80,0±12,6%); одышка при физической нагрузке, кашель с гнойной мокротой, вздутие и боли в животе – у 7 (70,0±14,5%); слабость, утомляемость, нарушение аппетита у 6 (60,0±15,5%); затрудненное носовое дыхание, одышка в покое – у 5 (50,0±15,8%); носовые кровотечения – у 4 (40,0±15,5%); малопродуктивный навязчивый кашель – у 1 (10,0±9,5%) больного. У пациентов с генотипом delF508/nondelF508 наиболее часто встречались: слабость, утомляемость, одышка при физической нагрузке и в покое, повышение температуры тела до субфебрильных и фебрильных цифр, плохая прибавка веса – у 9 из 11 (81,8±11,6%); затрудненное носовое дыхание, жирный «зловонный» стул, кашель с гнойной мокротой – у 8 (72,7±13,4%); снижение аппетита у 7 (63,6±14,5%); вздутие и боли в животе – у 5 (45,5±15,0%); носовые кровотечения – у 2 (18,2±11,6%); кашель со слизисто-гнойной мокротой – у 1 из 11 (9,1±8,7%).

Известно, что снижение темпов роста или потеря массы тела пациента является индикатором неблагополучия при муковисцидозе [2, 3]. Весоростовой

индекс (ВРИ) на момент постановки диагноза у больных с генотипом delF508/delF508 составил в среднем 82,3% (95% ДИ: 78,5-89,7), в то время как у больных с delF508/nondelF508 – 86,7% (95% ДИ 75,7-95,8), что существенно ниже стандартных норм.

При осмотре больных с генотипом delF508/delF508 – выявлена деформация грудной клетки (эмфизематозная, килевидная, бочкообразная) у 6 из 10 (60,0±15,5%), которая сопутствовала симптомам бронхолегочной патологии, против 4 из 11 (36,4±14,5%) у больных с генотипом delF508/nondelF508; признаки хронической гипоксии тканей («барабанные палочки» и «часовые стекла» различной степени выраженности) отмечались у 7 из 10 пациентов (70,0±14,5%), против 6 из 11 (54,5±15,5%) у больных с компаунд-гетерозиготным генотипом. Перкуторный звук над легкими в обеих группах преимущественно имел коробочный оттенок у 9 из 10 (90,0±9,5%) с генотипом delF508/delF508, против 10 из 11 (90,9±8,7%) с генотипом delF508/nondelF508. Аускультативная картина в легких у больных муковисцидоза с разными генотипами была разнообразной. Так, в большинстве случаев у 7 из 10 (70,0±14,5%) пациентов с генотипом delF508/delF508 выслушивались влажные хрипы, против 10 из 11 (90,9±8,7%) у пациентов с генотипом delF508/nondelF508; сухие хрипы у 6 из 10 (60,0±15,5%) соответственно, против 6 из 11 (54,5±15,5%); у большинства – 9 из 10 (90,0±9,5%), против 10 из 11 (90,9±8,7%) соответственно хрипы имели диффузный характер. Локальные хрипы в легких у больных муковисцидозом не определялись. При перкуторном определении границ сердца нормальные размеры отмечались у всех наблюдаемых пациентов с муковисцидозом. Со стороны сердечно-сосудистой системы наблюдалась тахикардия – у 3 из 10 (30,0±14,5%) больных из первой группы, против 4 из 11 (36,4±14,5%) из второй; экстрасистолия у 1 из 11 (9,1±8,7%) детей, систолический шум в области верхушке сердца (систолический шум отмечался неинтенсивный и не проводился за пределы сердца) у 4 из 10 (40,0±15,5%), против 4 из 11 (36,4±14,5%) больных с компаунд-гетерозиготным генотипом. Желудочно-кишечные нарушения проявлялись полифекацией у 7 из 10 (70,0±14,5%) пациентов с генотипом

delF508/delF508, против 4 из 11 ($36,4 \pm 14,5\%$) с генотипом delF508/nondelF508; неоформленным, учащенным стулом, видимой стеатореей и интоксикационный синдром у 7 из 10 ($70,0 \pm 14,5\%$), против 7 из 11 ($63,6 \pm 14,5\%$) соответственно. Гепатомегалия отмечалась у 5 из 10 ($50,0\%$) больных первой группы, против 5 из 11 ($45,5 \pm 15,8\%$) соответственно; спленомегалия у 3 из 10 ($30,0 \pm 14,5\%$), против 2 из 11 ($18,2 \pm 13,4\%$), соответственно. «Эквивалент мекониального илеуса» в виде кишечной колики, отсутствие самостоятельного стула, повторной рвоты, вздутие живота отмечался у 2 из 10 ($20,0 \pm 12,6\%$) детей с генотипом delF508/delF508. У двух девочек, достигших пубертатного возраста, наблюдалось отставание в половом развитии (задержка менархе, оволосения подмышечных впадин), по 1 из 10 ($10,0 \pm 9,5\%$) в первой и 1 из 11 ($9,1 \pm 8,7\%$) во второй группе, соответственно (табл. 1). При изучении зависимости клинических форм заболевания от генотипа CFTR нами установлено, что у больных с delF508/delF508 чаще встречалась смешанная форма заболевания – у 8 из 10 ($80,0 \pm 12,6\%$), против 7 из 11 ($63,6 \pm 14,5\%$) в компаунд – гетерозиготном. В то время как у пациентов с генотипом delF508/- чаще верифицировалась легочная форма – у 3 из 11 ($27,3 \pm 5,1\%$), против 1 из 10 ($10,0 \pm 9,5\%$) с генотипом delF508/delF508. Изолированная кишечная форма встречалась в обеих группах – у 1 из 10 ($10,0 \pm 9,5\%$) в первой группе и 1 из 11 ($9,1 \pm 8,7\%$) – во второй. При изучении зависимости тяжести заболевания от генотипа CFTR нами установлено, что пациенты с генотипом delF508/delF508 в одинаковой степени имели тяжелое и среднетяжелое состояние – 3 из 10 ($30,0 \pm 14,5\%$), кроме того, у 2 из 10 ($20,0 \pm 12,6\%$) заболевание носило крайне тяжелое течение. В то время как пациенты с генотипом delF508/nondelF508 имели более легкое течение муковисцидоза, с преобладанием больных со среднетяжелым течением – у 6 из 11 ($54,5 \pm 15,0\%$).

При микроскопическом исследовании кала выявлено, что более выраженные изменения определялись у пациентов с генотипом delF508/delF508. Основной причиной выявленных нарушений является недостаточная функция поджелудочной железы, при этом дефицит панкреатических ферментов приводит в основном к нарушению полостной фазы пищеварения, к снижению

переваривания и всасывания жиров, белков, полисахаридов с развитием стеатореи, креатореи, амилореи [3].

Рентгенологическое обследование всем больным с муковисцидозом проводилось при верификации диагноза. Наиболее характерные признаки для больных с генотипом delF508/delF508: усиление легочного рисунка у 9 из 10 (90,0±9,5%), против 11 (100±0,0%) больных с генотипом delF508/non delF508; признаки деформации у 8 из 10 (80,0±12,6%), против 5 из 11 (45,5±15,0%) пациентов соответственно; эмфизема у 8 из 10 (80,0±12,6%), против 3 из 11 (27,3±13,4%) соответственно; развитие пневмосклероза у 7 из 10 (70,0±14,5%) детей, против 4 из 11 (36,4±14,5%) соответственно; инфильтративные тени у 2 из 10 (20,0±12,6%) больных, против 3 из 11 (27,3±13,4%); сегментарные ателектазы у 4 из 10 (40,0±15,5%), против 2 из 11 (18,2±11,6%), соответственно.

Объективным критерием оценки эффективности терапии и прогноза муковисцидоза является исследование функции внешнего дыхания (ФВД) [3, 6, 7]. При изучении зависимости показателей ФВД от генотипа нами установлено, что в группе больных с генотипом delF508/delF508 имелись более выраженные изменения показателей, с достоверным отличием по FEV₁, FEF₅₀ (табл. 2).

Важным критерием прогноза заболевания и фактором, определяющим интенсивность антибактериальной терапии, представляется характер колонизации бронхов микробной флорой [3, 6]. Среди больных муковисцидозом с различными генотипами отмечалась одинаковая частота высева *Pseudomonas aeruginosa*: у 8 (80,0±12,6%) с генотипом delF508/delF508, против 8 (72,7±13,4%) с delF508/nondelF508.

При анализе результатов ультразвукового исследования печени, поджелудочной железы и желчного пузыря выявлено: диффузное уплотнение, усиление и деформация сосудистого рисунка поджелудочной железы у 8 из 10 (80,0±12,6%) больных с генотипом delF508/delF508, против 7 из 11 (63,6±14,5%) с генотипом delF508/nondelF508; у 8 из 10 (80,0±12,6%) пациентов – увеличение размеров поджелудочной железы, против 8 из 11 (72,7±13,4%); увеличение размеров печени у 7 из 10 (70,0±14,5%), против 6 из 11 (54,5±15,0%); протоковые изменения печени у 10 из 10 (100±0,0%), против 10

из 11 ($90,9 \pm 8,7\%$); уплотнение и утолщение стенок желчного пузыря у 8 из 10 ($80,0 \pm 12,6\%$), против 8 из 11 ($72,7 \pm 13,4\%$), соответственно. У 2 из 10 ($20,0 \pm 12,6\%$) больных с гомозиготным генотипом выявлены кисты печени.

При сопоставлении показателей проводимости хлоридов в потовой жидкости в зависимости от генотипа установлено, что у больных с $\text{delF508}/\text{delF508}$ определялись высокие величины уровня проводимости хлоридов пота (выше 100 ммоль/л) – у 7 из 10 ($70,0 \pm 14,5\%$), против – 4 из 11 ($36,4 \pm 14,5\%$) с генотипом $\text{delF508}/\text{nondelF508}$. Необходимо отметить преобладание больных с генотипом $\text{delF508}/\text{nondelF508}$ уровня проводимости хлоридов пота в диапазоне от 80 до 100 ммоль/л (рис. 2).

Для получения большего количества достоверных клинических и лабораторных признаков, характерных для того или иного варианта генотипа требуется дальнейшее проспективное наблюдение за пациентами с данной патологией [3,4,5].

Таким образом, по результатам ДНК-типирования на территории Красноярского края у пациентов с муковисцидозом значимыми мутациями являются delF508 , CFTRdele2,3(21kb) , 2143delT , 394delTT , что соответствует спектру мутаций, зарегистрированному на основной территории России. Полученные сведения о спектре мутаций гена CFTR у больных МВ в Красноярском крае в значительной мере дополняют данные о распространенности мутаций в Сибирском Федеральном округе, что позволяет использовать их для планирования дальнейших исследований в области популяционной генетики.

CLINICAL AND GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS IN KRASNOYARSK REGION

N.A. Ilyenkova, V.V. Chikunov

Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Vojno-Yasenetsky

Abstract. It was conducted clinical and laboratory examination of 24 patients with cystic fibrosis who are registered at the Regional Centre of cystic fibrosis. As a result - the characteristics of the obtained indices depending on the mutation of the gene CFTR.

Key words: cystic fibrosis, gene CFTR.

Литература

1. Капранов Н.И., Каширская Н.Ю., Воронкова А.Ю. и др. Муковисцидоз (Современные достижения и актуальные проблемы) / Метод. рекомендации. – М.: ГУ Мед.-генет. науч. центр РАМН, 2010. – 109 с.
2. Петрова Н.В., Гинтер Е.К. Десятилетний опыт молекулярно-генетической диагностики муковисцидоза в МГНЦ РАМН // Пульмонология. – 2001. – № 3. – С.17-20.
3. Carry R., Cutting M.D. Implications of CFTR functions on the understanding of the relationship between genotype/ phenotype // *Pediatr. pulmonol.* – 2008. – Vol. 12. – P. 119-127.
4. Dodge J.A., Brock D.J.H., Widdicombe J.H. Cystic fibrosis // *Curr. topics.* – 2009. – 370 p.
5. Duthie A., Doherty P.P., Williams C. Genotype analysis for delta F508, G551D and R553X mutations in children and young adults with cystic fibrosis with and without chronic liver disease // *Hepatology.* – 2009. – Vol. 15. – P. 660-664.