

европейского происхождения канадскими учеными К. Оен и соавт. не было обнаружено взаимосвязи полиморфных локусов $-1082G>A$, $-819C>T$ и $-592C>A$ гена *IL10* и их гаплотипов с риском развития всех вариантов ЮИА, а также каких-либо различий в распределении генотипов между пациентами с персистирующим и распространенным олигоартикулярными вариантами ЮИА [17]. М. Фифе и соавт. также не обнаружили ассоциации полиморфного локуса $-592C>A$ гена *IL10* с развитием системного ЮИА у пациентов из Великобритании [9]. Противоречивость приведенных данных может быть обусловлена различиями в этнической принадлежности обследованных лиц, а также недостаточным объемом соответствующих выборок и свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения роли полиморфного локуса $-592C>A$ гена *IL10* в развитии ЮИА и его вариантов.

Литература

1. Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*. 2007; 369 (9563): 767–78.
2. Petty RE, Laxer RM, Lindsley CB, Wedderburn L. Textbook of pediatric rheumatology. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016.
3. Moroldo MB, Chaudhari M, Shear E, Thompson SD, Glass DN, Giannini EH. Juvenile rheumatoid arthritis affected sibpairs: Extent of clinical phenotype concordance. *Arthritis Rheum*. 2004; 50 (6): 1928–34.
4. Hinks A, Cobb J, Marion MC, Prahalad S, Sudman M, Bowes J. et al. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies 14 new susceptibility loci for juvenile idiopathic arthritis. *Nat Genet*. 2013; 45 (6): 664–9.
5. Lin YT, Wang CT, Gershwin ME, Chiang BL. The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev*. 2011; 10 (8): 482–9.
6. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683–765.
7. Muller K, Herner EB, Stagg A, Bendtzen K, Woo P. Inflammatory cytokines and cytokine antagonists in whole blood cultures of patients with systemic juvenile chronic arthritis. *Br J Rheumatol*. 1998; 37 (5): 562–9.
8. Westendorp R. G., Langermans J. A., Huizinga T. W. et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet*. 1997; 349 (9046): 170–3.
9. Fife MS, Gutierrez A, Ogilvie EM, Stock CJ, Samuel JM, Thomson W, et al. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8 (5): R. 148.
10. Iyer SS., Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in

References

1. Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*. 2007; 369 (9563): 767–78.
2. Petty RE, Laxer RM, Lindsley CB, Wedderburn L. Textbook of pediatric rheumatology. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016.
3. Moroldo MB, Chaudhari M, Shear E, Thompson SD, Glass DN, Giannini EH. Juvenile rheumatoid arthritis affected sibpairs: Extent of clinical phenotype concordance. *Arthritis Rheum*. 2004; 50 (6): 1928–34.
4. Hinks A, Cobb J, Marion MC, Prahalad S, Sudman M, Bowes J. et al. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies 14 new susceptibility loci for juvenile idiopathic arthritis. *Nat Genet*. 2013; 45 (6): 664–9.
5. Lin YT, Wang CT, Gershwin ME, Chiang BL. The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev*. 2011; 10 (8): 482–9.
6. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 683–765.
7. Muller K, Herner EB, Stagg A, Bendtzen K, Woo P. Inflammatory cytokines and cytokine antagonists in whole blood cultures of patients with systemic juvenile chronic arthritis. *Br J Rheumatol*. 1998; 37 (5): 562–9.
8. Westendorp R. G., Langermans J. A., Huizinga T. W. et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet*. 1997; 349 (9046): 170–3.
9. Fife MS, Gutierrez A, Ogilvie EM, Stock CJ, Samuel JM, Thomson W, et al. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8 (5): R. 148.
10. Iyer SS., Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in

ВЫВОДЫ

Результаты нашего исследования свидетельствуют о наличии ассоциации полиморфного локуса $-592C>A$ гена *IL10* с развитием персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА у детей из Республики Башкортостан. Показано, что генотип *CC* маркирует значимо повышенный риск развития персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА в целом, а с учетом гендерных особенностей — только у девочек. Кроме того, у девочек маркером повышенного риска персистирующего олигоартикулярного варианта ЮИА является также аллель *C*.

- inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012; 32 (1): 23–63.
11. Mathew CC. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. In: Walker JM, editor. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2. N.Y., L.: Human Press; 1984. P. 31–4.
 12. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Gilvarry E, Day CP. P. Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut*. 2000; 46 (4): 540–5.
 13. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesto R, Morena V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006; 22 (15): 1928–9.
 14. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999; 42 (6): 1101–8.
 15. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997; 24 (1): 1–8.
 16. Crawley E, Kon S, Woo P. Hereditary predisposition to low interleukin-10 production in children with extended oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001; 40 (5): 574–8.
 17. Oen K, Malleson PN, Cabral DA, Rosenberg AM, Petty RE, Nickerson P, et al. Cytokine genotypes correlate with pain and radiologically defined joint damage in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44 (9): 1115–21.

- inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012; 32 (1): 23–63.
11. Mathew CC. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. In: Walker JM, editor. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2. N.Y., L.: Human Press; 1984. P. 31–4.
 12. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Gilvarry E, Day CP. P. Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut*. 2000; 46 (4): 540–5.
 13. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesto R, Morena V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006; 22 (15): 1928–9.
 14. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999; 42 (6): 1101–8.
 15. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997; 24 (1): 1–8.
 16. Crawley E, Kon S, Woo P. Hereditary predisposition to low interleukin-10 production in children with extended oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001; 40 (5): 574–8.
 17. Oen K, Malleson PN, Cabral DA, Rosenberg AM, Petty RE, Nickerson P, et al. Cytokine genotypes correlate with pain and radiologically defined joint damage in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44 (9): 1115–21.

ВЫСОКАЯ ЧАСТОТА НОСИТЕЛЬСТВА В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ МУТАЦИЙ ГЕНА *CFTR*, АССОЦИИРОВАННЫХ С МУКОВИСЦИДОЗОМ, И МУТАЦИЙ ГЕНА *PAH*, АССОЦИИРОВАННЫХ С ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ

Д. Д. Абрамов¹✉, В. В. Кадочникова¹, Е. Г. Якимова¹, М. В. Белоусова¹, А. В. Маерле³, И. В. Сергеев¹, А. А. Рагимов², А. Е. Донников³, Д. Ю. Трофимов³

¹ Государственный научный центр "Институт иммунологии", Москва

² Центр крови Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова, Москва

³ ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва

Целью исследования было установление частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах *CFTR* и *PAH* у доноров первичной кроводачи. При генотипировании 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации, обнаружены 29 носителей мутаций в гене *CFTR*, ассоциированных с развитием муковисцидоза (частота в выборке составила 2,9 %, или 1:34), и 32 носителя мутаций в гене *PAH*, ассоциированных с развитием фенилкетонурии (частота в выборке — 3,2 %, или 1:31). Всего обнаружен 61 носитель мутаций в генах *CFTR* и *PAH* (частота в выборке — 6,1 %, или 1:16). Полученные данные могут быть использованы для разработки оптимальных схем диагностики указанных наследственных заболеваний.

Ключевые слова: муковисцидоз, *CFTR*, фенилкетонурия, *PAH*, генотипирование, российская популяция

✉ Для корреспонденции: Дмитрий Дмитриевич Абрамов
115478, Москва, Каширское ш., 24, корп. 2; d.d.abramov@mail.ru
Статья поступила: 11.09.2015 Статья принята к печати: 05.11.2015

HIGH CARRIER FREQUENCY OF *CFTR* GENE MUTATIONS ASSOCIATED WITH CYSTIC FIBROSIS, AND *PAH* GENE MUTATIONS ASSOCIATED WITH PHENYLKETONURIA IN RUSSIAN POPULATION

Abramov DD¹✉, Kadochnikova VV¹, Yakimova EG¹, Belousova MV¹, Maerle AV³, Sergeev IV¹, Ragimov AA², Donnikov AE³, Trofimov DY³

¹ National Research Centre – Institute of Immunology, Moscow

² Blood Centre of The First Sechenov Moscow State Medical University, Moscow

³ DNA-Technology LLC, Moscow

The study aimed to establish the frequency of common *CFTR* and *PAH* mutations in the Russian population in first time blood donors. Genotyping of 1000 first time blood donors who identify themselves as Russians and live permanently in the Russian Federation, detected 29 carriers of *CFTR* mutations associated with cystic fibrosis development (carrier frequency in the sample of subjects was 2.9 %, or 1:34) and 32 carriers of *PAH* mutations associated with phenylketonuria development (carrier frequency in the sample of subjects was 3.2 %, or 1:31). Altogether 61 carrier of *CFTR* and *PAH* mutations was found (carrier frequency in the sample of subjects was 6.1 %, or 1:16). The obtained data can be used for developing effective diagnostic guidelines for the above mentioned hereditary diseases.

Keywords: cystic fibrosis, *CFTR*, phenylketonuria, *PAH*, genotyping, Russian population

✉ Correspondence should be addressed: Dmitry Abramov
Build. 2, 24, Kashirskoe highway, Moscow, 115478; d.d.abramov@mail.ru
Received: 11.09.2015 Accepted: 05.11.2015

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз — наследственное заболевание (OMIM: 219700), связанное с нарушением ионного транспорта в эпителии и вызываемое мутациями в гене трансмембранного регулятора ионной проводимости (*CFTR*). Кодированный этим геном белок функционирует как цАМФ-зависимый хлорный канал, встроенный в мембрану клетки. Тип наследования муковисцидоза — аутосомно-рецессивный. Частота носительства мутаций, ассоциированных с развитием муковисцидоза, различается в зависимости от популяции и может варьировать от 1:90 для азиатских популяций до 1:29 для европейских популяций. В среднем с этим заболеванием среди европейцев рождается 1 человек на 2500–4500 населения.

Муковисцидоз — тяжелое системное заболевание, сопр-

вождающееся существенным снижением качества и продолжительности жизни. У больных МВ поражены многие органы, особенно выделяющие слизистый секрет: верхние и нижние дыхательные пути, поджелудочная железа, желчевыводящая система, кишечник, мужские половые органы, потовые железы. У некоторых больных при рождении возникает мекониальный илеус. У мужчин с МВ практически всегда отмечают азооспермию (отсутствие сперматозоидов в эякуляте) и бесплодие из-за двухсторонней аплазии семявыносящего протока (OMIM: 277180, Congenital bilateral absence of vas deferens — врожденное двухстороннее отсутствие семявыносящих протоков). Считается, что более 50 % мужчин, страдающих бесплодием и имеющих азооспермию или олигозооспермию тяжелой сте-

пени, являются носителями мутаций в гене *CFTR* [1, 2].

Фенилкетонурия (ФКУ) — наследственное заболевание обмена веществ, связанное с нарушением метаболизма аминокислот, главным образом фенилаланина. Без корректной терапии ФКУ сопровождается накоплением фенилаланина и его токсических продуктов в организме, что приводит к тяжелому поражению центральной нервной системы и нарушению умственного развития. Частота и распространенность заболевания варьирует от популяции к популяции. Самая высокая частота рождения ребенка с ФКУ отмечена среди отдельных цыганских популяций Словакии — 1 больной на 40 рождений, самая низкая — в Японии, менее 1 случая на 100 000 рождений. В России частота рождения ребенка с ФКУ составляет примерно 1 случай на 10 000 новорожденных, с частотой носительства по литературным данным примерно 1:50 [3, 4]. Заболевание связано с мутацией в гене *PAH*, кодирующем фенилаланингидроксилазу. Ген локализован на длинном плече хромосомы 12. На сегодняшний день в гене фенилаланингидроксилазы описано свыше 400 мутаций, частота и встречаемость которых характеризуется существенными межпопуляционными различиями, однако лишь несколько из них встречаются с частотой более 1 %. Среди жителей Европы и России наиболее распространена миссенс-мутация в 12-м экзоне гена *PAH* — R408W. Тип наследования фенилкетонурии — аутосомно-рецессивный [5].

В Российской Федерации с 2006 г. в рамках реализации приоритетного национального проекта «Здоровье» (приказ Минздравсоцразвития РФ от 22.03.2006 № 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания») проводят неонатальный скрининг на пять подобных заболеваний, включая муковисцидоз и фенилкетонурию. Кровь берут из пятки новорожденных и исследуют с применением биохимических и молекулярно-генетических методов диагностики. В ряде стран, учитывая высокую частоту носительства при сравнительно небольшом количестве мажорных мутаций в генах *CFTR* и *PAH*, скрининг на наиболее частые мутации предлагают проводить всем парам, планирующим деторождение.

Целью данного исследования было установление частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах *CFTR* и *PAH* у доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для настоящего исследования использовали коллекцию периферической крови 1000 здоровых индивидов (доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских). Выделение ДНК проводили из 0,1 мл периферической крови при помощи набора реагентов «ПРО-БА-ГС-ГЕНЕТИКА» компании «ДНК-Технология» (Москва). Методика выделения основана на лизисе биоматериала с последующими сорбцией ДНК на носителе, отмывке примесей, элюцией ДНК с сорбента. Полученные образцы ДНК сразу использовали для генотипирования либо хранили при -20°C . Концентрация ДНК, определенная на специализированном флуориметре Qubit (Invitrogen, США), составляла в среднем 50–100 мкг/мл.

Определение замен одиночных нуклеотидов проводили с использованием комплектов реагентов «Генетика наследственных заболеваний. Муковисцидоз Скрин», «Генетика наследственных заболеваний. Муковисцидоз — редкие мутации» и «Генетика наследственных заболеваний. Фенилкетонурия» компании «ДНК-Технология» (Москва). Принцип их действия основан на применении метода примыкающих проб (adjacent probes, kissing probes) [6, 7]. Указанные комплекты

реагентов позволяют выявлять 24 мутации в гене *CFTR*, ассоциированные с развитием муковисцидоза, и 16 мутаций в гене *PAH*, ассоциированные с развитием фенилкетонурии.

В каждый из комплектов реагентов входят амплификационные смеси для определения конкретной мутации. Каждая из смесей содержит праймеры, общие для дикого и мутантного вариантов нуклеотидной последовательности, один общий олигонуклеотид с гасителем флуоресценции и два сиквенс-специфичных олигонуклеотида (пробы), несущих различные флуорофоры. Олигонуклеотидные пробы, соответствующие тому или иному варианту последовательности, мечены различными флуорофорами, что позволяет определять оба варианта в одной пробирке.

При идентификации замен одиночных нуклеотидов проводили ПЦР, затем понижали температуру реакционной смеси для гибридизации полученной матрицы с олигонуклеотидными пробами. Определение генотипа выполняли после ПЦР и гибридизации путем измерения уровня флуоресценции в ходе температурной денатурации дуплексов олигонуклеотидов и полученных матриц. Данное измерение проходило в режиме реального времени, в результате были получены кривые плавления (рисунок). Если анализируемый образец содержал только один вариант нуклеотидной последовательности гена, т. е. был гомозиготен по данному полиморфизму, температура плавления для пробы, образующей совершенный дуплекс, была существенно выше, нежели для пробы, образующей несовершенный дуплекс. Если же анализировали гетерозиготный образец, содержащий оба варианта нуклеотидной последовательности, оба варианта проб могли образовать совершенный дуплекс, поэтому температуры их плавления были практически одинаковы. Применяемый подход выгодно отличается от большинства молекулярно-генетических методов определения полиморфизмов одиночных нуклеотидов, в т. ч. использующих технологию TaqMan. Определение генотипа происходит дважды, независимо по двум каналам флуоресценции, что существенно повышает надежность генотипирования и практически нереализуемо другими способами.

Полимеразную цепную реакцию и определение температуры плавления олигонуклеотидных проб проводили с помощью детектирующего амплификатора DPrime («ДНК-Технология», Россия). Использовали следующий температурный режим амплификации: 94°C — 10 с, 64°C — 30 с в течение 50 циклов. По завершении реакции амплификации реакционную смесь остужали до 25°C со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{с}$. Кривые плавления получали следующим образом: температуру реакции смеси повышали с 25°C до 75°C с шагом в 1°C , измеряя уровень флуоресценции на каждом шаге. В ходе выполнения работы применяли комплекс отечественного оборудования для автоматизирования основных этапов проведения исследований, что позволило проводить генотипирование до 100 образцов по 40 мутациям в день. В качестве подтверждающего метода проводили выборочное автоматическое секвенирование ДНК по Сэнгеру с применением автоматического секвенатора ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), использовали реактивы и рекомендации производителя. Во всех случаях были получены идентичные результаты генотипирования.

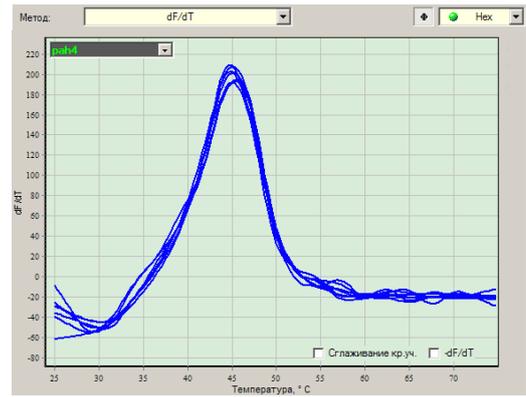
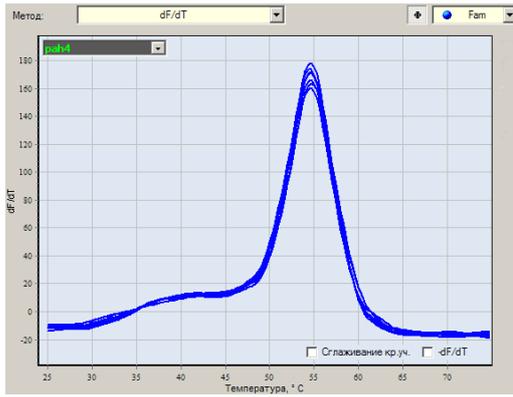
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные результаты по частотам встречаемости 29 мутаций в гене *CFTR* и 18 мутаций в гене *PAH* у 1000 здоровых индивидов (доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации) представлены в таблицах 1 и 2. При генотипировании 1000 доноров первичной кроводачи были обнаружены 29 носителей мутаций в гене *CFTR*, ассоциированных с развитием муковисцидоза (частота в выборке

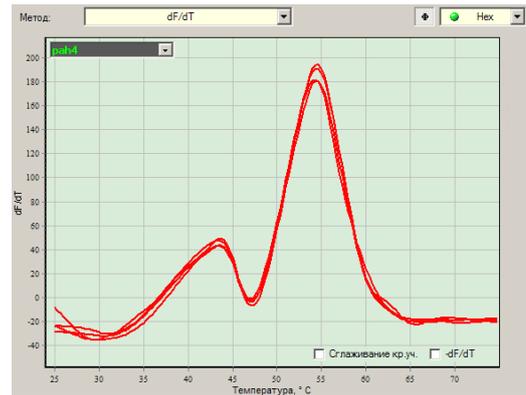
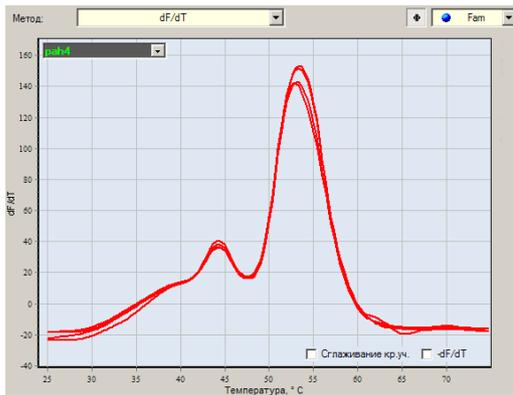
Флуорофор FAM

Флуорофор HEX

Гомозиготы
дикого типа



Гетерозиготы



Кривые плавления для различных вариантов генотипа, полученные при определении мутации R408W в гене *PAH*

Таблица 1. Выявленные гетерозиготы по мутациям в гене *CFTR* у 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских

Мутация в гене <i>CFTR</i>	Выявлено гетерозигот
F508del	15
R117H	4
N1303K	3
3849+10kbC>T	3
dele2,3(21kb)	1
E92K	1
L138ins	1
K598ins	1
W1282X	0
G542X	0
2143delT	0
2184insA	0
604insA	0
621+1G>T	0
S1196X	0
3821delT	0
3667insTCAA	0
R334W	0
394delTT	0
R553X	0
1677delTA	0
2183AA>G	0
2789+5G>A	0
3944delGT	0

Таблица 2. Выявленные гетерозиготы по мутациям в гене *PAH* у 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских

Мутация в гене <i>PAH</i>	Выявлено гетерозигот
R408W	24
R158Q	2
R261Q	2
L48S	1
Y414C	1
IVS4+5G>T	1
IVS10nt546	1
G188D	0
R252W	0
R261X	0
E280K	0
P281L	0
F331S	0
c.836C>T	0
IVS2+5G>C	0
IVS12+1G>A	0

составила 2,9 %, или 1:34), и 32 носителя мутаций в гене *PAH*, ассоциированных с развитием фенилкетонурии (частота в выборке — 3,2 %, или 1:31).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из 29 доноров первичной кроводачи, для которых были выявлены гетерозиготы по мутациям в гене *CFTR*, 19 были носите-