

Впервые описанный патогенный вариант с.2617G>T гена *CFTR*

Мельяновская Ю. Л., Кондратьева Е. И.

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Научно-исследовательский клинический институт детства Министерства здравоохранения Московской области», (ул. Коминтерна, 24А, с1, Московская область, Мытищи, 115093, Россия)
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н. П. Бочкова», (ул. Москворечье, 1, Москва, 115522, Россия)

Резюме

Для переписки:

Мельяновская
Юлия Леонидовна
e-mail:
melcat@mail.ru

Муковисцидоз (МВ) заболевание, обусловленное патогенными вариантами в гене *CFTR*. Наибольшую трудность в настоящий момент представляет оценка вклада в развитие заболевания редких и ранее не идентифицированных генетических варианта (мутаций), мутаций с неопределенным клиническим значением, а также определение связи генотип-фенотип. Необходимы дополнительные методы диагностики в связи с большим числом пациентов с пограничными значениями потовой пробы.

Цель исследования: изучить патогенность вновь выявленного варианта нуклеотидной последовательности гена *CFTR* на основе оценки функциональной активности эпителиальных ионных каналов (ENaC, CFTR, CaCCs).

Материалы и методы: данные истории болезни, метод определения разницы кишечных потенциалов (ОРКП).

Результаты: у пациента отмечено тяжелое течение заболевания. Положительные результаты потовой пробы, низкая панкреатическая эластаза кала. Методом ОРКП было показано отсутствие функции хлорного канала.

Заключение: впервые описаны клинические особенности пациента с генетическим вариантом с.2617G>T в генотипе. Результаты проведенного обследования, клиническое течение заболевания соответствуют тяжелому течению заболевания. Дополнительное применение метода ОРКП подтвердило отсутствие функции CFTR канала у пациента-носителя данного варианта гена *CFTR*.

Ключевые слова: муковисцидоз; метод определения разницы кишечных потенциалов; редкий вариант *CFTR*

EDN: ADFUCV



The first described pathogenic variant c.2617G>T of the *CFTR* gene

Yu. L. Melyanovskaya, E. I. Kondratyeva

Research Clinical Institute of Childhood of the Ministry of Health of the Moscow Region, (24A, build. 1, st. Komintern, Mytishchi, Moscow region, 115093, Russia)

Research Center for Medical Genetics, (1, st. Moskvorechye, Moscow, 115522, Russia)

Summary

Cystic fibrosis (CF) is a disease caused by pathogenic variants in the *CFTR* gene. The greatest difficulty at the moment is assessing the contribution to the development of the disease of rare and previously unidentified genetic variants (mutations), mutations of uncertain clinical significance, as well as determining the genotype-phenotype relationship. Additional diagnostic methods are needed due to the large number of patients with borderline sweat test values.

Purpose of the study: to study the pathogenicity of a newly identified variant of the nucleotide sequence of the *CFTR* gene based on assessing the functional activity of epithelial ion channels (ENaC, *CFTR*, CaCCs).

Materials and methods: medical history data, method intestinal current measurement (ICM). Results: the patient had a severe course of the disease. Positive sweat test results, low fecal pancreatic elastase. The ICM method showed the absence of chlorine channel function.

Conclusion: For the first time, the clinical features of a patient with the c.2617G>T genetic variant in the genotype have been described. The results of the examination and the clinical course of the disease correspond to the severe course of the disease. Additional use of the ICM method confirmed the absence of *CFTR* channel function in a patient carrier of this variant of the *CFTR* gene.

Corresponding author:

Yulia L. Melyanovskaya,
e-mail:
melcat@mail.ru

Key words: cystic fibrosis; method for intestinal current measurement; rare *CFTR* variant

Муковисцидоз (МВ) или кистозный фиброз – аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное патогенными вариантами в гене муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (*CFTR*) [1]. Продукт гена представляет собой белок, который формирует ионный канал, переносящий ионы хлора через клеточную мембрану [2]. Около 85 000 людей в мире страдают от МВ. Частота заболевания составляет 1:6000 новорожденных в мире [3] и 1:10 000 – в РФ [4, 5]. По данным национального регистра МВ за 2021 год средний возраст смерти составляет – $23,7 \pm 10,3$ лет, средний возраст пациентов – $14,0 \pm 9,8$ лет. Заболевание рассматривается, как модель ускоренного старения [6].

Значительные достижения в развитии методов и технологий молекулярно-генетического тестирования позволяют в большинстве случаев успешно осуществлять молекулярно-генетическую диагностику [7]. В настоящее время описано 2114 мутаций или вариантов нуклеотидной последовательности гена *CFTR*. По состоянию на 07 апреля 2023 года на веб-сайте международного проекта CFTR2 (<https://cftr2.org>) представлено 719 патогенных генетических вариантов нуклеотидной последовательности гена *CFTR*. Для РФ характерна генетическая гетерогенность вариантов гена *CFTR* [8], которая требует дальнейшего изучения в связи с расширением современных возможностей ДНК диагностики (секвенирование и метод NGS) и выявлением новых генетических вариантов, а также и многонационального состава населения страны.

Наибольшую трудность в настоящий момент представляет оценка вклада в развитие заболевания редких и ранее не

идентифицированных генетических варианта (мутаций), мутаций с неопределенным клиническим значением, а также определение связи генотип-фенотип. Золотым стандартом диагностики МВ до настоящего времени остается потовая проба [9]. Однако иногда у пациентов с МВ может наблюдаться отрицательный результат потовой пробы, в частности у гомо- или гетерозиготных носителей миссенс – вариантов гена *CFTR*, при которых частично сохраняется функция хлорного канала (например, 3849+10kbC>T) [10]. С другой стороны, и ложноположительный тест можно получить у пациентов с целым рядом заболеваний. Необходимы дополнительные методы диагностики в связи с большим числом пациентов с пограничными значениями потовой пробы.

В качестве такого метода рассматривают применение метода «Определения разницы кишечных потенциалов» (ОРКП) [11, 12]. Ранние описания пациентов с МВ основаны на клинических фенотипах и результатах потового теста и не включают диагностические данные ОРКП по определению функциональной активности эпителиальных ионных каналов, прежде всего хлорного *CFTR* канала. Дополнительный анализ дисфункции *CFTR* канала с помощью ОРКП в сочетании методов, характеризующих функцию *CFTR*, представляется необходимым диагностическим исследованием больных с легким течением болезни или моносимптомным фенотипом.

Целью исследования было изучить патогенность вновь выявленного варианта нуклеотидной последовательности гена *CFTR* на основе оценки функциональной активности эпителиальных ионных каналов (ENaC, *CFTR*, CaCCs).

Материалы и методы

Материалом исследования явились данные амбулаторной карты пациента, результаты ДНК диагностики и кишечный биоптат пациента: 2019 г.р. с диагнозом – муковисцидоз (E84.8), генотип c.1521_1523del p.Phe508del (F508del) / c.2617G>T p.(Glu873*). Диагноз устанавливали согласно клиническим рекомендациям [13]. Пациентка наблюдается в ГБУЗ Московской

области «НИКИ детства Минздрава Московской области».

Забор ректальных биоптатов проводился на оборудовании Olympus Disposable EndoTherapy EndoJaw Biopsy forceps (model #FB-23OU).

Метод Определения разницы кишечных потенциалов проводился согласно европейским стандартным операционным проце-

$\Delta ISC, \mu A/cm^2$	Амилорид (натриевые ENaC каналы)	Форсколин (хлорные CFTR каналы)	Гистамин (кальциевые CaCCs каналы)
Биоптат № 1	-18,5	2,5	9,5
Биоптат № 2	-16,5	1	9
Биоптат № 3	-3	1	3
M±m больного	-12,67±5,96	1,5±0,61	9,17±0,2
F508del/F508del	-15,7±3,51	3,33±0,63	17,83±3,57
Контрольная группа	-7,12±1,34	26,67±15,60	117,37±59,94

Таблица 1.
Показатели плотности тока короткого замыкания ($\mu A/cm^2$) при введении стимуляторов у пациента, несущего в генотипе вариант с.2617G>T

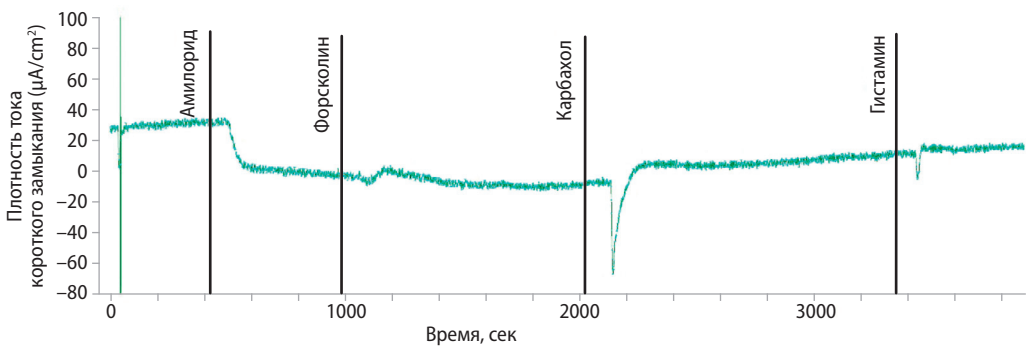


Рисунок 1
Метод ОРКП. Пациент с генотипом F508del/c.2617G>T
Примечание:
При введении амилорида (натриевые ENaC каналы) происходило снижение тока короткого замыкания, ответа на форсколин (хлорные CFTR каналы) нет, а на добавление гистамина (кальциевые CaCCs каналы) наблюдалось изменение тока короткого замыкания в отрицательную сторону.

дурам V2.7_26.10.11 [14]. Для проведения исследования получено разрешение пациента. Исследование и форма информированного согласия одобрены Этическим комитетом

ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н. П. Бочкова» Минобрнауки России 15.10.18 (председатель – профессор Л. Ф. Курило).

Результаты

Обследован пациент 2019 г.р (пол -женский) с диагнозом: Муковисцидоз, смешанная форма (E84.8), среднетяжелое течение. Хронический бронхит. Микробиологический диагноз: *Stenotrophomonas maltophilia*. Хроническая панкреатическая недостаточность. Генетический диагноз: F508del/c.2617G>T.
Ребенок от 2 беременности, 1 родов, масса при рождении 2950 г, рост 49 см, оценка по Апгар 8/9 баллов. С рождения вздутие живота, частый стул. На грудном вскармливании по требованию, стул после каждого приема пищи. В возрасте 2 недель семья информирована о положительном результате неонатального скрининга (ИРТ 1–119 нг/мл (норма до 70 нг/мл), ИРТ 2 150 нг/мл (норма до 40 нг/мл)), проведена потовая проба. Потовая проба на аппарате Нанодакт – проводимость

пота эквивалента 100 ммоль/л (норма до 50 ммоль/л), результат положительный. Клинические проявления заболевания: с рождения жирный стул после каждого приема пищи, дефицит веса. Результаты анализа кала на панкреатическую эластазу – <50 мкг/г (норма более 200 мкг/г). Проведено молекулярно – генетическое исследование в 2 этапа: при поиске частых мутаций найден вариант F508del, при проведении секвенирования найден вариант с.2617G>T, установлен генотип F508del/c.2617G>T.
Учитывая генетический диагноз компаунд-гетерозиготы по F508del/c.2617G>T, наличие ранее не описанного варианта с.2617G>T ребенку было проведено исследование методом определения разницы кишечных потенциалов для изучения степени нарушения работы хлорного CFTR канала.

Результаты ОРКП показали (табл. 1, рис. 1), что плотность тока короткого замыкания в ответ на введение амилорида (натриевые ENaC каналы) составила $-12,67 \pm 5,96 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Изменение ΔI_{sc} в ответ на введение форсколина (хлорные CFTR каналы) составило $1,5 \pm 0,61 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2$, что подтверждало отсутствие функции канала. В ответ на введение гистамина

(кальциевые CaCCs каналы) ΔI_{sc} изменяется в отрицательную сторону, что отражает приток ионов калия в клетки. При этом плотность тока составила $9,17 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

Результаты ОРКП свидетельствуют об отсутствии функции канала CFTR и подтверждают патогенное значение данной мутации и диагноз муковисцидоз.

Обсуждение

Патогенный вариант $c.2617G>T$ p.(Glu873*) гена *CFTR* приводит к образованию преждевременного стоп-кодона из-за замены нуклеотида в положении 2617 (15 экзон). Согласно регистру пациентов, с муковисцидозом РФ аллельная частота варианта составляет 0,01% [15]. Вариант не описан в международных базах данных. Его аллельная частота в мире не известна. И впервые установлена в рамках регистра пациентов с муковисцидозом в РФ.

Методам ОРКП было показано, что вариант гена *CFTR* $c.2617G>T$ является патогенным, «тяжелым» и приводит к утрате рабочего белка CFTR в большей степени, чем у пациентов с генотипом F508del/F508del (II класс мутаций). Изменение тока короткого замыкания (ΔISC) на амилорид у пациента с вариантом $c.2617G>T$ соотносилось с группой F508del/F508del и было более выраженным, чем в контрольной группе. Данный факт свидетельствует о том, что натриевый канал работает активнее, чем в контрольной группе, скорее

всего это носит компенсаторный характер. Ответ (изменение ΔISC) на добавление форсколина (стимуляция хлорного канала) был ниже, чем в группе F508del/F508del и контрольной группе, соответственно функция хлорного канала более низкой, чем у пациентов – гомозигот по генотипу F508del/F508del. Ответ на гистамин (стимуляция кальциевого канала) также был ниже, чем в группах контроля и сравнения. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что функция кальциевых каналов у пациента с вариантом $c.2617G>T$ в генотипе снижена, что свидетельствовало о нарушении проводимости ионов хлора по альтернативному канал.

В настоящее время результаты теста ОРКП рекомендуется вносить в европейскую базу данных пациентов с муковисцидозом. (<https://www.ecfs.eu/projects/ecfs-patient-registry/guidelines>), чтобы при выявлении редких мутаций в разных странах врачи могли ориентироваться на доказательства их патогенного значения.

Заключение

Впервые описаны клинические особенности пациента с генетическим вариантом $c.2617G>T$ в генотипе. Результаты проведенного обследования, клиническое течение заболевания со-

ответствуют тяжелому течению заболевания. Дополнительное применение метода ОРКП подтвердило отсутствие функции CFTR канала у пациента-носителя данного варианта гена *CFTR*.

Мельяновская Юлия Леонидовна, научный сотрудник; научный сотрудник научно-клинический отдел муковисцидоза
Кондратьева Елена Ивановна, профессор, д.м.н., заместитель директора по научной работе; руководитель научно-клинического отдела муковисцидоза; Заведующая кафедрой Генетики болезней дыхательной системы Института высшего и дополнительного профессионального образования

Yulia L. Melyanovskaya, researcher; researcher, research and clinical department of cystic fibrosis; ORCID: 0000-0002-8814-5532
Elena I. Kondratyeva, professor, doctor of medical sciences, deputy director for scientific work; Head of the Scientific and Clinical Department of Cystic Fibrosis, Head of the Department of Genetics of Respiratory System Diseases, Institute of Higher and Additional Professional Education; ORCID: 0000-0001-6395-0407

Литература | References

1. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 2020 May;109(5):893–899. doi: 10.1111/apa.15155.
2. Mall M.A., Galletta L.J. Targeting ion channels in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2015 Sep;14(5):561–70. doi: 10.1016/j.jcf.2015.06.002.
3. Castellani C., Duff A.J.A., Bell S.C. et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros.* 2018 Mar;17(2):153–178. doi: 10.1016/j.jcf.2018.02.006.
4. Sherman V., Kondratyeva E., Kashirskaya N., Voronkova A., Nikonova V., Zhekaite E., Kutsev S. Newborn Screening for Cystic Fibrosis in Russia: A Catalyst for Improved Care. *Int J Neonatal Screen.* 2020 Apr 14;6(2):34. doi: 10.3390/ijns6020034.
5. Sherman V.D., Kutsev S.I., Izhevskaya V.L., Kondratyeva E.I. Effectiveness of neonatal screening for cystic fibrosis in the Russian Federation. *Vopr. prakt. pediatrii (Clinical Practice in Pediatrics)*. 2022; 17(3): 12–19. (In Russ.) doi: 10.20953/1817–7646–2022–3–12–19. Шерман В.Д., Куцев С.И., Ижевская В.Л. Кондратьева Е.И. Оценка эффективности неонатального скрининга на муковисцидоз в Российской Федерации. Вопросы практической педиатрии. 2022; 17(3): 12–19. doi: 10.20953/1817–7646–2022–3–12–19.
6. Kass R.S. The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease. *J Clin Invest.* 2005 Aug;115(8):1986–9. doi: 10.1172/JCI26011.
7. Katsanis S.H., Katsanis N. Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. *Nat Rev Genet.* 2013 Jun;14(6):415–26. doi: 10.1038/nrg3493.
8. Petrova N.V., Kashirskaya N.Y., Vasilyeva T.A. et al. Analysis of *CFTR* Mutation Spectrum in Ethnic Russian Cystic Fibrosis Patients. *Genes (Basel)*. 2020 May 15;11(5):554. doi: 10.3390/genes11050554.
9. Servidoni M.F., Gomez C.C.S., Marson F.A.L., Toro A.A.D.C., Ribeiro M.Â.G.O., Ribeiro J.D., Ribeiro A.F.; Grupo Colaborativo de Estudos em Fibrose Cística. Sweat test and cystic fibrosis: overview of test performance at public and private centers in the state of São Paulo, Brazil. *J Bras Pneumol.* 2017 Mar-Apr;43(2):121–128. doi: 10.1590/S1806–37562016000000076.
10. 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 Nov;26(4):135–53. PMID: 16648884
11. Graeber S.Y., Vitzthum C., Mall M.A. Potential of Intestinal Current Measurement for Personalized Treatment of Patients with Cystic Fibrosis. *J Pers Med.* 2021 May 8;11(5):384. doi: 10.3390/jpm11050384.
12. Minso R., Schulz A., Dopfer C. et al. Intestinal current measurement and nasal potential difference to make a diagnosis of cases with inconclusive *CFTR* genetics and sweat test. *BMJ Open Respir Res.* 2020 Oct;7(1): e000736. doi: 10.1136/bmjresp-2020–000736.
13. Union of Pediatricians of Russia; Association of Medical Genetics; Russian Respiratory Society; Russian Transplant Society; Association of Children's Doctors of the Moscow Region. [Cystic fibrosis. Clinical guidelines]. 2021. ID: 372. (in Russ.) Клинические рекомендации «Кистозный фиброз», 2021.
14. Derichs N., Sanz J., Von Kanel T., Stolpe C., Zapf A., Tümmler B., Gallati S., Ballmann M. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax.* 2010 Jul;65(7):594–9. doi: 10.1136/thx.2009.125088.
15. Register of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation 2021 / Edd S.A. Krasovsky, M.A. Starinova, A. Yu. Voronkova, E.L. Amelina, N. Yu. Kashirskaya, E.I. Kondratyeva, L.P. Nazarenko. Moscow. Publishing House “MEDPRAKTIKA-M”, 2023, 95 p. (in Russ.) Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2021 год./ Под редакцией С. А. Красовского, М. А. Стариновой, А. Ю. Воронковой, Е. Л. Амелиной, Н. Ю. Каширской, Е. И. Кондратьевой, Л. П. Назаренко – М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2023, 95 с.