УДК 616-053.2-056.7-07 DOI: 10.15372/SSMJ20180202

ПОИСК ГЕННЫХ МУТАЦИЙ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ У ДЕТЕЙ МЕТОДОМ АНАЛИЗА КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ

Максим Юрьевич ДОННИКОВ, Виталий Витальевич МЕЩЕРЯКОВ

Сургутский государственный университет
628412, г. Сургут, просп. Ленина, 1

Метод анализа кривых плавления высокого разрешения (HRMA) является перспективным для генотипирования и предварительного сканирования нуклеотидной последовательности гена трансмембранного регулятора кистозного фиброза (*CFTR*). В России данный метод пока не нашел практического применения. **Целью** работы явился анализ эффективности использования метода HRMA на первом этапе молекулярно-генетической диагностики муковисцидоза у детей. **Материал и методы.** Представлены результаты валидационного молекулярно-генетического исследования с помощью метода HRMA для 43 контрольных образцов ДНК, полученных у детей с подтвержденным диагнозом «муковисцидоз» и известными мутациями в гене *CFTR*. **Результаты.** Специфичность молекулярно-генетической диагностики муковисцидоза с осуществлением метода HRMA на первом ее этапе составила 100 %, чувствительность – 97,3 %. В двух образцах с протяженной делецией во 2-м и 3-м экзонах в гетерозиготном состоянии паттерн плавления был идентичен паттерну для «дикого» типа. **Заключение.** Высокая эффективность метода HRMA обосновывает возможность его внедрения в практику на первом этапе молекулярно-генетической диагностики муковисцидоза у детей для сокращения времени на проведение исследования, что в абсолютном большинстве случаев позволяет установить тип мутации в гене *CFTR*. Протяженные делеции/инсерции и сложные перестройки в гетерозиготном состоянии не выявляются с помощью метода HRM. Для определения подобного типа мутаций требуется методика мультиплексной амплификации проб с помощью лигирования.

Ключевые слова: молекулярная диагностика, анализ кривых плавления высокого разрешения, муковисцидоз, дети.

Муковисцидоз (МВ) – тяжелое моногенное орфанное наследственное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования [2, 4]. Ген трансмембранного регулятора кистозного фиброза (*CFTR*), ответственный за развитие МВ, был клонирован в 1989 г. [16]. Это стало точкой отсчета для развития международного проекта Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC), основной задачей которого стал поиск мутаций в гене *CFTR* [23, 26]. Данный ген расположен на 7-й хромосоме в регионе 7q31.2 с протяженностью 250 000 пар нуклеотидов, состоит из 27 белок-кодирующих частей (экзонов) и является одним из самым часто мутирующих в геноме человека [9]. К настоящему времени в регулярно обновляемой базе данных CFGAC (www.genet.sickkids.on.ca/cftr) имеется информация о более чем 2000 мутаций в гене *CFTR*, локализованных на протяжении всего гена [7]. По данным Национального регистра МВ 2015 г., в России выявлено 155 мутантных аллелей гена *CFTR* [2], большинство из которых весьма редки (частота менее 1 %). Самыми частыми мутациями (более 2 %) в РФ являются F508del (52 % общего числа мутантных аллелей в объединенной выборке пациентов с МВ), CFTRdele2,3 (5,68 %), E92K (2,43 %), 3849+10kbC>T (2,10 %). Все остальные мутации редкие либо вообще уникальные для пациентов с МВ [1].

Согласно рекомендациям Европейского консенсуса по МВ, диагностический метод должен выявлять хотя бы одну клинически значимую мутацию в гене *CFTR* не менее чем у 90 % пациентов с МВ [12]. Использование ограниченной панели мутаций обеспечивает невысокую диагностическую чувствительность в генетически гетерогенных популяциях, к которым относится и население России [2]. Стратегия молекулярной диагностики МВ, рекомендованная Национальным консенсусом по МВ, включает несколько последовательных этапов [2]. На первом этапе проводится поиск мутаций, наиболее часто встречающихся в исследуемой популяции, на втором – более редких мутаций с использованием

Донников Максим Юрьевич *– аспирант кафедры детских болезней медицинского института,*
e-mail: donnikov@gmail.com
Мещеряков В.В. *– д.м.н., проф., зав. кафедрой детских болезней медицинского института,*
e-mail: maryvitaly@yandex.ru

технологий секвенирования по Сэнгеру или нового поколения (next generation sequencing, NGS), на третьем этапе выявляют протяженные перестройки в последовательности гена (делеции/дупликации) методом мультиплексной амплификации проб с помощью лигирования (MLPA) [27]. Несмотря на наличие современных генетических лабораторий в России, позволяющих выполнять исчерпывающий анализ гена *CFTR*, быстрота проведения и доступность подобных исследований на удаленных территориях минимальна, что обусловлено как их дороговизной, так и позицией врачей-генетиков, отводящих молекулярно-генетической диагностике МВ вспомогательную роль.

Установленный генотип может служить независимым фактором прогноза продолжительности жизни больного МВ [2]. Кроме того, с появлением таргетной терапии МВ точное определение молекулярного дефекта в гене *CFTR* становится актуальным как никогда [11]. Несмотря на настоятельные рекомендации вести поиск генетического дефекта максимально быстро после получения положительного ретеста в рамках программы неонатального скрининга на МВ и положительного потового теста [2, 12], для многих пациентов из регионов РФ определение мутаций затягивается на месяцы. Это обусловлено в основном проблемами экономической доступности теста и временем выполнения на базе федеральных медико-генетических центров. Так, поиск частых мутаций занимает до трех недель, и еще дольше проводится секвенирование. Несмотря на развитие технологий секвенирования нового поколения NGS, их востребованность в клинической практике все еще ограничена диапазоном научных (по большей части ретроспективных) исследований [22]. Методы NGS достаточно ресурсозатратны, дороги в плане материально-технического обеспечения и требуют проведения корректного биоинформационного анализа. Более того, ни один из методов NGS до настоящего времени не сертифицирован на территории России для клинического применения. Поэтому в ближайшей перспективе их использование остается прерогативой крупных научных центров.

Между тем наличие минимума современного лабораторного оборудования в виде ПЦР-амплификатора с функцией анализа кривых плавления и генетического анализатора, позволяющего проводить классическое секвенирование нуклеотидной последовательности по методу Сэнгера, дает возможность в короткий срок наладить быструю молекулярно-генетическую диагностику МВ даже на региональном уровне. Известный с начала 2000-х годов метод плавления высокого разрешения (high resolution melting, HRM) является достаточно быстрым и высокопроизводительным для предварительного сканирования мутаций и генотипирования в любом интересующем исследователя регионе генома [28]. HRM представляет собой нетрудоемкую и относительно быструю (в сравнении с секвенированием) методику сканирования неизвестных мутаций и генотипирования известных мутаций с минимальной вероятностью перекрестной контаминации ампликонов за счет закрытого формата постановки (пробирка с реакционной смесью не открывается после запуска реакции амплификации) [10, 17, 20].

Принцип HRM-анализа основан на мониторинге изменения интенсивности флуоресценции реакционной смеси в пробирке с двуцепочечной ДНК (дцДНК) ампликона, наработанного в ходе ПЦР. Контролируемый медленный нагрев (плавление) в термоблоке ПЦР-амплификатора приводит к переходу дцДНК в одноцепочечную форму и постепенному снижению уровня флуоресцентного сигнала от красителя, преимущественно связанного с дцДНК. Кривые плавления в виде S-образных кривых подвергаются компьютерной обработке с помощью специализированного программного обеспечения. В результате оператор получает нормализованные кривые, визуальный анализ которых позволяет дифференцировать образец ДНК с мутацией от контрольного образца. Формы (паттерны) кривых плавления строго специфичны для отдельных генотипов [29]. Так, до 93 % гетерозиготных мутаций в гене *CFTR* генерируют уникальные паттерны кривых плавления [21]. Имеется множество публикаций, документирующих успешное использование метода HRM для сканирования мутаций и генотипирования [8, 13, 21, 25]. Установлено, что специфичность и чувствительность методики приближается к 100 % для продуктов амплификации не более 400 пар оснований [15].

Активному использованию метода HRM в практике молекулярно-генетических научных лабораторий способствовало три фактора – появление коммерческих автоматизированных амплификаторов с точной регулировкой температуры, разработка коммерчески доступных наборов, содержащих реакционную смесь с оптимальным соотношением всех компонентов ПЦР, оптимизированных для HRM, а также разработка специализированного программного обеспечения, позволяющего в автоматическом режиме обсчитывать данные графиков плавления. В России данный метод пока не нашел практического применения для молекулярно-генетической диагностики МВ.

Целью работы явился анализ эффективности использования метода плавления высокого разрешения на первом этапе молекулярно-генетической диагностики муковисцидоза у детей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Осуществлено сплошное когортное одномоментное исследование. В исследуемую группу вошли образцы геномной ДНК (гДНК), полученные от 38 зарегистрированных на территории ХМАО – Югры пациентов с подтвержденным диагнозом МВ и 5 носителей патологических аллелей с известными мутациями в гене *CFTR*, выявленными ранее методами секвенирования (по Сэнгеру и NGS) на базе федерального медико-генетического центра НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта в 2014–2016 гг. Генетическая характеристика используемых образцов приведена в таблице.

Выделение гДНК проводили колоночным методом из периферической венозной крови с

Таблица

Характеристика исследуемых мутаций в гене CFTR

Мутации	Экзон	Генотип		Тип мутации		Класс SNP	Аллельная частота, %
		Номенклатура HGVS	Традиционная номенклатура				
1	1	c.43delC(p.Leu15PhefsX10)	175delC	delC	Сдвиг рамки	–	1,3
2	2	c.91C>T(p.Arg31Cys)	R31C	C>T	Миссенс	I	2,5
3	2, 3	c.54-5940_273+10250del21kb (p.Ser18ArgfsX16)	CFTRdele2, 3	del exx2,3	Сдвиг рамки	–	2,5
4	3	c.262_263delTT (p.Leu88IlefsX22)	394delTT	delTT	Сдвиг рамки	–	1,3
5		c.252T>A (p.Tyr84X)	–	T>A	Нонсенс	IV	1,3
6	4	c.274G>A(p.Glu92Lys)	E92K	G>A	Миссенс	I	5,1
7		c.412_413insACT (p.Leu137_Leu138insThr)	L138ins	insACT	Миссенс	–	2,5
8		c.489+1G>T	621+1G>T	G>T	Дефект сплайсинга	II	2,5
9	6	c.650A>G(p.Glu217Gly)	E217G	A>G	Миссенс	I	3,8
10		c.653T>A(p.Leu218X)	L218X	T>A	Нонсенс	IV	1,3
11		c.698T>G(p.Leu233Arg)	–	T>G	Миссенс	II	1,3
12	7	c.831G>A(p.Trp277X)	–	G>A	Нонсенс	I	1,3
13	8	c.1040G>A(p.Arg347His)	R347H	G>A	Миссенс	I	1,3
14	11	c.1397C>G(p.Ser466X)	S466X(TAG)	C>G	Нонсенс	III	2,5
15		c.1399C>T (p.Leu467Phe)	1531C/T (L467F)	C>T	Миссенс	I	1,3
16		c.1521_1523delCTT: p.Phe508del	[delta]F508	del CTT	Миссенс	–	41,8
17		c.1526G>A(p.Gly509Asp)	–	G>A	Миссенс	I	1,3
18		c.1545_1546delTA(p. Tyr515X)	1677delTA	delTA	Нонсенс	–	3,8
19		c.1580insA(p.Glu528ArgfsX39)	–	insA	Сдвиг рамки	–	1,3
20	12	c.1624G>T(p.Gly542X)	G542X	G>T	Нонсенс	II	1,3
21	13	c.1704G>T(p.Leu568Phe)	L568F	G>T	Миссенс	II	1,3
22	14	c.1845_1846delAA (p.Lys615fs)	–	delAA	Сдвиг рамки	–	1,3
23		c.2002C>T (p.Arg668Cys)	R668C	C>T	Миссенс	I	1,3
24		c.2012delT(p.Leu671X)	2143delT	delT	Нонсенс	–	1,3
25	20	c.3196C>T(p.Arg1066Cys)	R1066C	C>T	Миссенс	I	2,5
26		c.3208C>T(p.Arg1070Trp)	R1070W	C>T	Миссенс	I	1,3
27		c.3209G>A(p.Arg1070Gln)	R1070Q	G>A	Миссенс	I	2,5
28	22	c.3485G>T (p.Arg1162Leu)	3617G/T	G>T	Миссенс	II	1,3
29		c.3705T>G(p.Ser1235Arg)	S1235R	T<G	Миссенс	II	1,3
30	23	c.3846G>A(p.Trp1282X)	W1282X	G>A	Нонсенс	I	1,3
31	24	c.3909 C>G(p.Asn1303Lys)	N1303K	C>G	Миссенс	III	1,3
32		c.3929G>A (p.Trp1310X)	W1310X	G>A	Нонсенс	I	1,3
33	25	c.3983 T>A (p.Ile1328Lys)	–	T>A	Миссенс	IV	1,3

использованием набора «QIAamp DNA Blood Mini Kit» (кат. № 51104, Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Исследование проводилась по протоколу, описанному M.P. Audrezet с соавт. [5], с изменениями в нуклеотидных последовательностях праймеров для ПЦР. Всего для проведения ПЦР использовалось 32 пары олигонуклеотидных праймеров, специфичных для каждого из 27 экзонов гена *CFTR*. Для экзонов 1–13, 15–19, 21–27 (нумерация экзонов в соответствии с номенклатурой Human Genome Variety Society) использовали одну пару праймеров; для экзона 14 вследствие его протяженности – 5 пар; для экзона 20 – две пары праймеров. Параметры ПЦР в соответствии с рекомендациями производителя набора: объем реакции 10 мкл, 5 мкл Precision Melt supermix (кат. № 1725110, Bio-Rad, США), 2 мкМ смеси прямого и обратного праймеров, 10 нг гДНК. ПЦР с последующим HRM-анализом проводились на автоматическом амплификаторе CFX96 (Bio-Rad), параметры термоциклирования: 94 °C – 2 мин – 1 цикл; 94 °C – 30 с, 62 °C – 30 с – 45 циклов. Все пары праймеров тестировались в трех повторностях, с обязательным проведением отрицательного контроля. Параметры плавления: диапазон температур 60–98 °C, скорость плавления 0,1 °C/с. Анализ кривых плавления проводился с помощью специализированного программного обеспечения (ПО) Precision Melt Analysis (Bio-Rad, США). Воспроизводимость полученных кривых плавления визуализировалась используемым ПО в виде кластера кривых с приемлемыми значениями доверительного интервала (Percent Confidence) > 95 %.

Последовательности праймеров для HRM-анализа и секвенирования были адаптированы из работ [5, 6] и на основе редизайна (ПО Primer3 Plus). Секвенирование отдельных экзонов гена *CFTR* по методике Сэнгера проводилось с помощью набора DTCS Quick Start kit (кат. № 608120, Beckman-Coulter, США) на генетическом анализаторе GenomeLab GeXP (Beckman-Coulter, США). Для каждого экзона выполняли секвенирование с двух праймеров (прямого и обратного) с целью получения воспроизводимой последовательности нуклеотидов (особенно критично для детекции гетерозиготных делеций/инсерций). ПЦР-продукт очищали с помощью набора Agencourt AMPure XP kit (кат. № A63880, Beckman-Coulter), для очистки секвенирующей реакции использовали набор Agencourt CleanSEQ kit (кат. № A29151).

Диагностическую эффективность метода HRM оценивали расчетом операционных характеристик диагностического теста – чувствительности и специфичности [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Алгоритм диагностики МВ, принятый в Российской Федерации, включает в себя последовательное определение уровней иммунореактивного трипсиногена в сухих пятнах крови и выполнение потового теста при положительном ретесте иммунореактивного трипсиногена [2]. Молекулярно-генетическая диагностика является завершающим этапом, и компромисс в виде тестирования каждого образца гДНК при подозрении на МВ в панели частых мутаций (от 8 до 25 в России) заключается в выявлении в большинстве случаев только одной мутации, тогда как идентификация второй мутации методом секвенирования откладывается на неопределенный срок [19]. Семейство достаточно трудоемких методик секвенирования второго поколения практически невозможно реализовать в полном масштабе и с реальной пользой для клинической медицины на уровне региональной лаборатории вследствие малого объема исследований, дороговизны реагентов и расходных материалов.

Поэтому на первом этапе молекулярно-генетического анализа МВ в клинической практике нами апробирован метод HRM для сканирования мутаций в экзонах и экзон-интронных границах гена *CFTR*. Основное достоинство используемой технологии заключается в том, что только при выявлении отклонений в кривых плавления по сравнению с контрольными образцами целесообразно проводить «селективное» классическое секвенирование по Сэнгеру отдельных экзонов, а не всего гена, что радикально ускоряет весь процесс молекулярной диагностики.

Для валидации методики HRM в качестве предварительного анализа последовательностей экзонов и экзон-интронных границ гена *CFTR* нами были протестированы в трех повторах 43 контрольных образца гДНК, содержащих 33 различные мутации, локализованные в разных экзонах гена, а также в качестве контролей – 5 образцов гДНК дикого типа (без выявленных мутаций). Наличие или отсутствие мутаций у контрольных образцов гДНК предварительно определено методом прямого секвенирования нуклеотидной последовательности гена *CFTR* по Сэнгеру и NGS на базе федерального медико-генетического центра. Число мутантных аллелей исследуемой выборки составило: $21 \times a + 5 \times b + 12 \times c + 5 \times d = 79$, где $a = 2$ – образцы компаунд-гетерозигот с двумя мутациями, $b = 2$ – с гомозиготной мутацией, $c = 1$ – с одной выявленной мутацией, $d = 3$ – с тремя мутациями. Охарактеризованный по мутациям банк образцов гДНК стал основой для валидации новой

методики HRM для сканирования мутаций в гене *CFTR* (см. таблицу).

Пробоподготовка состояла из стандартной ПЦР с интеркалирующим флуоресцентным красителем. Продукты ПЦР анализировались напрямую в амплификаторе, оснащенном опцией плавления. Воспроизводимость результатов ПЦР-HRM в основном зависела от использования одинаковых концентраций тестируемой и контрольной гДНК. Дифференцирование между гомо-, гетерозиготным статусами образца гДНК проводилось в соответствии с профилем ее плавления, отображаемом в виде графика зависимости интенсивности флуоресценции от температуры. Гетерозиготный генотип отличается от генотипа дикого типа разностью температур плавления (Tm) и формой кривой плавления, тогда как гомозиготный генотип отличается только по температуре плавления.

Анализируемые мутации включали одно-, двух- и трехнуклеотидные делеции и инсерции, а также все известные классы однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) I–IV классов, различающиеся между собой по интенсивности изменения температур плавления [14, 18] (так, SNP I класса представляют собой замены C > T, G > A со сдвигом Tm > 0,5 °C; SNP II – замены C > A, G > T; SNP III – замена C >G, сдвиг Tm между 0,5 и 0,2 °C, SNP IV – замена A > T, сдвиг Tm < 0,2°C). Спектр 33 исследуемых мутаций в контрольных образцах репрезентативно воспроизводит диапазон мутаций в общей выборке пациентов с МВ и носителей мутантных аллелей в ХМАО – Югре (рис. 1): больше половины (54,4 %) от числа всех изученных мутантных аллелей приходится на четыре мажорные мутации, тогда как суммарная аллельная частота 29 редких мутаций, встречающихся в 1–2 случаях МВ, составляет 45,6 %. На первом месте по частоте (41,8 % от всех изученных мутантных аллелей) находится мутация F508del, на втором (5,1 %) – так называемая «чувашская» мутация E92K, на третьем (по 3,8 %) – мутации E217G, 1677delTA.

Специфичность метода составила 100 % (т.е. были зафиксированы отклонения в паттернах кривых плавления у всех исследуемых образцов, содержащих мутации, и отсутствие отклонений у образцов дикого типа), тогда как чувствительность составила 97,3 %: у двух образцов, содержащих протяженную делецию 21 000 п.о. во 2-м, 3-м экзонах в гетерозиготном состоянии («славянская» мутация), паттерн плавления был идентичен паттерну для «дикого» типа. Таким образом, протяженные делеции/инсерции, сложные перестройки в гетерозиготном состоянии не выявляются с помощью исследуемого метода HRM

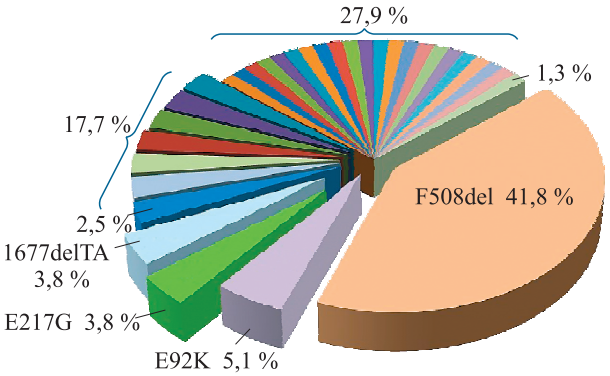

Рис. 1. *Аллельные частоты мутантных аллелей гена CFTR пациентов с установленным диагнозом муковисцидоз в популяционной выборке в регионе ХМАО – Югра (F508del – мутация c.1521_1523delCTT: p.Phe508del; E92K – c.274G>A(p.Glu92Lys); E217G – c.650A>G (p.Glu217Gly); 1677delTA – c.1545_1546delTA (p. Tyr515X)). Скобками объединены группы редких аллелей с частотой встречаемости 2,5 и 1,3 % соответственно*

(впрочем, это характерно и для секвенирования любого типа). Для определения подобного типа мутаций традиционно используется методика MLPA [27].

Метод HRM позволяет различать одновременно до трех уникальных мутаций в одном и том же экзоне, так как каждая из мутаций обладает собственным паттерном плавления (рис. 2, *A* и *B*).

В принципе, используя HRM-анализ при наличии банка гДНК с известными мутациями, можно не только выявлять образцы с отклонениями в температурах плавления, но и генотипировать их в соответствии с паттернами плавления контрольных образцов. Известно, что более половины от количества всех известных мутаций в гене *CFTR* занимают всего 25–30 «частых» мутаций (спектр которых, однако, вполне характерен для каждой популяции). Это позволяет проводить предварительный анализ мутаций с использованием панели частых (мажорных) мутаций. И лишь при наличии редких мутаций целесообразно проводить секвенирование гена.

Все протестированные контрольные образцы с гетерозиготным мутантным генотипом имели кривые плавления с температурами плавления, отличающимися от таковых у образцов дикого типа, что позволило однозначно идентифицировать отклонения от нормального паттерна плавления в соответствующем экзоне (рис. 2, *C*). Использование специализированного ПО значительно облегчает задачу исследователя путем автоматической математической и статистической обработки получаемого набора данных (зависи-

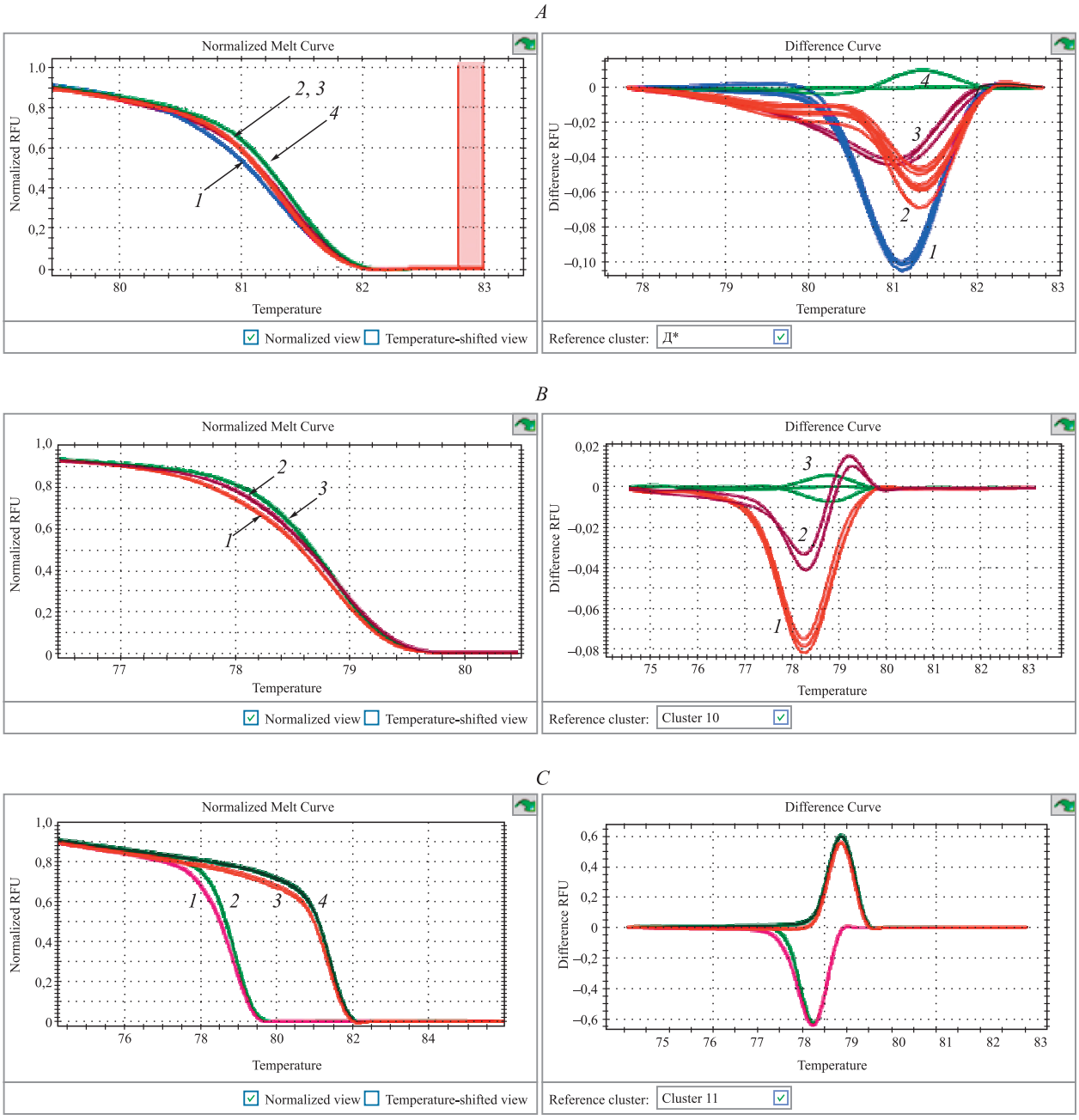

Рис. 2. *Графики HRM для образцов с известными мутациями в гене CFTR (слева – нормализованные кривые плавления; справа – кривые разности относительных единиц флуоресценции между кластерами кривых). Разные мутации выделены разным цветом. А – детекция трех разных мутаций в одном экзоне гена CFTR: экзон 4, мутации: 1 – c.412_413insACT(p.Leu137_Leu138insThr); 2 – c.274G>A(p.Glu92Lys); 3 – c.489+1G>T; 4 – образец дикого типа. В – детекция двух разных делеций в одном экзоне гена CFTR: экзон 11, мутации: 1 – c.1521_1523delCTT(p.Phe508del); 2 – c.1545_1546delTA(p.Tyr515X); 3 – образец дикого типа. С – детекция двух разных гетерозиготных мутаций в одном образце гДНК: 1 – экзон 4, мутация c.274G/A(p.Glu92Lys); 2, 4 – образец дикого типа; 3 – экзон 11, мутация c.1521_1523delCTT (p.Phe508del)*

мости флуоресценции от температуры), субтракции фонового сигнала и нормализации кривых. Таким образом, исследователь проводит визуальный анализ полученных нормализованных кривых и графика разности температур. При наличии статистически достоверных различий между кривыми ПО выделяет их разным цветом и рассчитывает температуры плавления.

Определенные методологические трудности представляет собой детекция гомозиготных мутаций (особенно F508del), однако после ряда экспериментов это стало возможным путем при-

менения приема гетерозиготной конверсии, т.е. предварительного смешивания в соотношении концентраций 1:1 гДНК образца с гомозиготной мутацией и гДНК образца дикого типа [5]

Все протестированные образцы гДНК из контрольной группы были последовательно просеквенированы в соответствии с выявленными аберрантными паттернами кривых плавления для отдельных экзонов гена *CFTR*. Чувствительность и специфичность метода секвенирования составили 100 и 97,3 % соответственно (протяженная делеция в гетерозиготном состоянии не выявилась). Подобные операционные характеристики молекулярного теста, использующего методику HRM-анализа, позволяют применять его как для генотипирования частых мутаций в специализированной панели, так и для сканирования неизвестных мутаций в гене *CFTR*.

Основным преимуществом представленного метода HRM-анализа является возможность достаточно быстро (в течение 3–4 часов), в «закрытом» формате (т.е. без открытия пробирок, что минимизирует риск контаминации ампликонами) и специфично сканировать все экзоны и экзон-интронные границы гена *CFTR* на предмет мутаций (в том числе мутаций сплайсинга) и выявлять различия в кривых плавления для экзонов гена, содержащих ту или иную мутацию (в том числе неизвестную). Таким образом, при тестировании «слепых» образцов с неизвестными мутациями исследователь быстро определяет именно те экзоны гена, которые целесообразно более подробно изучать методом прямого секвенирования. Этот прием значительно уменьшает объем секвенирования до одного-двух экзонов (вместо 27), что критически снижает общее время проведения исследования.

По предварительным оценкам, использование подобного алгоритма молекулярно-генетической диагностики муковисцидоза позволяет значительно сократить время проведения исследований и быстро выявить мутации (в том числе мутации *de novo*) за 2–3 рабочих дня, причем на уровне лаборатории региональной медико-генетической службы, оснащенной амплификатором с функцией плавления и секвенатором, без отправки образца на исследование в федеральный центр или коммерческую лабораторию. В свою очередь, быстрое подтверждение диагноза влечет за собой раннее начало специфичной терапии, позволяющей предупредить развитие тяжелых осложнений МВ.

Необходимо отметить быструю эволюцию методики HRM. К настоящему времени при реализации на микрофлюидной платформе она становится сверхбыстрым тестом, в котором построение кривой плавления проводится менее чем за одну секунду, а в комбинации с методикой «экстремальной» ПЦР общее время генотипирования уменьшается до одной минуты [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высокая специфичность (100 %) и чувствительность (97,3 %) метода HRM обосновывает возможность его внедрения в практику на первом этапе молекулярно-генетической диагностики МВ у детей для сокращения времени и материальных ресурсов на проведение исследования, что в абсолютном большинстве случаев позволяет установить тип мутации в гене *CFTR*. Протяженные делеции/инсерции и сложные перестройки в гетерозиготном состоянии не выявляются с помощью метода HRM, для определения подобного типа мутаций требуется методика MLPA.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Красовский С.А., Каширская Н.Ю., Черняк А.В., Амелина Е.Л., Петрова Н.В., Поляков А.В., Кондратьева Е.И., Воронкова А.Ю., Усачева М.В., Адян Т.А., Степанова А.А., Алимова И.Л., Ашерова И.К., Байкова Г.В., Басилая А.В., Бойцова Е.В., Борисов А.В., Брисин В.Ю., Васильева Е.А., Васильева Т.Г., Водовозова Э.В., Воронин С.В., Гаймоленко И.Н., Голубцова О.И., Горинова Ю.В., Назаренко Л.П., Одинокова О.Н., Гембицкая Т.Е., Никонова В.С., Дьячкова А.А., Сергиенко Д.Ф., Енина Е.А., Ерзутова М.В., Зинченко Ю.С., Зоненко О.Г., Иванова Д.М., Ильенкова Н.А., Кадырова Д.В.* Генетическая характеристика больных муковисцидозом в Российской Федерации по данным Национального регистра (2014 г.) // Пульмонология. 2016. 26. (2). 133–151.

2. Национальный консенсус «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» / ред. Е.И. Кондратьева, Н.Ю. Каширская, Н.И. Капранов. М.: Компания БОРГЕС, 2016. 205 с.

3. *Реброва О.Ю.* Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера, 2002. 312 с.

4. *Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Олефир Ю.В., Бондарев В.П., Лысикова С.Л.* Орфанные препараты для лечения редких болезней // Сиб. науч. мед. журн. 2017. (2). 27–35.

5. *Audrezet M.P., Dabricot A., Le Marechal C., Ferec C.* Validation of high-resolution DNA melting

analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene // J. Mol. Diag. 2008. 10. 424–434.

6. *Bareil C., Guittard C., Altieri J.P., Templin C., Claustres M., des Georges M*. Comprehensive and rapid genotyping of mutations and haplotypes in congenital bilateral absence of vas deferens and other cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-related disorders // J. Mol. Diagn. 9. (5). 582–588.

7. *Castellani C*. CFTR2: how will it help care? // Paediatr. Respir. Rev. 2013. 14. 2–5.

8. *Chambliss A.B., Resnick M., Petrides A.K., Clarke W.A., Marzinke M.A*. Rapid screening for targeted genetic variants via high-resolution melting curve analysis // Clin. Chem. Lab. Med. 2017. 55. (4). 507–516.

9. *Cohen T.S., Prince A*. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome // Nat. Med. 2012. 18. (4). 509–519.

10. *Chou L., Lyon E., Wittwer C.T*. A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model // Am. J. Clin. Pathol. 2005. 124. (3). 330–338.

11. *Fanen P., Wohlhuter-Haddad A., Hinzpetera A*. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2014. 52. 94–102.

12. *Farrell P.M., White T.B., Ren C.L., Hempstead S.E., Accurso F., Derichs N., Howenstine M*. Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the cystic fibrosis foundation // J. Pediatr. 2017. 181. 4–15.

13. *Gonzalez-Bosquet J., Calcei J., Wei J.S., Garcia-Closas M., Sherman M.E., Hewitt S., Vockley J., Lissowska J., Yang H.P., Khan J., Chanock S*. Detection of somatic mutations by high-resolution DNA melting (HRM) analysis in multiple cancers // PLoS One. 2011. 6. (1). e14522.

14. *Cooper G.M., Shendure J*. Needles in stacks of needles: finding disease-causal variants in a wealth of genomic data // Nat. Rev. Genet. 2011. 12. 628–640.

15. *Herrmann M.G., Durtschi J.D., Bromley L.K., Wittwer C.T., Voelkerding K.V*. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes // Clin. Chem. 2006. 52. (3). 494–503.

16. *Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L.C*. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis // Science. 1989. 245. (4922). 1073–1080.

17. *Li B.S., Wang X.Y., Ma F.L., Jiang B., Song X.X., Xu A.G*. Is high resolution melting analysis (HRMA) accurate for detection of human disease-associated mutations? A meta analysis // PLoS One. 2011. 6. (12). e28078.

18. *Liew M., Pryor R., Palais R., Meadows C., Erali M., Lyon E., Wittwer C*. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons // Clin. Chem. 2004. 50. (7). 1156–6417.

19. *Lim R.M., Silver A.J., Silver M.J., Borroto C., Spurrier B., Petrossian T.C., Larson J.L., Silver L.M.* Targeted mutation screening panels expose systematic population bias in detection of cystic fibrosis risk // Genet. Med. 2016. 18. (2). 174–179.

20. *Montgomery J., Wittwer C.T., Kent J., Zhou L.* Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis // Clin. Chem. 2007. 53. (11). 1891–1898.

21. *Montgomery J.L., Sanford L.N., Wittwer C.T.* High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics // Expert Rev. Mol. Diagn. 2010. 10. (2). 219–240.

22. *Pagin A., Devos A., Figeac M., Truant M., Willoquaux Ch., Broly F., Lalau G.* Applicability and efficiency of NGS in routine diagnosis: In-depth performance analysis of a complete workflow for *CFTR* mutation analysis // PLoS One. 2016. 11. (2). e014942620.

23. Population variation of common cystic fibrosis mutations. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium // Hum. Mutat. 1994. 4. 167–177.

24. *Pryor R.J., Myrick J.T., Palais R.A., Sundberg S.O., Paek J.Y., Wittwer C.T., Knight I.T.* High-speed melting analysis: The effect of melting rate on small amplicon microfluidic genotyping // Clin. Chem. 2017. 63. (10). 1624–1632.

25. *Singh R.R., Bains A., Patel K.P., Rahimi H., Barkoh B.A., Paladugu A*. Detection of high-frequency and novel *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia by high-resolution melting curve analysis // J. Mol. Diagn. 2012. 14. 336–345.

26. *Sosnay P.R., Salinas D.B., White T.B., Ren C.L., Farrell P.M., Raraigh K.S., Girodon E., Castellani C*. Applying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genetics and CFTR2 data to facilitate diagnoses // J. Pediatr. 2017. 181. S27–S32.

27. *Svensson A.M*. Detection of large rearrangements in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene by multiplex ligation-dependent probe amplification assay when sequencing fails to detect two disease-causing mutations // Genet. Test. Mol. Biomarkers. 2010. 14. 171–174.

28. *Vandersteen J., Bayrak-Toydemir P., Palais R., Wittwer C.T*. Identifying common genetic variants by high-resolution melting // Clin. Chem. 2007. 53. (7). 1191–1198.

29. *Wittwer C.T., Reed G.H., Gundry C.N., Vandersteen J.G., Pryor R.J*. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen // Clin. Chem. 2003. 49. 853–860.

THE SEARCH FOR GENE MUTATIONS AT CYSTIC FIBROSIS IN CHILDREN BY THE METHOD OF HIGH-RESOLUTION MELTING ANALYSIS

Maxim Yur'evich DONNIKOV, Vitaliy Vital'evich MESHCHERYAKOV

Surgut State University
628412, Surgut, Lenin av., 1

High-resolution melting analysis (HRMA) is promising for preliminary scanning of the nucleotide sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (*CFTR*), which mutations are responsible for the development of cystic fibrosis. In Russia this method has not yet found practical application. **The aim** of this work was the analysis of the efficiency of the HRMA method at the first stage of molecular diagnostics of cystic fibrosis in children. **Materials and methods**. In order to validate the new technique for extended molecular genetic analysis we examined 43 control DNA samples obtained from children with confirmed cystic fibrosis diagnosis and known *CFTR* mutations. **Results**. The specificity of cystic fibrosis molecular diagnostics with the implementation of the HRMA method was 100 %, the sensitivity was 97.3 %. In two samples with extended heterozygous deletion of the 2nd and 3rd exons melting patterns were identical to the wild type ones. **Conclusions.** The high efficiency of the HRMA method proves the possibility of its usefulness in clinical practice at the first stage of cystic fibrosis molecular diagnostics in children toward the reduction of the diagnostic search duration. In most cases this method allows to determine *CFTR* gene mutation type. Long deletions/insertions and complex heterozygous restructurings still cannot be detected using HRMA. Multiplex ligation-dependent probe amplification is required to determine this mutation type.

Key words: molecular diagnostics, high resolution melting analysis, cystic fibrosis, children.

Donnikov M.Yu. *– postgraduate student of childhood diseases chair, e-mail: donnikov@gmail.com*
Meshcheryakov V.V. *– doctor of medical sciences, professor, head of childhood diseases chair, e-mail: maryvitaly@yandex.ru*