

*Т.Е.Гембицкая, М.А.Петрова, Е.А.Куприна, О.В.Воронина*

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ  
ОБЛИГАТНЫХ ГЕТЕРОЗИГОТНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ГЕНА  
МУКОВИСЦИДОЗА**

НИИ пульмонологии СПб ГМУ им. акад. И.П.Павлова, НИИ экспериментальной медицины  
РАМН, Санкт-Петербург

*T.E.Guembitskaya, M.A.Petrova, E.A.Kuprina, O.V.Voronina*

**PHENOTYPICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES IN OBLIGATE HETEROZIGOTES OF CYSTIC FIBROSIS  
(CF) GENE**

**S u m m a r y**

The frequency of appearance and structure of internal diseases were estimated as well as their genetic premises in 83 parents of patients with CF. These results were compared in 68 parents of patients suffering from lung diseases without genetic determination. This study showed that the character features of parents of CF patients who were obligate heterozygotes of CF gene is high frequency of respiratory (25%) and digestive (42%) diseases. The predisposition to lung diseases was higher in mothers of CF patients with  $\Delta F508$  mutation of CFTR gene. Haplotype HLA A1B40 was regarded as risk factor to forming lung diseases.

**Р е з ю м е**

Изучены частота встречаемости и структура заболеваний внутренних органов, а также их генетические предпосылки у 83 родителей детей, больных муковисцидозом (МВ), в сопоставлении с 68 родителями детей, больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких без отчетливой генетической детерминации. Показано, что для родителей больных МВ — гетерозиготных носителей патологического гена — характерна высокая частота встречаемости заболеваний дыхательной (25%) и пищеварительной (42%) систем. Подверженность респираторной патологии выше у матерей больных детей при наличии мутации  $\Delta F508$ . Гаплотип HLA A1B40 также расценен как фактор риска формирования заболеваний органов дыхания.

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз поджелудочной железы, относят к наиболее распространенным генетически детерминированным заболеваниям с аутосомно-рецессивным типом наследования, характеризующимся поражением экзокринных слизообразующих желез. Частота заболеваемости МВ в разных популяциях существенно варьирует, составляя в России от 1:4 860 до 1:12 300 живых родившихся [4]. По оценке ВОЗ, в мире ежегодно рождается 45—50 тыс. больных МВ, а число гетерозиготных носителей гена насчитывает многие десятки миллионов.

По данным скрининга, проведенного в северо-западном регионе России, каждый 62-й житель является носителем мажорной мутации  $\Delta F508$  [7]. Интерес к проблеме гетерозиготных носителей (ГЗН) гена МВ появился уже в 60—70-х годах, когда стала ясна генная природа МВ и не ставился под сомнение аутосомно-рецессивный тип наследования. Это предполагает, что родители пробандов, являясь облигатными носителями гена МВ в гетерозиготном состоянии, согласно законам Менделя, должны быть фенотипически

здоровы. Однако было замечено, что гетерозиготное носительство гена МВ накладывает определенный отпечаток на фенотипические особенности индивидуума [9]. Исследования, проведенные отечественными и зарубежными авторами в тот период, не дали однозначных результатов и оставили вопрос открытым. Приблизительно в то же время появились работы, показавшие, что особенности реагирования организма на внешние агенты и склонность к возникновению болезней во многом связаны со структурными характеристиками лейкоцитарных антигенов. Эти исследования касались в основном болезней с наследственной предрасположенностью, и лишь отдельные авторы рассматривали данный вопрос при собственно генетической патологии [10,12]. Интерес к проблеме влияния на фенотип ГЗН гена МВ на новой основе вновь возник после открытия в 1989 г. гена МВ, когда скрининговые исследования подтвердили его широкое распространение в популяции. Однако и в настоящее время вопрос далек от решения, поэтому уточнение влияния мутантного гена в гетерозиготном состоянии на

предрасположенность его носителей к определенным заболеваниям и изучение вклада в ее реализацию некоторых других факторов, в частности иммуногенетических характеристик индивидуума, имеет большое практическое значение.

Исходя из изложенного выше, цель настоящего исследования состояла в изучении частоты и структуры заболеваний внутренних органов как фенотипических проявлений ГЗН гена МВ, в частности мажорной мутации ΔF508, и особенностей распределения антигенов системы HLA у родителей детей, больных МВ.

Было обследовано 83 человека — родители детей, больных МВ, 37 отцов и 46 матерей (основная группа) и 68 родителей больных ХНЗЛ без отчетливой генетической детерминации (гипоплазия легких, хронический бронхит, бронхоэктатическая болезнь) — 24 отца и 44 матери (контрольная группа). Средний возраст родителей в основной группе составил  $41,2 \pm 10,2$  года, в контрольной —  $42,8 \pm 7,7$  года. Все обследованные относились к европейской этнической популяции, имели близкий жизненный уровень и социальный статус. Лица, имевшие профессиональные вредности, из исследования были исключены. Процент курящих мужчин в обеих группах был приблизительно одинаков (14 и 15% соответственно), курящих среди женщин не было.

Уровень хлоридов в потовой жидкости у всех обследованных не превышал нормы (до 60 ммоль/л).

Состояние здоровья обследованных изучалось по специально разработанной программе, включавшей традиционные методы опроса, физикального исследования и клинико-лабораторного минимума (клинический анализ крови, мочи, флюорографическое исследование), а при показаниях — и специальные методы, направленные на выявление определенной патологии (исследование функций внешнего дыхания, углубленное рентгенологическое, бронхологическое обследование, ЭКГ, УЗИ сердца и органов брюшной полости, ЭГДС и другие).

У 70 родителей основной группы была проведена прямая детекция мутантного гена методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК, а у 43 из них (11 отцов и 32 матерей) — определение антигенов системы HLA в микролимфоцитотоксическом тесте [16]. В качестве контрольной группы для последних выступали здоровые доноры, обследованные в Санкт-Петербургском НИИ гематологии и трансфузиологии [8].

Все полученные данные обработаны математически с использованием методов вариационной статистики и специальных рекомендаций [5].

В результате проведенных исследований в обеих группах родителей с достаточно высокой частотой были выявлены различные заболевания внутренних органов, которые для дальнейшего анализа были сгруппированы в 4 класса: 1) заболевания дыхательной системы (хронический бронхит, бронхиальная астма, бронхоэктатическая болезнь); 2) заболевания органов пищеварения (язвенная болезнь, хроническая патология печени, поджелудочной железы и кишечника); 3) заболевания сердечно-сосудистой системы (гипертоничес-

Таблица 1

Частота встречаемости заболеваний внутренних органов у родителей — носителей мутации ΔF508, мутаций и лиц контрольной группы

Класс заболеваний	ΔF508 / Normal (n=31)		Other/Normal (n=39)		Контрольная группа (n=68)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Респираторные	10	32*	8	20+	6	9*+
Пищеварительной системы	13	42**	16	41^	5	7***
Сердечно-сосудистой системы	5	16	5	13	13	19

Примечание. \* —  $p=0,0003$ , + —  $p=0,02$  \*\* —  $p=0,0001$ , ^ —  $p=0,0001$ .

кая и ишемическая болезнь); 4) прочие. К последней группе были отнесены все остальные хронические заболевания внутренних органов, которые в разработку не вошли.

Анализ результатов обследования родителей основной и контрольной групп позволил установить, что в основной группе доминирующей являлась патология пищеварительной и дыхательной систем, отмеченная у 2/3 обследованных. Так, патология пищеварительного тракта выявлена у 42% родителей основной и лишь у 7% контрольной группы ( $p<0,0001$ ), для заболеваний органов дыхания эти цифры составили 25 и 9%

Таблица 2

Частота встречаемости заболеваний внутренних органов у родителей (отцов и матерей) — носителей мутации ΔF508 и других мутаций

Класс заболеваний, пол	Генотип ΔF508 / Normal (M=15, Ж=16)		Генотип Other/Normal (M=12, Ж=27)	
	n	%	n	%
Респираторные заболевания:				
мужчины	3	20	4	33
женщины	7	43*	4	14*
Заболевания пищеварительной системы:				
мужчины	6	40	5	41
женщины	7	43	11	40
Фенотипически здоровые:				
мужчины	3	20	4	33
женщины	1	6+	8	30+

Примечание. \* —  $p=0,004$ , + —  $p=0,02$ .

Частота распределения (в процентах) некоторых HLA-антигенов у родственников больных муковисцидозом

Антигены системы HLA	Частота встречаемости		Достоверность различий			Относительный риск (RR)
	родители больных МВ (n=43)	здоровые (n=845)	$\chi^2$	p	$P_{\text{корр}}$	
A9	11,6	27,5	4,46	<0,05		0,35
A10	53,5	19,6	26,0	<0,0001	<0,0001	4,8
B21	11,6	3,6	5,08	<0,025		3,6
B35	25,6	12,3	5,28	<0,025		2,5
B40	23,3	12,07 n=384	3,68	>0,05		2,2
Cw2	46,5	8,3	43,24	<0,0001	<0,0001	9,6
Cw3	32,6	12,23	10,46	<0,0025	<0,05	3,5
Cw4	58,1	18,75 n=412	29,91	<0,0001	<0,0001	6,0
DR4	2,3	19,9	9,63	<0,0025		0,09

соответственно ( $p=0,02$ ). В то же время поражения сердечно-сосудистой системы отмечены практически с одинаковой частотой у представителей обеих групп (16 и 19%).

Проведение детекции мутантного гена показало, что 44% родителей основной группы являлись ГЗН мажорной мутации гена МВ  $\Delta F508$ .

При проведении сравнительного анализа частоты встречаемости заболеваний внутренних органов у родителей с генотипом  $\Delta F508/Normal$  и контрольной группы выявлено, что 32% родителей — носителей данной мутации страдали болезнями органов дыхания, в то время как в контрольной группе — 9% ( $p=0,0003$ ) — табл.1. Патология желудочно-кишечного тракта выявлена у первых в 42% против 7% у вторых. Близкими были результаты, полученные при сопоставлении частоты патологии дыхательной и пищеварительной систем у носителей других мутаций (генотип *Other/Normal*) и лиц контрольной группы.

В то же время сравнение частоты встречаемости патологии у носителей мутации  $\Delta F508$  и других мутаций с учетом пола обследованных показало отсутствие существенных различий в группе отцов и отчетливое преобладание частоты респираторной патологии у матерей с генотипом  $\Delta F508/Normal$  (табл.2). Интересен и тот факт, что из 16 матерей — носителей этой мутации только одна (6%) оказалась фенотипически здоровой, в то время как среди женщин с генотипом *Other/Normal* таковых было 8 (30%;  $p=0,02$ ). Число фенотипически здоровых отцов было выше, чем матерей, независимо от типа мутаций — 20% в первой группе и 33% во второй.

Анализ HLA-антигенных характеристик у ГЗН гена МВ обнаружил отклонения от нормального распределения, представленные в табл.3. Отмечено увеличение частоты встречаемости антигенов A10, B21, B35, B40, Cw2, Cw3, Cw4 и снижение A9 и DR4.

Повышение частоты обнаружения перечисленных выше антигенов нашло отражение в увеличении встреча-

емости сочетаний A3,10 ( $\chi^2=23,1$ ;  $p_{\text{корр}}<0,0001$ ); A10 B18 ( $\chi^2=9,5$ ;  $p<0,0025$ ); A2 B35 ( $\chi^2=10,0$ ;  $p<0,0025$ ); A10 B40 ( $\chi^2=45,7$ ;  $p_{\text{корр}}<0,0001$ ).

Из 43 родителей, тестируемых на наличие мажорной мутации  $\Delta F508$ , у 17 она была обнаружена в гетерозиготном состоянии. У остальных обследованных генотип идентифицировать не удалось. При сравнении групп родителей, имеющих генотип  $\Delta F508/Normal$  и *Unknown/Normal*, у первых отмечено увеличение частоты встречаемости антигенов B40 (41,2% против 11,5%;  $p<0,05$ ) и Cw2 (64,7% против 34,6%;  $p<0,05$ ). Кроме того, при аналогичном подходе выявлено накопление гаплотипа A1 B40 ( $p<0,05$ ) и фенотипа B7,18 ( $p<0,05$ ). Сопоставление HLA-антигенных характеристик в группах больных и практически здоровых родственников не выявило существенных различий.

Интерес к проблеме ГЗН мутантного гена возрастает по мере изучения фенотипических проявлений "мягких мутаций". Исходя из того, что МВ является моногенным заболеванием с аутосомно-рецессивным типом наследования, мутантный ген фенотипически проявляться не может и его ГЗН должны быть здоровы. Однако в литературе в последние годы появились работы, в которых анализировалась возможность связи ГЗН гена МВ с ХНЗЛ, в частности с множественными бронхоэктазами и хроническим бронхитом, сопровождавшимся псевдомональной инфекцией [11].

Работая с семьями больных МВ, мы обратили внимание, что среди их родственников достаточно часто встречались больные с заболеваниями дыхательной и пищеварительной систем, являющихся "мишенями" действия гена МВ, что и заставило исследовать этот факт более глубоко. Включение в анализ патологии сердечно-сосудистой системы обусловлено указаниями некоторых авторов на тормозящее влияние ГЗН гена МВ на развитие заболеваний сердечно-сосудистой системы [2].

Клиническое обследование родителей детей, больных МВ и ХНЗЛ, и последующий сравнительный анализ

частоты выявленной патологии обнаружил у первых по сравнению со вторыми преобладание патологии пищеварительной и дыхательной систем при отсутствии существенных различий в частоте встречаемости заболеваний сердечно-сосудистой системы. На основании полученных данных складывается впечатление, что подверженность патологии пищеварительной системы не зависела от характера мутации и пола больного, в то время как респираторные поражения отчетливо чаще наблюдались у матерей больных МВ — носительниц мутации ΔF508, хотя среди них не было курящих, а среди отцов таковые встречались. Следовательно, есть основания считать, что ГЗН гена МВ в некоторых случаях все же проявляется фенотипическими поражениями органов и систем, страдающих при МВ.

Возникает закономерный вопрос: что представляет собой данная патология — самостоятельные нозологические формы или “мягкие” проявления МВ с нормальными хлоридами потовой жидкости. Единой точки зрения по этому вопросу не существует. Ряд авторов считают, что патология дыхательной и пищеварительной систем у облигатных гетерозигот — это “мягкие” формы МВ, а мозаичность клинической картины объясняют различной экспрессией мутантного гена [11,13,14]. Существует и другая точка зрения, что носители редких аутосомно-рецессивных мутаций могут быть предрасположены к проявлениям родственных мультифакториальных заболеваний [9]. Представленные данные о повышении частоты антигена В40 и гаплотипа А1 В40 у родителей ГЗН мутации ΔF508 подтверждают результаты, полученные ранее при обследовании больных МВ [1]. В то же время отклонения от нормального распределения HLA-антигенных характеристик родителей были близки не только к таковым, выявленным у больных МВ, но и у больных мультифакториальными заболеваниями: бронхиальной астмой и хроническим бронхитом [3,6]. Отсутствие существенных различий HLA-антигенных характеристик в группах больных и практически здоровых родственников связано, по-видимому, с малым числом наблюдений и возможным наличием у части фенотипически здоровых лиц дефектов, не реализованных к моменту обследования в развернутую картину болезни.

Таким образом, представленные данные дают возможность предположить участие двух генетических

систем в формировании патологии органов дыхания у родственников больных МВ. Носительство мутации ΔF508 и гаплотипа А1 В40 можно расценивать как факторы риска развития данной патологии, что диктует необходимость тщательного наблюдения за состоянием здоровья ГЗН гена МВ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гембицкая Т.Е., Кочарян Р.Х., Петрова М.А. Клиническое значение особенностей распределения антигенов системы HLA у больных муковисцидозом и их родственников Вестн. РАМН, 1996; 3: 41—44.
2. Дидковский Н.А., Дворецкий Л.А. Наследственные факторы и местная защита при неспецифических заболеваниях легких. М.: Медицина; 1990.
3. Ильяшевич И.Г. Антигены системы HLA при различных клинко-патогенетических вариантах хронического бронхита: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб; 1993.
4. Капранов Н.И., Каширская Н.Ю. Актуальные проблемы муковисцидоза на современном этапе в России. Пульмонология, 1997; 4: 7—16.
5. Певницкий Л.А. Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями. Вестн. АМН СССР. 1988; 7: 48—51.
6. Петрова М.А. Доклинические, возрастные и прогностические аспекты бронхиальной астмы: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб; 1997.
7. Потапова О.Ю. Молекулярно-генетический анализ кистозного фиброза в России: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб; 1994.
8. Серова Л.Д. Иммунологические маркеры клеток крови в норме и при некоторых видах патологии: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Л.; 1980.
9. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: Пер. с англ. под ред. Ю.П.Алтухова, В.М.Гиндилиса. М.: Мир; 1989; т.1.
10. Dork N., Wilbrand T., Neumann N. et al. Identification of CFTR mutations in german patients with cystic fibrosis: the association of genotype and clinical phenotype. In: European cystic fibrosis conference, 17th. Copenhagen; 1991. 63.
11. Dumur V., Lajitte J.-J., Gervais R. et al. Abnormal distribution of cystic fibrosis del F 508 allele in adults with chronic bronchial hypersecretion. Lancet 1990; 1: 1335—1340.
12. Gotz M., Ludwig H., Polymenidis Z. HLA antigens in cystic fibrosis. Z. Kinderheilk. 1974; 117: 183—186.
13. Poller W., Faber J.P., Scholz S. et al. Sequence analysis of the cystic fibrosis gene in patients with disseminated bronchiectasis lung disease. Klin. Wschr. 1991; 69: 663—667.
14. Stern M. Screening diffuse bronchiectasis patients CF mutation: evidence for increased frequency of delta F 508. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1994; 149: A674.
15. Terasaki F.L., McClelland J.B. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. Nature 1964; 204 (4962): 998—1000.

Поступила 16.11.99