

ДЕПАРТАМЕНТ ОБРАЗОВАНИЯ И МОЛОДЁЖНОЙ ПОЛИТИКИ  
ХАНТЫ-МАНСИЙСКОГО АВТОНОМНОГО ОКРУГА - ЮГРЫ

БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
ХАНТЫ-МАНСИЙСКОГО АВТОНОМНОГО ОКРУГА – ЮГРЫ  
«СУРГУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

ДОННИКОВ МАКСИМ ЮРЬЕВИЧ

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ  
МУКОВИСЦИДОЗА У ДЕТЕЙ НА РЕГИОНАЛЬНОМ УРОВНЕ  
(НА ПРИМЕРЕ ХМАО-ЮГРЫ)

14.01.08 (педиатрия)

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор В.В. Мещеряков

Сургут – 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1. Краткий исторический обзор .....	12
1.2. Эпидемиология муковисцидоза .....	14
1.3. Этиология и патогенез муковисцидоза .....	20
1.4. Клиническая картина муковисцидоза .....	25
1.5. Диагностика муковисцидоза .....	27
1.6. Лечебные подходы .....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	36
2.1. Общая характеристика работы .....	36
2.2. Характеристика исследования с точки зрения клинической эпидемиологии. Описание методов исследования. Дизайн исследования.....	36
2.3. Статистическая обработка материалов исследования .....	42
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ. КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МВ У ДЕТЕЙ ХМАО-ЮГРЫ В УСЛОВИЯХ ВНЕДРЕНИЯ МАССОВОГО НЕОНАТАЛЬНОГО СКРИНИНГА В ПЕРИОД С 2012 ПО 2018 Г.Г. ....	43
3.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МВ У ДЕТЕЙ ХМАО- ЮГРЫ ПО ДАННЫМ РЕГИОНАЛЬНОГО РЕГИСТРА В ПЕРИОД С 2012 ПО 2018 Г.Г. ....	43
3.2. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КОГОРТЫ ДЕТЕЙ С МВ В ХМАО-ЮГРЕ ПО ДАННЫМ РЕГИСТРА В ДИНАМИКЕ ЗА ПЕРИОД С 2012 ПО 2018 Г.Г. В УСЛОВИЯХ ВНЕДРЕНИЯ МАССОВОГО СКРИНИНГА ЗАБОЛЕВАНИЯ .....	44
3.3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ МВ У ДЕТЕЙ С НС И БЕЗ НС.....	53
3.4. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ .....	59

ГЛАВА 4. ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ОПТИМИЗАЦИЯ НЕОНАТАЛЬНОГО СКРИНИНГА НА ТЕРРИТОРИИ ХМАО-ЮГРЫ В ПЕРИОД 2006 – 2019 гг...	71
4.1. АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕОНАТАЛЬНОГО СКРИНИНГА В ХМАО-ЮГРЕ (2006 – 2017 гг.) .....	71
4.2. РАСЧЕТ РЕГИОНАЛЬНЫХ РЕФЕРЕНСНЫХ ВЕЛИЧИН ИРТ В НЕОНАТАЛЬНОМ СКРИНИНГЕ НА МУКОВИСЦИДОЗ .....	74
ГЛАВА 5. ВАЛИДАЦИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДИК РАСШИРЕННОЙ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ УТОЧНЯЮЩЕЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МУКОВИСЦИДОЗА .....	79
ГЛАВА 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	89
6.1. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	89
6.2. ВЫВОДЫ .....	101
6.3. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	103
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	133
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	134

## ВВЕДЕНИЕ

Муковисцидоз (МВ) – самое частое аутосомно-рецессивное заболевание человека, встречающееся с наибольшей частотой у лиц европейского происхождения [26, 39, 89]. МВ – полиорганный патология, обусловленная мутациями в гене *CFTR*, кодирующего хлоридный канал [75, 154]. Диагноз МВ еще недавно определялся по характерным клиническим проявлениям со стороны системы дыхания и экзокринных желез, свидетельствовавших о начале необратимых патологических изменений [211]. С распространением неонатального скрининга (НС) диагностика МВ становится пресимптоматической [113], что во многом определяет раннее начало терапии, предупреждает развитие тяжелых осложнений и улучшает прогноз [84, 137, 148, 223]. Прогресс в клинико-лабораторных и генетических технологиях [145, 235] обеспечивают формирование и накопление специализированных международных баз данных, содержащих генетическую, фенотипическую, клиническую информацию о МВ [99, 212]. Создание национальных регистров пациентов с МВ [39, 88, 89, 109, 225] имеет важное практическое значение в улучшении организации специализированной помощи при МВ.

В Российской Федерации (РФ) используется протокол НС в виде двукратного определения уровней иммунореактивного трипсиногена (ИРТ), являющегося биохимическим маркером поражения экзокринных желез [31, 222]. Неонатальная гипертрипсиногенемия в российской популяции обнаруживается с частотой 1 на 100-200 здоровых новорожденных [26, 31]. Одной из актуальных проблем НС считается высокое число ложноположительных результатов [31, 222], что определяет необходимость совершенствования подходов к оценке результатов НС. По ХМАО-Югре данные об эффективности НС отсутствуют.

В настоящее время известно более 2 000 мутаций гена *CFTR* [36, 90, 185], причем их спектры обладают выраженной популяционной специфичностью, что затрудняет генную диагностику МВ в гетерогенных популяциях [36, 37].

Полный генетический диагноз приобретает особую актуальность в связи с внедрением в практику таргетной терапии [20, 127].

ХМАО-Югра характеризуется высоким уровнем рождаемости, большим удельным весом детей в общей популяции населения и значительным этническим разнообразием. В связи с этим возникает вопрос о необходимости исследования структуры мутаций в гене *CFTR* в когорте пациентов на данной территории, что определяет необходимость проведения сплошного обследования больных с использованием доступного для региональных условий метода генной диагностики. Таковым может быть анализ кривых плавления высокого разрешения (англ. high resolution melting analysis, HRMA) на первом этапе молекулярно-генетической диагностики МВ [59, 142], однако в РФ он до настоящего времени не внедрён в практику.

Важным представляется исследование эпидемиологических особенностей МВ у детей на территории ХМАО-Югры, что необходимо для рационального планирования ресурсов здравоохранения по оказанию медицинской помощи пациентам [39, 133, 217]. С начала проведения НС врачи-пульмонологи курируют две группы пациентов – с НС и без НС. Ранняя диагностика МВ на основе массового внедрения НС не может не отразиться на особенностях течения заболевания. Необходимость учёта клинических особенностей течения МВ у детей с НС и без НС при организации лечебно-профилактических мероприятий требует проведения соответствующего сравнительного анализа указанных групп пациентов.

### **Цель исследования**

Повышение качества оказания медицинской помощи детям с муковисцидозом на основе исследования особенностей течения болезни в условиях массового неонатального скрининга и оптимизации ранней диагностики заболевания на региональном уровне.

### **Задачи исследования**

1. Исследовать эпидемиологические особенности муковисцидоза у детей на территории ХМАО-Югры по данным регионального регистра за период 2012-2018 г.г.

2. Представить клинический анализ когорты пациентов с муковисцидозом в ХМАО-Югре по данным регистра в динамике за период с 2012 по 2018 г.г. в условиях массового внедрения неонатального скрининга этого заболевания.

3. Исследовать клинические особенности течения муковисцидоза у детей при ранней диагностике заболевания на основе внедрения его неонатального скрининга.

4. Усовершенствовать оценку результатов неонатального скрининга на основе разработки метода «плавающих» референсных значений иммунореактивного трипсиногена в популяции новорождённых ХМАО-Югры и оценить эффективность метода.

5. Оценить эффективность внедрения метода «анализа кривых плавления» на первом этапе молекулярно-генетической диагностики муковисцидоза у детей в условиях региональной медико-генетической консультации и представить структуру генных мутаций в популяции больных на территории ХМАО-Югры.

### **Научная новизна исследования**

Установлены эпидемиологические особенности МВ на территории ХМАО-Югры. Доказано, что высокая распространённость МВ у детей связана с эффектом «накопления» больных на фоне высокого уровня рождаемости, установлены прямые связи между распространённостью МВ, уровнем рождаемости и удельным весом детского населения в общей популяции.

Установлено, что когорта детей с муковисцидозом на территории ХМАО-Югры характеризуется ростом абсолютного числа больных, удельного веса пациентов с неонатальным скринингом и статистически значимым

увеличением среднего возраста пациентов за период ведения регионального регистра. Клинические особенности течения муковисцидоза определяются сочетанным влиянием двух факторов - возраста ребёнка при постановке диагноза и длительностью заболевания.

Установлено, что ранняя диагностика на основе внедрения массового неонатального скрининга и своевременно начатая базисная терапия муковисцидоза способствуют более благоприятному течению заболевания.

Установлены чувствительность (100,0 %) и специфичность (98,1 %) неонатального скрининга муковисцидоза на территории ХМАО-Югры при использовании стандартных пороговых значений иммунореактивного трипсиногена, рекомендованных изготовителем реактивов для данного исследования.

Установлены региональные пороговые значения иммунореактивного трипсиногена для популяции новорождённых детей ХМАО-Югры на основе разработки метода «плавающих» референсных его значений. Показано, что внедрение разработанного метода позволяет повысить специфичность неонатального скрининга до 99,6 % и сохранить его чувствительность на уровне 100%.

Впервые в Российской Федерации установлены специфичность (100%) и чувствительность (97,3%) метода анализа кривых плавления на первом этапе молекулярно-генетической диагностики МВ. Метод не позволяет выявить протяженные гетерозиготные делеции/инсерции и сложные перестройки в гене *CFTR*, что требует проведения методики MLPA.

Впервые установлена структура мутаций в гене *CFTR* в популяции пациентов с этим заболеванием в региональных условиях ХМАО-Югры.

### **Практическая значимость**

Установленные региональные для ХМАО-Югры эпидемиологические показатели при МВ могут быть использованы при планировании ресурсов

здравоохранения для оказания медицинской помощи этому контингенту больных.

Установленные клинические особенности течения МВ в группах детей с ранней диагностикой заболевания на основе НС и без НС с более поздней постановкой диагноза определяют необходимость дифференцированного подхода при организации лечебно-профилактических мероприятий пациентам.

Использование разработанного метода «плавающих» референсных значений иммунореактивного трипсиногена позволяет уменьшить количество ложноположительных результатов и сократить тем самым затраты на дальнейшее обследование на муковисцидоз (потовый тест, молекулярная диагностика), внедрение метода анализа кривых плавления на первом этапе молекулярно-генетической диагностики позволяет сократить время и материальные затраты на проведение исследования и в большинстве случаев установить тип мутации в гене *CFTR* в лаборатории регионального уровня.

### **Значение результатов работы для науки и практики в перспективе**

Установленные клинические особенности МВ у детей в условиях массового внедрения НС требуют продолжения проспективного наблюдения за пациентами для исследования отдалённых результатов ранней диагностики заболевания в подростковом периоде и у взрослых.

Повышение эффективности НС в ХМАО-Югре на основе расчёта «плавающего» порогового уровня ИРТ обосновывает необходимость разработки региональных референсных значений ИРТ на других территориях с использованием авторской программы для ЭВМ.

Высокая диагностическая эффективность и доступность метода анализа кривых плавления на первом этапе молекулярно-генетической диагностики МВ определяют перспективы внедрения метода и оценки его эффективности в диагностике других генных заболеваний, в том числе - в региональных условиях.

Полный охват генной диагностикой МВ на региональном уровне на основе внедрения метода анализа кривых плавления с постановкой генетического диагноза всем пациентам позволит в перспективе шире внедрять таргетную терапию заболевания.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты научного исследования внедрены в практику работы медико-генетической консультации БУ ХМАО-Югры «Окружной кардиологический диспансер «Центр диагностики и сердечно-сосудистой хирургии» (628416, г. Сургут, пр. Ленина, 69/1) и в учебный процесс на кафедре детских болезней медицинского института БУ ВО «Сургутский государственный университет» (628412, г. Сургут, пр. Ленина, 1).

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Многолетний анализ регионального регистра пациентов с МВ позволяет установить эпидемиологические и клинические особенности заболевания в динамике в условиях массового внедрения НС.

2. Ранняя диагностика МВ на основе внедрения неонатального скрининга и своевременно начатая базисная терапия определяют клинический патоморфоз заболевания, характеризующийся более благоприятным течением болезни.

3. Разработка региональных референсных значений иммунореактивного трипсиногена на основе метода определения его «плавающего» порогового уровня и внедрение метода анализа кривых плавления на первом этапе молекулярно-генетической диагностики муковисцидоза позволяют повысить качество неонатального скрининга и обеспечить полную генную диагностику в абсолютном большинстве случаев в региональных условиях.

## **Апробация работы**

Результаты исследования доложены на:

XII, XIII, XIV Национальных конгрессах «Актуальные проблемы муковисцидоза» (Москва, 22-24 апреля 2015 г., Сергиев Посад, 27-28 апреля 2017 г., Красноярск, 25-26 апреля 2019 г.);

VII Конгрессе педиатров стран СНГ «Ребенок и общество: проблемы здоровья, развития и питания» (Сочи, 23-24 октября 2015 г.);

XVI, XVIII Национальных конгрессах «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 24-26 октября 2017 г.; 22-24 октября 2019 г.);

XX, XXI Конгрессах педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии» (Москва, 16-18 февраля 2018 г., 15-17 февраля 2019 г.);

41-й конференции Европейского общества по муковисцидозу (European Cystic Fibrosis Society, ECFS; Белград (Сербия); 06-10 июня 2018 г.);

II, III, IV Всероссийских научно-практических конференциях «Фундаментальные и прикладные проблемы здоровьесбережения человека на севере» (Сургут, 21 октября 2017 г., 20-21 октября 2018 г., 25 октября 2019 г.);

52-й конференции Европейского общества генетики человека (European Society of Human Genetics, ESHG), г. Стокгольм (Швеция), 15-18 июня 2019 г.

## **Публикации результатов исследования**

По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для изложения результатов докторских и кандидатских диссертаций; 5 статей – в изданиях, включённых в базу данных Scopus. Получено одно Свидетельство РФ на программу ЭВМ.

### **Объем и структура работы**

Материал диссертации изложен на 134 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, трёх глав результатов собственных исследований, заключения с обсуждением полученных результатов, выводами и практическими рекомендациями, списка литературы, списка сокращений, приложения. Диссертация иллюстрирована 13 таблицами и 18 рисунками. Библиографический указатель включает 237 источников, из которых 52 опубликованы в отечественной и 185 в зарубежной литературе.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Краткий исторический обзор

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз (англ. *cystic fibrosis*, OMIM 219700) – одно из самых частых моногенных наследственных заболеваний человека, обусловленное мутациями в гене *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane regulator*, трансмембранного регулятора проводимости муковисцидоза) и проявляющееся в виде системной экзокринопатии [14, 15, 21, 33, 104]. Заболевание встречается среди всего населения планеты, но чаще у лиц европейского происхождения (в среднем 1 случай на 2 500 – 4 500 новорожденных) [22, 169, 217]. Без своевременной адекватной терапии качество [42] и продолжительность жизни пациентов резко снижаются [219, 223].

В качестве самостоятельной нозологической единицы МВ был выделен только в 1938 г. D. Andersen [57], впервые давшей патологоанатомическую и клиническую характеристику заболевания. S. Farber в 1946 г. предложил термин «муковисцидоз» (*mucus* – слизь, *viscidus* – мягкий), который впоследствии получил всеобщее признание [110]. Дальнейший прогресс в изучении МВ был связан с открытием феномена повышенного содержания электролитов в поте пациентов с МВ, что явилось основой прижизненной диагностики. В конце 1950-х гг. L. Gibson, R. Cooke разработали метод пилокарпинового ионтофореза [45], который по настоящую пору остается диагностическим стандартом [188].

Выбор иммунореактивного трипсиногена (ИРТ) в качестве подходящего биомаркера, разработка и появление коммерчески доступного биохимического теста в 1979 г. обеспечили базис программы неонатального скрининга (НС) по выявлению детей с МВ в первые недели жизни, задолго до появления выраженной клинической картины заболевания [55, 84]. Тест ИРТ показал лучшую чувствительность в сравнении с другими скрининговыми тестами, ранее использовавшимися для выявления детей с МВ (уровень мекониального альбумина, лактазы) [124], и поэтому был включен в уже существующие

программы скрининга других наследственных заболеваний (на фенилкетонурию). С июня 2006 г. – января 2007 г. НС МВ проводится во всех регионах России в рамках национальной программы «Здоровье» по протоколу двухкратного определения ИРТ с последующим потовым тестом в течение первых 2-3 недель жизни ребенка. Ретест ИРТ необходим для подтверждения высоких уровней маркера в первичном тесте [51, 21].

С середины XX века начинается широкое применение при бронхолегочных обострениях антибиотиков (тетрациклинов), при тяжелом течении начинают использовать ингаляционные антибиотики (пенициллин, стрептомицин, неомицин) [44, 123]. В 1970-х гг. в развитых странах Запада на основании многолетнего опыта ведения пациентов учреждаются центры муковисцидоза и формируются программы обследования и лечения пациентов, которые стали основой для дальнейшего развития системы ведения больных МВ [89]. Работа велась одновременно по многим направлениям. Так, самое важное достижение в улучшении нутритивного статуса пациентов сыграла разработка кислотоустойчивых панкреатических ферментов (Панкреаза, Креон), ставших доступными для пациентов в начале 1980-х гг. (в России гораздо позже) [208, 221].

Благодаря подобным усилиям, уже к концу 1970-хх гг. был достигнут рост медианы выживаемости и улучшение прогноза пациентов в США, Канаде, Великобритании [122, 218]. Важным шагом в продлении жизни пациентов стали программы трансплантации легких, сердца, начатые в середине 1980-хх гг. Оказалось, что выживаемость при пересадке комплекса легкие-печень выше, чем при пересадке легкие-сердце [170, 206]. Возросла роль физиотерапевтов, предложивших различные методики дыхания и механические устройства удаления мокроты [162, 233], становится популярной вибрационная терапия с помощью воздушных жилетов (кинезитерапия) [232]. Клиницисты разрабатывают и начинают широко применять агрессивные методы

энтерального питания с использованием назогастральных зондов, гастростом [114, 165].

Конец XX века положил начало новой молекулярно-генетической эры в исследованиях МВ. В 1989 г. две группы ученых из США и Канады под руководством F. Collins, L.-C. Tsui клонировали и охарактеризовали ген *CFTR* [138]. Первоначальная эйфория среди ученых по поводу открывшейся возможности коррекции молекулярного дефекта на уровне генов (т.н. генная терапия) впоследствии угасла, в связи с низким уровнем эффективности переноса терапевтической версии гена, развитием непредсказуемого иммунного ответа и воспалительных реакций как местных, так и системных [81]. Однако, последние исследования в этой области (использование лентивирусных векторов [153], специфичных микроРНК [61], геномного редактирования CRISPR [81]) вселяют надежду на клинический успех [74, 228].

В первом десятилетии XXI века основные усилия ученых сосредоточились на поиске и разработке низкомолекулярных соединений, позволяющих корректировать, активировать и потенцировать работу мутантного белка CFTR, что привело к внедрению в клиническую практику в развитых странах таргетной терапии МВ [72, 134].

## 1.2. Эпидемиология муковисцидоза

Необходимость в сборе информации о количестве пациентов с МВ, уровнях его заболеваемости, смертности, встречаемости, частоте, актуальном клиническом течении, оценке безопасности используемых медицинских технологий, эффективной терапии привело к созданию специализированных регистров МВ в разных странах мира [217]. Таким образом, регистр является организованной системой, использующей различные методы исследования для сбора и обобщения данных, что служит клинической, организационной, научной цели [4, 171]. В особенности регистрация данных необходима при лечении редких и дорогостоящих заболеваний, к которым относят и МВ [39, 91,

116, 133]. Качественное отличие регистра пациентов от клинического исследования – длительное ведение, что позволяет оценивать отдаленные эффекты [4, 217].

В большинстве стран, где регистрируются случаи МВ, имеются национальные регистры: в России [39], США [89], Канаде [88], Великобритании [225], и других странах. Сбор и публикация регистров тесно связаны с работой национальных сообществ МВ. Общеввропейский регистр курируется ECFS (European Cystic Fibrosis Society, европейское общество МВ) и включает в себя информацию по национальным регистрам 35 стран Европейского Союза (кроме Финляндии, Исландии, Хорватии, Эстонии), Турции, Израиля, Белоруссии, Украины, России [109].

Страна-лидер по общей численности больных МВ – США, где на 2017 г. зарегистрировано 29 887 пациентов [89]; в общеевропейском регистре 2017 г. состоит 48 204 человека [109]. Средний возраст (медиана) пациентов с МВ одинаков в большинстве регистров: суммарно в Европе – 20,8 (18,5) лет; в США – 21,7 (19,3) лет. Средний возраст умерших: в США – 30,6 лет, в Европе – 31,2 (медиана – 29,0) лет. Медиана выживаемости пациентов с МВ в Европе по данным [164, 174, 237] определяется в том числе социально-экономическим статусом и составляет 52,6 лет (95% С.И., 51,2-54,3) [164]. В странах с низким уровнем дохода вероятность смертельного исхода выше на 87% по сравнению со странами со средним и высоким уровнем дохода (HR: 1,98; 95% CI: 1,55 – 2,24). В США медиана выживаемости составляет 43,6 (95% CI: 42,2 – 44,8) г. [89]. Постоянно увеличивается доля пациентов старше 18 лет: в 2017 г. в США – 53,5% (в 2007 г. – 45,0%), в среднем по Европе – 51,3% (в 2011 г. – 48,0%). Средний возраст при постановке диагноза МВ в США составил в 2017 г. 3,0 мес., в странах Европы – 4,0 мес.; причем диагноз по данным неонатального скрининга в США был поставлен у 58,4% пациентов (в 2007 г. – только у 34,2%) [84, 137].

Данные генетических исследований в разных регистрах весьма различаются. В европейском регистре приводится как аллельная частота и географическое распространение частых мутаций в разных странах (17 мажорных мутаций, среди которых в порядке убывания: F508del – 60,75%; G542X – 2,69%; N1303K – 2,19% и т.д.), так и частота комбинаций мутаций: гетерозиготы/гомозиготы по самой частой мутации F508del (31% / 40% соответственно), частота генотипов без этой мутаций (29%) [109]. В регистре США представлена частота мажорных мутаций в порядке убывания (F508del – 85,8%; G542X – 4,6%; G551D – 4,5% и т.д.), распространенность мутации F508del – гомозиготное состояние у 45,3% пациентов с МВ, гетерозиготное – у 40,9%, без мутации F508del – 13,7% [89].

В связи с тем, что поддержание адекватной массы тела является важным аспектом лечения МВ, нутритивному статусу посвящен отдельный раздел во всех регистрах [182]. В регистре США указывается, что индекс массы тела (ИМТ) пациентов в возрастной группе 2 – 19 лет приблизился к целевым нормальным значениям: медиана (5, 95 перцентили) для составили 57,3 (10,3 – 94,9) кг/м<sup>2</sup>. В регистре Европы данные по нутритивному статусу представлены как интегральный Z-критерий, включающий в себя ИМТ, вес, рост в сравнении с референсной (здоровой) популяцией [58, 147].

Основной мониторируемый в международных регистрах показатель функционального состояния легких – ОФВ<sub>1</sub> (FEV<sub>1</sub>), являющийся наиболее информативным предиктором смертности. Во всех регистрах отображено последовательное снижение ОФВ<sub>1</sub> с взрослением пациентов (медиана и 1, 3 квартили): в группе 6 – 9 лет: 97,3 (86,6 – 106,9) %; в группе 10 – 14 лет: 90,7 (78,7 – 100,3)%, в группе 15 – 19 лет: 83,0 (66,6 – 95,1)% от должного [94].

В регистрах также отображен мониторинг микробиологического пейзажа дыхательных путей. Уделяется внимание хроническому инфицированию *S.aureus*, *P.aeruginosa*, комплекс *B.cereacia*, *S.maltophilia*, нетуберкулезными микобактериями [53, 229]. В регистре США микробиологический раздел

представлен более подробно: наряду с упомянутыми микроорганизмами учитывается частота также *H.influenza*, *A.xylosoxidans*, штаммы *S.aureus*, *P.aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью. Во всех регистрах показано снижение обсемененности дыхательных путей *S.aureus* с возрастом и рост инфицирования *P.aeruginosa* и другой грамотрицательной микрофлорой [179, 200].

В национальных регистрах также представлена информация по частоте осложнений: пневмоторакса, аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА), сахарного диабета, новообразований, цирроза печени и других заболеваний. Везде регистрируется увеличение частоты осложнений с возрастом пациентов [135].

В большинстве регистров отображается динамика как медикаментозного лечения, так и физиотерапевтических подходов. В европейском регистре содержатся данные по уровню использования препаратов базисной терапии (дезоксирибонуклеаза, панкреатические ферменты), гипертонического раствора хлорида натрия, бронходилататоров, урсодезоксихолевой кислоты, ингалируемых антибиотиков, макролидов). Кроме того, в регистр МВ США включен раздел таргетной терапии модуляторами функции белка CFTR как монопрепаратом (ивакафтор), так и комбинированным (Оркамби) [89], тогда как в европейском регистре 2017 г. подобные данные отсутствуют [109].

Несмотря на то, что не создан единый шаблон для международного регистра, вследствие чего не всегда можно сравнить данные, имеющиеся демографические показатели, данные диагностики и генетики, нутритивный функциональный статусы пациентов с МВ отражены достаточно полно. Это позволяет сравнивать различные популяции пациентов для понимания общих закономерностей патогенеза МВ и особенностей болезни в разных регионах мира с целью корректного планирования организационных, диагностических, терапевтических подходов [14, 54, 156, 217].

В России национальный регистр МВ является совместным проектом общероссийской общественной организации «Российская ассоциация для больных МВ» и Российского респираторного общества [2, 30, 39]. Первые работы по его составлению ведутся с начала 2000-х г. [15] и позволили оценить выживаемость пациентов с МВ в регионах (медиана составила 25 лет, у женщин 22 г., у мужчин 29 лет) [1]. В последующие годы был создан ряд региональных регистров, в которых анализировались локальные выборки пациентов [6, 12, 27, 28, 29, 31, 47, 48]. Общероссийский регистр был создан с учетом рекомендаций Европейского регистра МВ (ECFSPR) в 2011 г. и ежегодно обновляется. Форма заполнения российского регистра включает не только все требуемые для включения в Европейский регистр параметры, но и ряд дополнительных показателей [26]. Обязательный критерий для включения в регистр – диагноз МВ, подтвержденный на основании клинической картины, положительного потового теста и/или генной диагностики.

В 2017 г. в регистр были включены данные 81 региона-субъекта Российской Федерации (в 2011 г. 16 регионов и г. Новосибирск). Динамика численности пациентов в регистре с 2011 по 2017 г. характеризуется ежегодным ростом (2011 – 2014 гг.) с последующей стабилизацией на уровне 2 900 – 3 100 человек (2015 – 2017 гг.). Количество центров МВ для взрослых всё еще меньше, чем детских центров, поэтому для расчета предполагаемого числа пациентов проводится экстраполяция средних показателей регионов с полноценным представлением данных по всем возрастным группам. При таком подходе очевидно приблизительное количество пациентов в РФ (в 2017 г. – 3 425 человек) и оценивается примерный ежегодный прирост (100 – 150 человек). Средняя частота МВ по стране составила 2,332 человек на 100 000 населения. Средний возраст и медиана пациентов РФ за период 2011 – 2017 гг. выросли незначительно: 2011 г. –  $11,5 \pm 8,9$  (9,5 (14,0)); 2017 г. –  $12,1 \pm 9,4$  (9,7 (11,9)). Доля пациентов старше 18 лет снижается: в 2011 г. – 25,0%, в 2017 г. – 22,3%. Доля пациентов с диагнозом МВ по неонатальному скринингу (НС)

выросла с 28,8% (2011 г.) до 47,8% (2017 г.), что обуславливает стабильную ежегодную динамику новых диагнозов. Постепенное внедрение в диагностическую практику таких информативных генетических методов, как высокопроизводительное секвенирование (NGS, next-generation sequencing) [36, 86, 146, 151], анализ крупных перестроек методом MLPA (multiplex ligation probe amplification, мультиплексная зависящая от лигирования амплификация зондов) [37, 184, 192] существенно увеличило число выявляемых мутаций в гене *CFTR* (в 2011 г. – 73, в 2017 г. – 196). При этом охват генетическими исследованиями колебался от 91,8% в 2011 г. до 92,4% в 2017 г. с незначительной тенденцией к снижению в 2012 – 2016 гг. в связи с включением в регистр территорий с неполным охватом генетической диагностикой. Для ряда частых мутаций наблюдались изменения в их аллельной частоте: например, улучшение генетической диагностики привело к увеличению частоты мутации E92K с 2,4% до 3,0%, а включение в регистр новых регионов с этническими особенностями (Северный Кавказ, Приволжье) продиктовало снижение частоты «славянской» мутации CFTRdele2,3 (2011 г. – 6,32%, 2015 г. – 5,68%) [37, 132, 185, 186].

Нутритивный статус и показатели респираторной функции с 2011 г. по 2017 гг. не претерпели заметных изменений (медиана перцентиля ИМТ у детей варьировала в пределах 26,5 (44,4) – 29,5 (50,1), медиана ИМТ среди взрослых – 18,8 (3,9) – 19,0 (4,2). Средние значения ОФВ<sub>1</sub> с 2011 по 2017 гг. отмечались в пределах 74,2 – 75,4% от должного, ФЖЕЛ находилась в диапазоне 83,3 – 84,6% от должного [26]. В микробиологическом профиле пациентов с МВ в РФ не отмечалось существенных изменений: частота основных патогенных микроорганизмов приблизительно на одном уровне: *S.aureus* – 31,1 – 32,4%; комплекс *B.ceracia* – 6,0 – 7,9%; *S.maltophilia* – 3,3 – 3,9%, нетуберкулезные микобактерии – 0,7 – 1,6%. Отмечена тенденция к увеличению распространенности видов *Achromobacter* (в 2014 г. – 3,2%, в 2017 г. – 4,6%). Сохраняется высокая частота патогенов комплекса *B.ceracia*: наибольшая

распространенность в 2011 г. отмечалась для возраста 20 – 24 года, но в 2017 г. этот «пик» перешел в группу 24-28 лет. Тревожной является тенденция к увеличению инфицирования *V.serasia* детей: в 2011 г. – 3,6%, в 2017 г. – 4,3%.

Частота осложнений МВ мало изменилась за период ведения регистра (исключение – частота остеопороза снизилась с 14,5% до 6,3% за период 2011 – 2017 гг.). В то же время существенно изменилась динамика медикаментозной терапии. Некоторые виды лечения симметрично увеличились в группах детей и взрослых с МВ за период 2011 – 2017 гг.: ингаляции гипертонического раствора натрия хлорида (с 8,7% до 63,0%), применение ингаляционных антибиотиков (с 41,3% до 48,5%). Наблюдалось снижение использования у детей внутривенных антибиотиков (с 71,4% в 2011 г. до 51,8% в 2017 г.) и системных глюкокортикостероидов (с 8,7% до 4,0%). По мнению [26], отсутствие динамики в фенотипических проявлениях обусловлено как малым периодом наблюдения (7 лет), так и неоднородностью общенационального регистра МВ вследствие различий в уровне медицинской помощи между регионами России.

### 1.3. Этиология и патогенез муковисцидоза

Этиология МВ носит генетический характер [87]. Ген трансмембранного регулятора кистозного фиброза (cystic fibrosis transmembrane regulator, *CFTR*) состоит из 27 экзонов, занимая приблизительно 250 000 пар нуклеотидов на участке хромосомы 7q31.2 (рис.1). Почти 30 лет назад вариант р.Phe508del (F508del) был идентифицирован в качестве самой частой генетической причины МВ [138]. Расшифровка «фазирования» экзонов – т.е., соответствия границ экзонов триплетам нуклеотидов в кодоне, позволяет до некоторой степени прогнозировать тип возникающих мутаций: так, протяженные делеции могут вызывать сдвиг рамки считывания (что ведет к образованию стоп-кодона), когда два экзона соединяются конец-в-конец (например, экзоны 1 и 4). Когда экзоны объединяются, находясь в одной фазе, считается, что сдвига рамки

считывания не происходит, соответственно, синтезируется лишь укороченная (truncated) версия мутантного протеина [220].

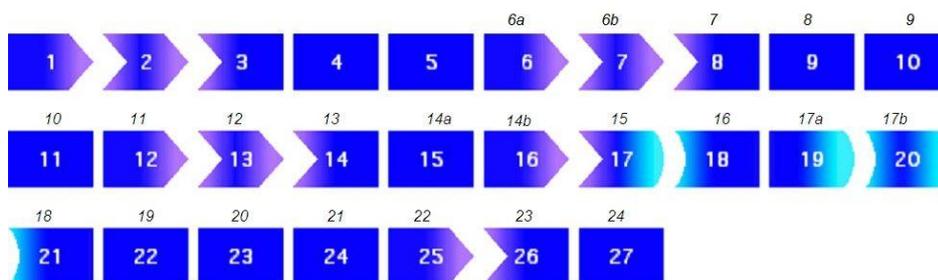


Рис. 1. Нумерация экзонов в гене *CFTR* (курсивом – традиционная номенклатура) (адаптировано из [220]).

Белок CFTR (1480 аминокислот, 168 кДа) экспрессируется на поверхности большинства эпителиальных клеток, относится к семейству АТФ-связывающих белков и содержит по два нуклеотид-связывающих, трансмембранных и один регуляторный домен. CFTR изменяет свою конформацию при связывании АТФ, тем самым обеспечивая транспорт хлорид-ионов из клетки [117]. Использование современных методик крио-электронной микроскопии позволило расшифровать и визуализировать трехмерную структуру белка CFTR с беспрецедентной степенью в 3,9 Å [75].

Белок осуществляет секрецию жидкости подслизистыми железами дыхательных путей за счет абсорбции хлорид-ионов на апикальных мембранах клеток поверхностного эпителия и параллельной абсорбции ионов натрия через натриевые каналы ENaC [199]. Баланс транспорта ионов обеспечивает оптимальный объем поверхностной жидкости в дыхательных путях, что регулирует степень мукоцилиарного клиренса от слизи и бактерий [108]. При МВ происходит смещение баланса, в результате объем поверхностной жидкости сокращается, вязкость секрета увеличивается и снижается эффективность бактериального клиренса [107].

Снижение концентрации хлорид-ионов в околоклеточном пространстве активирует натриевый канал ENaC, обеспечивающий транспорт ионов натрия в клетку. Снижение концентрации NaCl у поверхности клетки вызывает

уменьшение сил осмоса и объема воды, поступающей к клетке, что приводит к снижению гидратации воздушных путей и эффективности мукоцилиарного клиренса. Развивается дегидратация поверхности, повышается вязкость слизи и за счет компрессии снижается функция ресничек. Особенность слизи при МВ – мелкий размер пор [102] (менее 0,1 мкм при норме 0,2 – 1 мкм), что затрудняет проникновение нейтрофилов [68] и позволяет бактериям на поверхности слизи формировать макроколонии в виде биопленок, особенно устойчивых к действию иммунной системы и антибактериальной терапии [130, 173]. Оценка степени микробного разнообразия (микробиома) играет важную прогностическую роль при МВ [8].

К концу 2019 г. в международной базе данных Cystic Fibrosis Mutation Database [90, 97] содержится информация о более, чем 2 000 мутаций в гене *CFTR*. Данная база данных является одной из первых и наиболее успешных локус-специфичных баз данных (Рис.2).

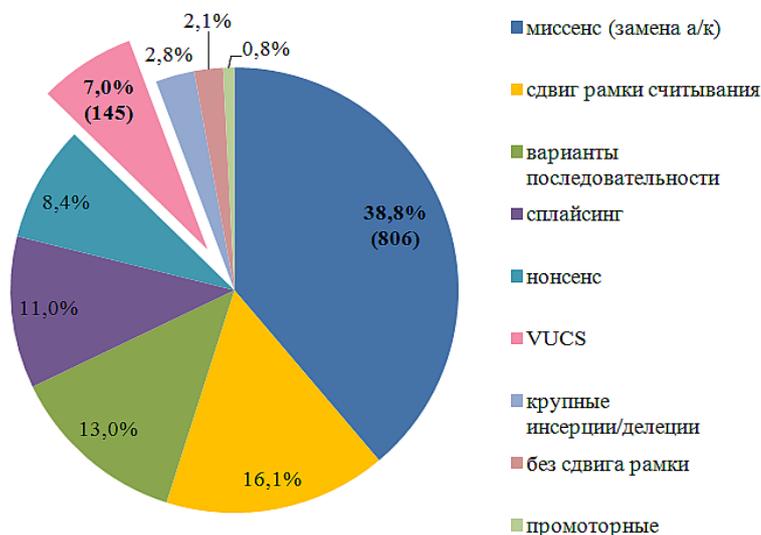


Рис. 2. Структура мутаций CF Mutation Database (CFTR1; <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>; доступ 01.01.2020). Всего в базе по состоянию на 01.01.2020 г. описано 2 076 мутаций.

Среди всех описанных вариантов, 39% являются аминокислотными заменами, 36% влияют на процессинг мРНК (включая типы мутаций нонсенс, сдвиг рамки считывания, мис-сплайсинга), около 3% - крупные перестройки, 1% - мутации в промоторной области, 13% - нейтральные варианты, у 7% влияние мутации неизвестно (так называемые варианты с неизвестным клиническим значением, VUCS (variants with unknown clinical significance). Мутации выявлены во всех областях гена (кодирующих, интронных, регуляторных). Чаще встречаются мутации в нуклеотид-связывающих и регуляторном доменах [190, 210].

Имеется две общепринятых классификации мутаций в гене *CFTR*, отличающиеся друг от друга по эффекту, оказываемому мутацией на клинические последствия (клиническая классификация) либо на функциональные последствия на молекулярном уровне (молекулярная классификация). Согласно клинической классификации, все мутации в гене *CFTR* объединяют в четыре группы [80]:

А – мутации, приводящие к МВ (F508del, R553X, R1162X, 2184insA, 2184delA, 3120+1G>A и др.);

Б – мутации, приводящие к связанным с геном *CFTR* заболеваниям (R117H-T5(\*), R117H-T7(\*), TG13-T5(\*), TG12-T5(\*), D1152H(\*), S977F и др.);

В – мутации без клинических проявлений (I148T, R75Q, 875+40A/G, M470V и др.)

Г – мутации с неясным/недоказанным клиническим эффектом (большинство миссенс-мутаций).

Необходимо отметить, что гетерогенность клинических проявлений у пациентов с «пограничными» мутациями определяется влиянием разных факторов: окружающей среды, генов-модификаторов, возраста [19, 198].

Согласно молекулярной классификации, все мутации в гене *CFTR* условно делят на пять классов, в зависимости от механизма, лежащего в основе нарушений нормальной белковой функции [70, 154] (Рис.3).

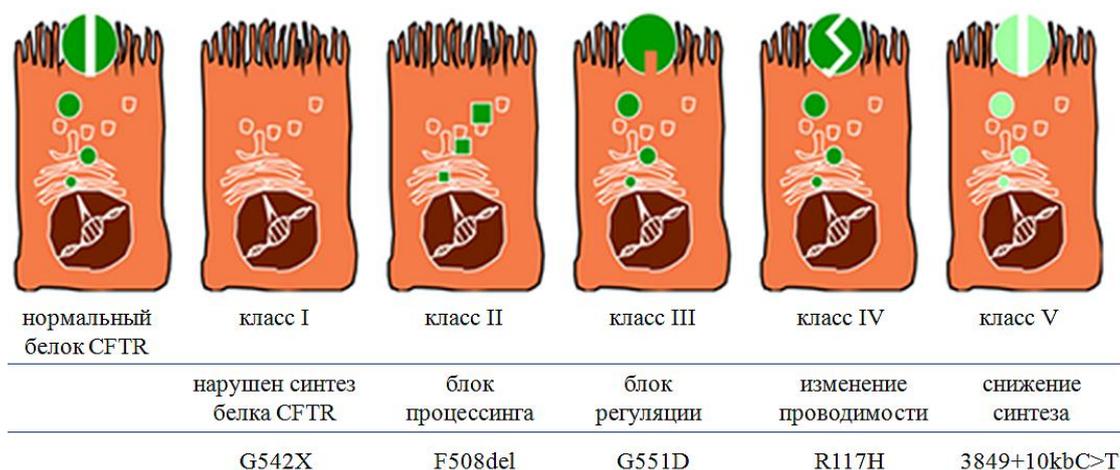


Рис. 3 Молекулярная классификация мутаций в гене *CFTR* (адаптировано из [195]).

Класс I (нарушение синтеза белка): нонсенс-мутации (например, G542X, W1282X), мутации сдвига рамки считывания (394delTT, 2143delT, 2184insA, 1677delTA), обширные перестройки (CFTRdele2,3) встречаются у 10% пациентов и ведут к серьезным фенотипическим проявлениям вследствие нарушения нормальной транскрипции мРНК и синтеза нестабильного укороченного (truncated) белка, который быстро деградирует внутри клетки [118].

Класс II (нарушение процессинга белка): мутации (F508del – самая распространенная среди населения европейского происхождения; N1303K, W1282R, R1066C) ведут к неправильному сворачиванию (folding) белковой молекулы, что определяет нарушение внутриклеточного транспорта к апикальной мембране и последующую протеасомной деградацией атипичных молекул. Уровень экспрессии белка значительно снижается [178].

Класс III (нарушение регуляции хлорного канала): встречаются у 4-5% пациентов, приводят к неправильной регуляции открытия ионного канала (G551D – самая частая мутация в странах Северной Европы) и минимальной остаточной функции белка [180].

Класс IV (изменение проводимости): редкие инсерции/делеции без сдвига рамки считывания (L138ins), миссенс-мутации (R177H, R334W), влияющие на мембран-связанные домены. Белок экспрессируется на поверхности клетки, но

из-за уменьшения времени открытия канал проводит сниженный поток ионов. Наблюдается широкий спектр клинических проявлений – от практически полного отсутствия клинической картины до тяжелой панкреатической недостаточности [49].

Класс V (снижение синтеза функционального белка): мутации, определяющие снижение уровня нормального белка за счет нарушения сплайсинга мРНК (E92K, A455E, 3849+10kbC>T, 3272-16T>A). В разных тканях может наблюдаться вариабельность уровней нормальных и нефункциональных молекул белка CFTR. В результате формируется мягкий фенотип заболевания [50].

#### 1.4. Клиническая картина муковисцидоза

Если исходить из моногенной природы заболевания, корреляция фенотипа с генотипом при МВ представляется не такой очевидной. Фенотип при МВ определяется комплексным взаимодействием белка CFTR с другими ионными каналами, осуществляющими транспорт хлорид-ионов в тканях, и разной чувствительностью тканей к мутациям в гене *CFTR* [13]. Клинические проявления МВ являются следствием взаимодействия собственно генных мутаций, генов-модификаторов и факторов окружающей среды [119, 199].

Дыхательные пути вовлекаются в процесс уже на 1-м году жизни. Как правило, после вирусного (РСВ, адено-/риновирусы, грипп, парагрипп) поражения трахеи и присоединения бактериальной флоры появляются симптомы в виде стойкого сухого кашля, одышки, приступов удушья. Повторные бронхиты, бронхиолиты, пневмонии развиваются на фоне хронической инфекции бронхов и мукостаза. Затем основными жалобами являются кашель с вязкой мокротой, одышка, усталость при незначительной физической нагрузке. Характерная особенность – непрерывно-рецидивирующее течение инфекционно-воспалительного процесса и развитие стойких изменений

трахеобронхиального дерева (бронхоэктазов, пневмофиброза) с развитием дыхательной недостаточности.

Развивается экзокринная недостаточность поджелудочной железы, которая проявляется стеатореей, нарушением усваивания жиров, отставанием в физическом развитии. Почти у половины больных МВ нарушения стула встречаются с первых дней жизни. Характерен вторичный дефицит жирорастворимых витаминов А, Е, D, К. По мере взросления из-за вовлечения в процесс бета-клеток островков Лангерганса у 1/5 пациентов развивается инсулин-зависимый сахарный диабет [16, 187].

Меконеальный илеус развивается у 15 % новорожденных больных МВ [23], а чуть позже почти у 1/5 больных за счет обструкции каловыми массами и вязким секретом слизистой просвета кишечника на уровне илеоцекального угла формируется эквивалентное состояние – синдром дистальной интестинальной обструкции [124, 160]. У ¼ пациентов в возрасте 1 – 2 лет отмечается выпадение прямой кишки (ректальный пролапс) [18, 166].

У большинства пациентов развивается той или иной степени фиброз печени, у 5% больных – билиарный цирроз печени с синдромом портальной гипертензии [17]. В 2% случаев развивается печеночная недостаточность. У 10-30% пациентов отмечается желчнокаменная болезнь с прямой зависимостью частоты холелитиаза от возраста.

Практически у всех мужчин (97%) с МВ вследствие атрофии или атрезии и обструкции *vas deferens* развивается обструктивная азооспермия, но сперматогенез не нарушен [41, 98]. Проблема бесплодного брака в таких семьях решается новыми методами экстракорпорального оплодотворения. Кроме того, недавно было установлено, что наличие патогенного варианта гена *CFTR* 3849+10kbC>T является статистически значимым фактором возможного сохранения фертильности у мужчин с МВ [40].

## 1.5 Диагностика муковисцидоза

Тяжесть клинических проявлений МВ с тенденцией к прогрессированию определяют необходимость самой ранней и точной диагностики [76], что в перспективе улучшает прогноз заболевания. Современную диагностику МВ подразделяют на 3 вида в зависимости от времени постановки диагноза: 1) пренатальная диагностика; 2) неонатальный скрининг; 3) постнатальная при клинических проявлениях.

Пренатальная диагностика в информативных семьях проводится в медико-генетических консультациях в виде генной диагностики после амниоцентеза в семье носителей мутаций, либо уже имеющих больных МВ детей. Гиперэхогенный кишечник при УЗИ плода является характерным признаком МВ и в 60% случаев проявляется мекониевым илеусом [23].

Широкое распространение программ неонатального скрининга МВ в мире с конца XX века, а в Российской Федерации с 2006 г. позволяет проводить пресимптоматическую диагностику в самом раннем детском возрасте [51, 77, 192]. Основную группу риска по МВ в России составляют новорожденные с неонатальное гипертрипсиногенемией. Рядом исследований было доказано, что вовремя начатая стандартная терапия МВ приводит к улучшенным показателям выживаемости детей [217, 223], физического и когнитивного развития [201], функций дыхательной системы [25, 72, 77, 92], наблюдается также снижение уровня психологического стресса в семье во время диагностического поиска [71]. До начала эры скрининга новорожденных раннее выявление случаев МВ было возможно только при развитии мекониевой кишечной непроходимости, либо при отягощенном семейном анамнезе. В других случаях диагноз ставился при развернутой клинической картине, часто при развитии тяжелых осложнений. По опыту развитых стран, где массовый скрининг новорожденных проводится более 25 лет, диагноз МВ без клинических симптомов может быть установлен до шестой недели после рождения ребенка [83]. Современные стандарты европейских программ диагностики ограничивают сроки проведения

осмотра ребенка с предварительным диагнозом МВ, выставленным на основании данных НС, до 35 – 58 дней [77].

До настоящего времени не создано универсального протокола НС МВ, который удовлетворял бы требованиям высокой специфичности и чувствительности одновременно, и был идеальным с клинической, экономической, этической точек зрения (консенсус-протокол). По мнению специалистов [79, 213], идеальный протокол НС МВ невозможен в принципе, и только аккуратный выбор стратегии помогает оптимизировать эффективность скрининга. Выявление ложноположительных, как и ложноотрицательных результатов – «врожденная» черта скрининговых программ [128, 211].

У каждого варианта подхода НС МВ есть свои преимущества и недостатки. По мнению [222], у подхода ИРТ/ИРТ по сравнению с ИРТ/ДНК, наблюдается большее число задержек в диагнозе в связи с пропущенными ложноотрицательными случаями. Скрининг ИРТ/ДНК является более чувствительным вследствие сниженного на 3 – 5% порогового уровня ИРТ, однако, при этом возрастает количество выявляемых случаев носительства одной мутации в гене *CFTR* [79, 213]. Ситуация выявления клинически здорового носителя мутации является достаточно противоречивой, однако, актуальность полученной информации важна в медико-генетическом консультировании при планировании семьи [129, 139].

При атипичном течении МВ возможна поздняя диагностика даже у взрослых [10, 52], у которых функции легких и поджелудочной железы сохранены или незначительно снижены, поэтому заболевание протекает более «мягко» [32]. С целью решения проблемы диагностики МВ разработаны клинические критерии, согласно которым наличие характерного клинического синдрома совместно с доказательством нарушения функции хлорного канала определяют диагноз МВ [112]. С учетом всех достижений в 2013 г. группа экспертов Европейского общества МВ (ECFS) выпустила рекомендуемые стандарты диагностики [78, 205], согласно которым диагноз МВ ставится в

случае наличия положительного потового теста (хлориды пота более 80 ммоль/л при непрямом определении) и/или двух клинически значимых мутаций гена *CFTR* и доказанной неонатальной гипертрипсиногемии (двукратного повышения уровня ИРТ), или наличия характерных проявлений в виде диффузных бронхоэктазов, высева патогенной микрофлоры, экзокринной недостаточности поджелудочной железы, обструктивной азооспермии).

Потовый тест (проба) до настоящего времени является золотым стандартом неинвазивной инструментальной диагностики МВ [45, 82]. В основе метода лежит феномен повышения концентрации электролитов в потовой жидкости пациентов с МВ [64]. Исследование целесообразно проводить у новорожденных весом не менее 3 кг и старше 2-х недель при отсутствии системных нарушений. Распространены две методики потового теста: 1) стандартный метод Gibson-Cooke в модификации, распространенный в европейских и американских центрах МВ – количественный титрометрический метод, при котором пот собирают на фильтровальную бумагу или марлю после ионофореза пилокарпином, затем взвешивают и проводят суточную элюцию электролитов [121, 159]. С помощью коммерческой системы Macroduct [126] стимуляция и сбор потовой жидкости проводится в специальный коллектор (трубочку в виде спирали) с последующим переносом образца в хлоридометр, что исключает его загрязнение и высыхание; 2) измерение проводимости пота на системах Nanoduct, Sweat-Check – используется в качестве скрининг-метода в большинстве европейских центров МВ. Необходимо учитывать, что получаемый результат характеризует общую концентрацию всех ионов потовой жидкости и поэтому превышает истинную концентрацию хлорид-ионов на 15-20 ммоль/л [227]. В России потовый тест с использованием Nanoduct стал широко использоваться в рамках мероприятий неонатального скрининга вследствие ряда преимуществ перед классическим методом: возможностью обследования новорожденных и детей с дефицитом массы тела в короткое время (30-40 минут) с минимальным влиянием технических ошибок оператора.

При получении повторных пограничных результатов потового теста целесообразно проведение генной диагностики и оценки экзокринной функции панкреатической железы. В ряде зарубежных центров проводится методика NPD (nasal potential difference) – исследование разности назальных потенциалов (между электродами на слизистой оболочке носа и предплечье) [24, 194, 207]. Инвазивный вариант метода, позволяющий непосредственно оценить функцию хлорного канала, является разность кишечных потенциалов – измерение тока в биоптате кишечника [197].

Консенсус по МВ рекомендует проводить генетическую диагностику МВ в 2 этапа [80, 100]. Вначале ведется поиск самых частых (мажорных) мутаций в популяции, к которой принадлежит обследуемый. Во многих развитых странах Европы и Америки используют специфичные панели по 25-35 мутаций, позволяющие выявить до 75 – 90% всех мутантных аллелей гена *CFTR* [106]. В федеральных генетических используется панель из 25-28 мутаций, как наиболее частых в мире, так и специфичных для России [36, 37]. На 2-м этапе ведется расширенный поиск редких патогенных вариантов последовательности ДНК с использованием методик, чувствительных к наличию ошибочно спаренных нуклеотидов (мисматчей) в двуцепочечной ДНК (дцДНК), содержащих мутацию: анализ кривых плавления высокого разрешения (HRMA) [59, 115, 142], анализ конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (SSCP, single-strand conformation polymorphism) [136], гель-электрофорез в градиенте денатурации (DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis) [168]. В России подобные методы не получили распространения, а в других странах стали быстро вытесняться с 2010 г. активно развивающимися методами секвенирования нового поколения (NGS) [66, 146, 176]. К настоящему времени и в зарубежных странах, и в федеральных генетических центрах России принята тактика проведения секвенирования гена *CFTR* после тестирования панели частых (до 30) мутаций. Для детекции обширных структурных перестроек (делеций, инсерций) в гене *CFTR* используется метод

мультиплексной амплификации лигированных зондов (MLPA, multiplex ligated probe amplification) [158].

На региональном уровне практически невозможно обеспечить подобный алгоритм за счет как дефицита современного оборудования для классического секвенирования по Сэнгеру, так и для NGS, и нехватки квалифицированных кадров и низкого потенциального потока образцов для исследований.

Дифференциальный диагноз при МВ проводят с широким кругом заболеваний: в первую очередь – с абсцедирующими стафилококковыми пневмониями, хронической пневмонией, коклюшем, бронхиальной астмой, пороками развития бронхолегочного аппарата, синдромом Швахмана-Даймонда, системными заболеваниями, протекающими с изменениями в легких [67, 95, 150, 196].

Таким образом, проблема диагностики МВ связана с разнообразием фенотипических проявлений заболевания, что обусловлено генетическим полиморфизмом (разные мутации в одном и том же гене по разному влияют на функцию белка). Несмотря на прогресс в области терапии и высокую степень соответствия международным стандартам, молекулярная диагностика МВ в России все еще остается проблемой, особенно для отдаленных регионов. Внедрение в клиническую практику новых методов определения мутаций (методы NGS) не всегда сопровождается доступностью подобных исследований для общей массы населения России. Исследования NGS весьма продолжительны (1-2 месяца), являются по сути ретроспективными, и несут небольшую информационную ценность для клиницистов. Поэтому на данном этапе развития медицины в России востребованными будут такие молекулярно-генетические методы, которые позволят в кратчайшие сроки определять генетическую природу МВ.

## 1.6. Лечебные подходы

Ожидаемая продолжительность жизни при МВ резко улучшилась в последние десятилетия [218]. Тем не менее, большинство пациентов с МВ все еще умирают от дыхательной недостаточности [39]. Поэтому основной целью терапии является замедление прогрессирования болезни легких. Терапия МВ направлена на снижение бронхообструкции, поддержку нутритивного статуса и антибактериальную защиту.

Ингаляционная терапия проводится в три этапа: 1) ингаляции с бронхолитиками ( $\beta_2$ -агонистами быстрого действия, комбинированными препаратами  $\beta_2$ -адреномиметиков с М-холиноблокаторами) для увеличения просвета бронхов и облегчения удаления мокроты; 2) ингаляции с муколитиками (дорназой альфа, гипертоническим солевым раствором, маннитолом, N-ацетилцистеином) для разжижения мокроты. Единственный муколитический препарат, который доказал свою эффективность при МВ – это Дорназа альфа. Ряд исследований продемонстрировал значимые улучшения функции легких и снижение частоты обострений у пациентов, независимо от тяжести заболевания [234]. Кроме того, Дорназа альфа замедляет прогрессирующее снижение легочной функции [214]. Эффект лечения снижается после прекращения ингаляций препарата, поэтому требуется длительная поддерживающая терапия. Эффект гипертонического 7% раствора натрия хлорида комплементарен действию дорназы альфа. Показано, что его применение улучшает функцию легких через 4 недели использования [230].

На третьем этапе проводится кинезитерапия в виде комплекса дыхательных упражнений для эвакуации мокроты из дыхательных путей (аутогенный дренаж, активный цикл дыхания, дыхательные упражнения со вспомогательными устройствами, клопф-массаж). Заключительные этапы – ингаляции с антибиотиком и (по показаниям) – ингаляции глюкокортикостероидов.

Хроническая инфекция протекает с периодическими обострениями, после которых легочная функция практически не возвращается к исходному уровню [155]. При отсутствии лечения быстрое прогрессирование инфекции, вызванной *P.aeruginosa*, является предиктором смертности пациентов при МВ [177], поэтому антибактериальная терапия должна быть начата не позже 4-й недели с момента получения положительного результата микробиологического исследования.

Имеются веские доказательства эффективности курсов эрадикации инфекции *P.aeruginosa* [144] с назначением в течение 28 дней ингаляционного тобрамицина [44] и длительным (до 3-х месяцев) применением комбинации ингаляционного колестиметата и перорального ципрофлоксацина [203]. Важное значение имеет микробиологический контроль эрадикации. При неэффективности протокола эрадикации *P.aeruginosa* показана длительная терапия ингаляционными антибиотиками. В руководстве [203] рекомендовано чередование 30-дневных курсов раствора тобрамицина в ингаляциях для пациентов старше 6 лет с хронической инфекцией *P.aeruginosa* независимо от степени тяжести заболевания. Эквивалентные дозы препарата рекомендованы также для детей младше 6 лет. Форма тобрамицина в виде порошка для ингаляций имеет сходную эффективность [125]. Ингаляционный азтреонам лизин [204] и колестиметат натрия [141] рекомендуются в качестве альтернативных препаратов.

Терапия легочных обострений требует мультидисциплинарного подхода. Пациентам необходимо регулярно корректировать мероприятия лечебной физкультуры (кинезитерапия, субмаксимальные физические нагрузки). Во время обострений энергетические потребности больного МВ повышаются, что обусловлено повышенным уровнем катаболизма при системном воспалении [105, 224]. Несмотря на снижение аппетита, необходимо поддерживать нутритивный статус диетотерапией: показаны частые приемы пищи и высококалорийная диета с нормальным или повышенным содержанием белков

и жиров (калораж 120-150% от здоровых того же возраста), добавлением жирорастворимых витаминов ежедневно [56, 65]. Дополнительное подсаливание пищи показано в условиях жаркого климата, при легочных обострениях, гипертермии. Если массо-ростовой индекс (МРИ) ребенка ниже 85 %, показаны агрессивные методы нутритивной поддержки – энтеральное зондовое питание, а в тяжелых случаях (МРИ ниже 80%) – частичное или полное парентеральное питание [46].

Коррекция экзокринной недостаточности поджелудочной железы (ЭПН) при МВ осуществляется ферментной заместительной терапией. Простой и доступный (со 2-й недели жизни) метод выявления ЭПН – определение фекальной эластазы-1 (при МВ – уровень ниже 200 мг/г) [78]. Рекомендовано использование только микрогранулированных форм панкреатина, обеспечивающих транзит через желудок, равномерное распределение в химусе и высвобождение активного препарата в тонком кишечнике. Принципы дозирования изложены в Европейских рекомендациях [105, 224]. Передозировка опасна развитием фиброзной колонопатии [101].

Использование макролидов эффективно у пациентов с МВ за счет антибактериального и противовоспалительного действий [236]. Имеются данные того, что макролиды воздействуют на *P.aeruginosa* в биопленках, что характерно для хронической инфекции [60]. Азитромицин улучшает функцию легких и снижает частоту обострений [215], в том числе у детей, не инфицированных *P.aeruginosa* [161]. Однако, имеются сомнения насчет продолжительности эффекта макролидов и возможной индукции резистентности у других бактерий.

Потенциал персонализированной терапии МВ [20, 43, 157] стал раскрываться с появлением первых таргетных препаратов, модулирующих функции дефектного белка CFTR [127, 175]. Препарат ивакафтор («Калидеко», Вертекс Фармасьютикалс Инк., США) получил в 2012 г. разрешение FDA (Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством

пищевых продуктов и медикаментов, США) и был рекомендован для клинического применения у пациентов с мутацией III класса G551D (3 – 4% от числа всех пациентов с МВ в США, и всего 2 человека в Российском регистре 2017 г.) в качестве *потенциатора* функции белка *CFTR* [93]. Было установлено, что применение препарата улучшает функцию легких и снижает частоту осложнений [180]. Интенсивные клинические испытания продолжались и в 2015 г. был одобрен следующий пероральный низкомолекулярный препарат «Оркамби», представляющий собой комбинацию люмакафтора (в дозе 200 мг) и ивакафтора (125 мг) для пациентов с МВ старше 12 лет, гомозигот по самой частой мутации F508del [120, 189]. Люмакафтор относится к классу *корректоров* функции белка *CFTR*, усиливая конформационную стабильность мутантного протеина и его экспрессию на клеточной поверхности, чем обеспечивается эффективность действия ивакафтора [216].

В 2018 г. FDA одобрило усовершенствованный препарат «Симдеко» (комбинация тезакафтора и ивакафтора) с меньшим числом побочных реакций для пациентов, гомозиготных по мутации F508del [181]. В 2019 г. одобрен трехкомпонентный препарат «Трикафта» (тезакафтор + элексакафтор + ивакафтор) для пациентов старше 12 лет с одной мутацией F508del [63], что увеличило терапевтический охват популяции пациентов с МВ, для которых стала доступна таргетная терапия модуляторами, до 90%. Использование препарата «Трикафта» показало статистически и клинически значимый выход ко всем вторичным конечным точкам испытаний, свидетельствуя об улучшении функции легких и ряда других параметров (число обострений, ИМТ, уровень хлорида в потовой жидкости) [167]. Исследования в области этиопатогенетической терапии МВ продолжаются [202].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Общая характеристика работы.

Работа выполнена на кафедре детских болезней (заведующий кафедрой – д.м.н., профессор В.В. Мещеряков) медицинского института (директор института – Почётный работник высшего профессионального образования Российской Федерации, д.м.н., профессор Л.В. Коваленко) БУ ВО «Сургутский государственный университет» (ректор – Заслуженный Учитель Российской Федерации, д.п.н., профессор С.М. Косенок). Набор материала осуществлялся в медико-генетической консультации БУ ХМАО-Югры «Окружной кардиологический диспансер «Центр диагностики и сердечно-сосудистой хирургии» (главный врач – к.м.н. И.А. Урванцева), педиатрическом отделении № 2 БУ «Сургутская клиническая городская больница» (главный врач – к.м.н. М.С. Курносиков), в БУ «Нижневартовская окружная клиническая больница» (главный врач – О.Р. Юлдашев). Настоящее исследование проводилось в рамках реализации государственного задания «Генетические аспекты предиктивной, превентивной и персонифицированной медицины наследственных и возраст-ассоциированных заболеваний у человека на Севере» (руководитель – д.м.н., проф. В.В. Мещеряков.). Исследования были одобрены локальным этическим комитетом Сургутского государственного университета.

2.2. Характеристика исследования с точки зрения клинической эпидемиологии. Описание методов исследования. Дизайн исследования.

Организация исследования проведена в соответствии с требованиями клинической эпидемиологии как составляющей доказательной медицины. Исследование проведено в 3 этапа. Дизайн исследования представлен на рис. 4.

На первом этапе для решения первых 3-х задач настоящей работы проведено сплошное когортное ретроспективное исследование – анализ клинико-эпидемиологических показателей МВ на территории ХМАО-Югры за период ведения регистра заболевания (2012-18 г.г.). Критерием включения

явились все случаи установленного диагноза МВ в 2012-18 г.г., вошедшие в региональный регистр. Оценивалась динамика заболеваемости, распространённости, смертности, среднемноголетние уровни этих показателей и их прирост (убыль), динамика гендерно-возрастной структуры, среднего возраста пациентов и среднего возраста постановки диагноза с 2012 до 2018 г.г.

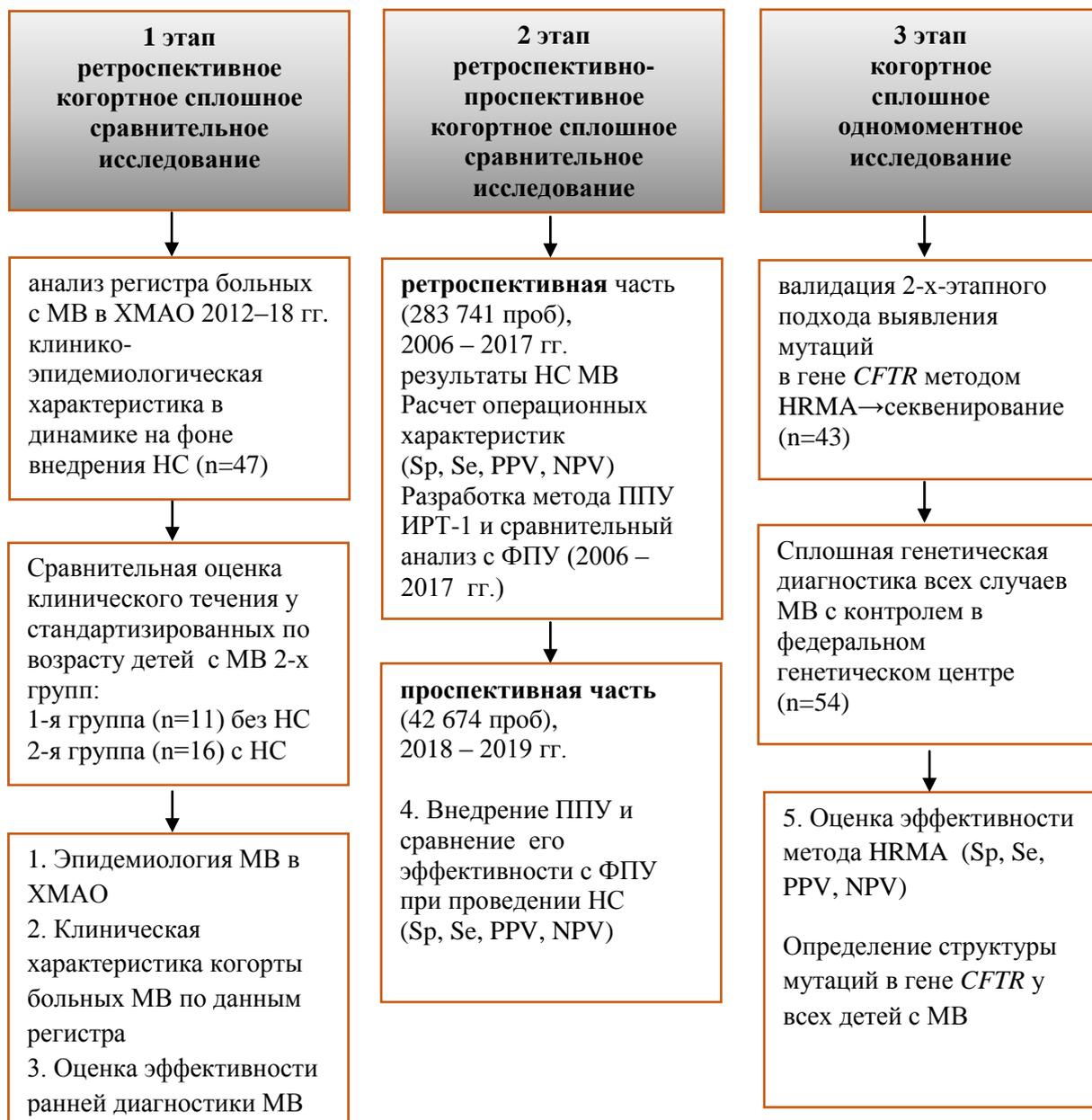


Рис. 4. Дизайн исследования.

Аналізу подвергались также клиничко-лабораторные и функциональные параметры двух групп наблюдения – детей с МВ с НС и без НС. В связи с очевидным влиянием стажа заболевания на его течение, более старшим

возрастом детей без НС, по сравнению с его наличием, в регистре 2018 года, проведена стандартизация групп сравнения по возрасту. При этом отправными точками были следующие: начало НС с 01.06.2006, начало ведения регистра - 2012 год, последние данные регистра – 2018 год. Минимальный возраст в группах определён по группе без НС: в 2012 году (первый год ведения регистра) самыми младшими были больные, рождённые в первой половине 2006 года, возраст которых в 2012 году составил 6 лет. Максимальный возраст в группах сравнения выбран по когорте детей с МВ с НС: в 2018 году максимальный возраст 12 лет имели дети с МВ, рождённые во второй половине 2006 года (начало НС). Исходя из этого принципа в группу детей с МВ без НС вошли 11 пациентов 6-12 лет (даты рождения: 01.01.2000 – 31.05.2006) из регистра 2012 года, в группу с НС – 16 детей того же возраста (даты рождения: 01.06.2006 – 31.12.2012) из регистра 2018 года. Анализировались клинические, лабораторные и функциональные показатели больных, полученные путём выкопировки данных из регистра 2012 и 2018 г.г. и историй болезней пациентов.

На втором этапе для решения 4-й задачи проведено сплошное ретроспективно-проспективное когортное исследование, в которое на этапе оценки эффективности НС МВ и определения ППУ ИРТ включались результаты всех новорожденных детей на территории ХМАО-Югры с 2006 по 2017 г. (ретроспективная часть) и результаты НС МВ за 2018-2019 гг. (проверочный этап исследования, проспективная часть). Критериями включения для обоих исследований явились новорождённые дети обоего пола в возрасте 3 – 40 дней, которым проводился забор периферической крови (из кожи пятки) в рамках выполнения процедур НС. Критерии исключения – письменный отказ родителей от повторного проведения забора крови (зафиксировано в журналах), смерть ребенка в раннем неонатальном периоде, переезд семьи в другой регион.

Уровни биохимического маркера ИРТ измеряли с помощью наборов AutoDelfia/Delfia Neonatal IRT kits (Perkin-Elmer, Финляндия) на приборе-счетчике Wallac 1420 Multilabel Counter Victor-2 методом time-resolved флуоресценции. Рукописные данные уровней ИРТ-1, ИРТ-2 с соответствующими датами рождения детей, забора биоматериала на первичное и повторное исследования [35] были выкопированы из лабораторных журналов НС в рабочие листы программы MS Office Excel. Статистическая обработка данных (подсчет числа ложноположительных результатов, общего количества исследований за каждый исследуемый промежуток времени) проводилась в программе MS Office Excel. Расчет плавающего порогового уровня (ППУ) проводился с использованием программы fIRT (floating level of IRT), разработанной совместно с IT-специалистами БУ ВО «Сургутский государственный университет».

Для всех 32-х подтвержденных случаев МВ, выявленных с помощью НС в период 2006 – 2017 гг., расчет ППУ проводился ретроспективно, исходя из следующих параметров:  $n=500$  до регистрации случая МВ («целевого» образца) и  $n=500$  после регистрации, где  $n$  – число обследованных на ИРТ-1 образцов сухих пятен крови. ПО fIRT автоматически проводило лог-нормализацию выборки и выстраивало гистограмму лог-нормального распределения, визуализирующую уровни ИРТ-1 для каждой 1 000 образцов, среди которых ровно в середине пронумерованного списка выборки располагался «целевой» образец. Удаление большинства грубых «выбросов» (т.е. результатов с сильно отклоняющимися от принятого диапазона значений ИРТ-1) в «корзину ретеста» проводилось автоматически по правилу «трех сигм». Далее осуществлялся расчет порога на уровне 99,5 перцентиля, и образцы, выходящие за пороговый уровень, также отправлялись в «корзину ретеста» (ложноположительных случаев). Во время проспективного этапа исследования результатов НС МВ в период 2018-2019 гг. использовали в сравнении оба подхода – стандартный (с фиксированным ПУ ИРТ-1 на уровне 57,8 нг/мл) и инновационный (с ППУ),

при котором наполнение выборки данных динамично менялось каждый рабочий день таким образом, чтобы при добавлении новых результатов в выборку такое же количество «старых» результатов было удалено, и общая совокупность выборки ограничивалась 1 000 значений ИРТ-1 (т.н. принцип «скользящего окна», windowing). Один случай ложноотрицательного результата НС МВ в 2012 г. был подвергнут молекулярно-генетическому анализу. Из обоих архивированных сухих пятен крови (для ИРТ-1, ИРТ-2), относящихся к соответствующему ребенку, была выделена гДНК методом экстракции на колонке (набор “QIAamp DNA Micro kit”, Qiagen, Германия). Идентичность гДНК в разных бланках НС определяли методом ПЦР для 12 SNPs (тест-системы «Генетика Метаболизма Фолатов», «КардиоГенетика Тромбофилия», производства «ДНК - Технология», Россия).

На третьем этапе для решения 5-й задачи для верификации применимости последовательно выполняемых молекулярно-генетических методик (анализ кривых плавления высокого разрешения (HRMA) и классическое секвенирование по Сэнгеру) с целью оптимизации генной диагностики в условиях региональной лаборатории (расширение спектра мутаций) было проведено сплошное когортное одномоментное исследование.

Нами впервые в РФ апробирована методика HRMA на первом этапе генной диагностики МВ, позволяющая на основе «сканирования» нуклеотидной последовательности экзонов и экзон-интронных границ гена *CFTR* на предмет мутаций (в т.ч. *de novo*) определять конкретный экзон (экзоны) для дальнейшего селективного секвенирования по Сэнгеру с целью диагностики типа мутации (мутаций). При этом отпадает необходимость секвенирования всего гена, что радикально ускоряет весь процесс диагностики и расширяет спектр найденных мутаций. Достоинством метода является его доступность для региональных лабораторий.

Для верификации (установления применимости) метода HRM-анализа было проведено сплошное исследование 43 контрольных образцов геномной

ДНК (гДНК). В группу вошли 38 образцов гДНК, выделенных из образцов периферической венозной крови пациентов с подтвержденным диагнозом МВ и выявленными мутациями в гене *CFTR*, и 5 образцов гДНК от здоровых доноров. Мутации были выявлены ранее на базе генетической лаборатории «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (г. Санкт-Петербург) методом NGS с последующим подтверждением прямым секвенированием по Сэнгеру.

Для проведения расширенной генной диагностики мутаций в гене *CFTR* для всей группы пациентов окружного регистра в количестве 54-х человек с подтвержденным диагнозом МВ использовали периферическую венозную кровь, отобранную в вакуэтты с ЭДТА.

Геномную ДНК выделяли из образцов крови методом колоночной экстракции из набора “QIAamp DNA Blood Mini Kit” (Qiagen, Германия), согласно инструкции. Для выделения гДНК из сухих пятен крови на бланках НС использовали набор “QIAamp DNA Micro Kit” (Qiagen, Германия). ПЦР с последующим HRM-анализом проводились в соответствии с протоколом Audrezet [59] и рекомендациями производителя набора для HRM “Precision Melt Supermix” (Bio-Rad, США) на термоциклере “CFX96” (Bio-Rad, США) с опцией контролируемого плавления со скоростью 0,1°C/сек. Для обработки результатов HRMA использовалось программное обеспечение “Precision Melt Analysis Software” (Bio-Rad, США).

Секвенирование отдельных экзонов гена *CFTR* выполняли на генетическом анализаторе “GenomeLab GeXP” (Beckman-Coulter, США) с использованием коммерческого набора “DTCS Quick Start kit” (Beckman-Coulter, США). Последовательности праймеров для ПЦР и секвенирующей реакции [62] были частично оптимизированы (проведен редизайн) в программе Primer3 Plus [226]. Очистка продуктов ПЦР и секвенирующей реакции проводилась с помощью наборов Agencourt (AMPureXP, CleanSEQ, соответственно), согласно инструкциям производителя.

MLPA проводили с коммерческим набором SALSA® MLPA® Probemix P091-D2 CFTR (MRC-Holland, Нидерланды) в соответствии с инструкциями производителя. Фрагментный анализ проводили на генетическом анализаторе “GenomeLab GeXP” (Beckman-Coulter, США).

### 2.3. Статистическая обработка материалов исследования.

Статистическая обработка материала осуществлялась с использованием современных принципов математического анализа медико-биологических исследований [11]. В связи с несоответствием большинства числовых совокупностей принципу нормальности их распределения, в работе применялись непараметрические методы медико-биологической статистики; характеристика вариационного ряда представлялась как Me (Q1-Q3), где Me – медиана, Q1 и Q3 – нижний и верхний (первый и третий) квартили; статистическая значимость различий показателей, выраженных долей от целого в двух сравниваемых группах исследовалась методом углового преобразования Фишера; статистическая значимость различий средних величин в группах сравнения определялась методом Манна-Уитни; связи между количественными показателями устанавливали методом ранговой корреляции Спирмена [5]. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05 во всех случаях. ППУ рассчитывали с использованием авторской программы fIRT (floating IRT) как 99,5 перцентиль всей совокупности значений ИРТ в пределах «плавающего окна» (см. Приложение №1).

Обработка данных указанными методами осуществлялась на персональном компьютере с использованием лицензионной компьютерной программы Statistica 10.0. Диагностическую эффективность метода HRM и fIRT (floating IRT) оценивали расчётом операционных характеристик диагностического теста – чувствительности (Se) и специфичности (Sp), прогностической ценности положительного (PPV) и отрицательного (NPV) результата [7, 38].

ГЛАВА 3. КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МВ У ДЕТЕЙ ХМАО-ЮГРЫ В УСЛОВИЯХ ВНЕДРЕНИЯ МАССОВОГО НЕОНАТАЛЬНОГО СКРИНИНГА В ПЕРИОД С 2012 ПО 2018 г.г.

3.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МВ У ДЕТЕЙ ХМАО-ЮГРЫ ПО ДАННЫМ РЕГИОНАЛЬНОГО РЕГИСТРА В ПЕРИОД С 2012 ПО 2018 г.г.

В таблице 1 представлены основные эпидемиологические показатели МВ в ХМАО-Югре за 7-летний период с 2012 по 2018 г.г. Обращает на себя внимание факт значительных колебаний частоты рождения детей с МВ в разрезе каждого года (от 0,0 в 2014 до 1-го случая на 5 560 живорождённых в 2012 г.). Вероятно, это связано с относительно малым числом новорождённых на отдельно взятой территории и редкостью самого заболевания.

Таблица 1

Эпидемиология МВ в ХМАО-Югре в 2012-2018 г.г.

Показатели	Годы							Средне-многолетний показатель
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	
Число пациентов с МВ	42	42	39	49	54	57	57	<b>48,6</b>
Число вновь выявленных случаев	5	2	0	4	3	3	3	<b>2,9</b>
Число умерших	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<b>0,14</b>
Численность населения (тыс. чел.)	1 573	1 591	1 605	1 619	1 636	1 651	1 662	<b>1 620</b>
Число новорождённых (тыс. чел.)	27,8	27,8	27,7	26,9	25,6	23,3	23,2	<b>26,0</b>
Распространённость на 100 000 населения	2,67	2,64	2,43	3,03	3,30	3,45	3,43	<b>3,00</b>
Заболеваемость на 100 000	0,32	0,13	0,00	0,25	0,18	0,18	0,18	<b>0,18</b>
Частота (1 случай МВ на кол-во новорождённых)	5 560	13 900	0, 00	6 725	8 533	7 767	7 733	<b>9 025</b>
Смертность на 100 000 населения	0,064	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,009</b>

Это обосновывает необходимость расчёта среднемноголетнего показателя, который за период ведения регистра (2012-18 г.г.) составил 1 случай на 9 025

новорождённых, что соответствует таковому в РФ [21]. За период ведения регистра был один случай летального исхода от МВ в 2012 году у подростка, а среди детей 0-14 лет с МВ смертности не было.

При сравнении регистров МВ шести регионов УРФО (Ямало-Ненецкий и Ханты-Мансийский автономные округа, Свердловская, Челябинская, Тюменская и Курганская области) в ХМАО-Югре установлена наибольшая распространенность МВ, что логично связать с наиболее высоким уровнем рождаемости на этой территории и как следствие - наиболее выраженным эффектом «накопления» пациентов в когорте детей в течение 2012-18 г.г. (период ведения регистров МВ). Доказательством этому являются установленные нами положительные сильные связи между рождаемостью в регионах УРФО и распространённостью МВ ( $r = 0,80$ ), удельным весом детей в структуре населения и распространённостью МВ ( $r = 0,70$ ;  $< 0,05$  в обоих случаях методом ранговой корреляции).

Таким образом, в ХМАО-Югре, в сравнении с другими субъектами УРФО, установлен наиболее высокий уровень распространённости МВ, в первую очередь - среди детей 0-14 лет, что связано наиболее высоким уровнем рождаемости на этой территории и эффектом «накопления» больных в когорте детей.

Установленные нами эпидемиологические показатели МВ в ХМАО-Югре могут быть использованы при планировании ресурсов здравоохранения для оказания медицинской помощи больным МВ на территории ХМАО-Югры.

### 3.2. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КОГОРТЫ ДЕТЕЙ С МВ В ХМАО-ЮГРЕ ПО ДАННЫМ РЕГИСТРА В ДИНАМИКЕ ЗА ПЕРИОД С 2012 ПО 2018 Г.Г. В УСЛОВИЯХ ВНЕДРЕНИЯ МАССОВОГО СКРИНИНГА ЗАБОЛЕВАНИЯ.

При анализе регистра МВ (таблица 2) установлено увеличение на 35,7% абсолютного числа пациентов в ХМАО-Югре с 2012 до 2018 г.г. главным

образом за счёт детей 0-14 лет (на 43,3%), в меньшей степени – за счёт больных старше 14 лет (на 16,7%). При этом средний возраст больных увеличился в 1,46 раза также за счёт когорты детей (в 2,1 раза), в отличие от пациентов-подростков и взрослых (в 1,23 раза), что оказалось достоверным статистически во всех возрастных группах ( $p < 0,05$ ; метод Манна-Уитни).

Таблица 2

Возрастная и гендерная характеристика больных МВ в ХМАО-Югре  
в 2012-2018 г.г.

Показатели	Годы							% прироста	p 2012 – 2018
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018		
Все пациенты									
Число пациентов с МВ	42	42	39	49	54	57	57	35,7	-
Возраст Me(Q1-Q3)	6,3 (3,1-15,1)	8,4 (4,1-17,0)	7,7 (4,9-16,8)	7,80 (4,5-14,0)	8,00 (4,9-15,0)	8,7 (5,4-16,0)	9,2 (5,2-16,0)	46,0	0,02*
М/Ж (абс)	22/20	21/21	19/20	24/25	26/28	27/30	26/31	18,2/55,0	-
М/Ж (%)	52,4/ 47,6	50,0/ 50,0	48,7/ 51,3	49,0/ 51,0	48,1/ 51,9	47,4/ 52,6	45,6/ 54,4	-	> 0,05**
в т. ч. 0-14 лет (дети)									
Число пациентов с МВ	30	29	27	37	37	39	43	43,3	-
% от общего числа с МВ	71,4	69,0	69,2	75,5	68,5	68,4	75,4	-	> 0,05**
Возраст Me(Q1-Q3)	3,78 (2,16-7,66)	4,20 (2,55-7,88)	4,88 (3,44-8,12)	5,50 (3,88-8,50)	6,70 (3,55-8,77)	7,50 (3,65-9,11)	8,00 (3,31-9,80)	111,6	0,01*
М/Ж (абс)	13/17	13/16	13/14	18/19	17/20	18/21	20/23	53,8/35,3	-
М/Ж (%)	43,3/ 56,7	44,8/ 55,2	48,1/ 51,9	48,6/ 51,4	45,9/ 54,1	46,1/ 53,9	46,5/ 53,5	-	> 0,05**
Пациенты старше 14 лет									
Абс	12	13	12	12	17	18	14	16,7	-
% от общего числа с МВ	28,6	31,0	30,8	24,5	31,5	31,6	24,6	-	> 0,05**
Возраст Me(Q1-Q3)	19,1 (16,5-21,7)	20,9 (17,6-22,7)	21,1 (18,0-23,1)	22,1 (19,0-24,1)	22,1 (16,9-24,9)	23,2 (18,2-26,5)	23,5 (19,5-27,5)	31,4	0,02
М/Ж (абс)	9/3	8/5	6/6	6/6	9/8	9/9	6/8	-33,3/ 166,7	-
М/Ж (%)	75,0/ 25,0	61,5/ 38,5	50,0/ 50,0	50,0/ 50,0	47,1/ 52,9	50,0/ 50,0	42,9/ 57,1	-	< 0,05**

Примечание: \* - метод Манна-Уитни; \*\* - метод углового преобразования Фишера

Установленную динамику изучаемых показателей логично связать с ростом числа пациентов в первую очередь детского возраста, так как за период с момента внедрения НС МВ (с 2006 г.), благодаря которому улучшилась ранняя диагностика заболевания, максимальный возраст больных в последний анализируемый год (2018) составил 12 лет. При этом в возрастной структуре больных МВ значимой динамики за исследуемый период не установлено ( $p > 0,05$ , метод углового преобразования Фишера): дети 0-14 лет во все годы наблюдения составляли около 2/3 больных МВ.

Структура пациентов по полу, как в целом, так и в когорте детей до 14 лет, статистически значимо не изменялась от 2012 до 2018 г.г. ( $p > 0,05$ , метод углового преобразования Фишера) и характеризовалась небольшим преобладанием больных девочек. Однако среди больных МВ подростков и взрослых произошли статистически значимые изменения: в 2012 году в структуре больных преобладали юноши, в 2018 – девушки ( $p < 0,05$ , метод углового преобразования Фишера).

Удельный вес больных с НС статистически значимо увеличился ( $p < 0,05$ , метод углового преобразования Фишера): в 2012 г. - 42,8%, в 2018 г. - 61,4%, в когорте детей до 14 лет этот показатель увеличился с 60,0% до 90,7% ( $p < 0,01$ , метод углового преобразования Фишера). По данным 2018 года средний возраст при установлении диагноза МВ у пациентов без НС был статистически значимо большим, чем с НС (таблица 3). При этом средний возраст больных в когорте пациентов в 2018 году без НС закономерно также был большим, чем у больных с НС. В период проведения НС диагноз МВ в абсолютном большинстве случаев устанавливался в грудном возрасте.

Для сравнительной характеристики основных клинических, лабораторных и функциональных показателей в когорте детей 0-14 лет с МВ нами взяты данные из регистра 2012 г. и 2018 г., которые представлены в таблице 4. За 7-летний период количественная и структурная характеристика когорты детей с МВ претерпела изменения, главными из которых были статистически значимые

увеличение среднего возраста пациентов ( $p < 0,01$  метод, Манна-Уитни) и рост удельного веса больных, которым проводился НС ( $p < 0,01$ , метод углового преобразования Фишера). При этом увеличился средний возраст как среди пациентов с НС, так и без него ( $p < 0,01$  в обоих случаях, метод Манна-Уитни).

Таблица 3

Сравнительная возрастная оценка пациентов с МВ с НС и без НС  
из регистра 2018 г.

Показатели	Пациенты без НС (n = 22 )	Пациенты с НС (n = 35 )	p
возраст постановки диагноза Me(Q1-Q3)	5,90 (0,79-7,56)	0,28 (0,14-1,25)	0,001*
Возраст всех пациентов с МВ, Me(Q1-Q3)	17,0 (13,0-26,0)	6,0 (3,0-8,0)	0,01*
Возраст детей 0-14 лет с МВ, Me(Q1-Q3)	13,0(12,8-13,0)	7,0(3,3-9,0)	0,01*
Диагноз установлен до 1 года, абс/%	6/27,3	25/71,4	<0,01**
Диагноз установлен от 1 г до 3 лет абс/%	3/13,6	6/17,2	<0,01**
Диагноз установлен от 3 до 7 лет, абс/%	5/22,7	2/5,70	<0,01**
Диагноз установлен от 7 до 14 лет, абс/%	6/27,3	2/5,70	<0,01**
Диагноз установлен в возрасте старше 14 лет, абс/%	2/9,10	0/0,00	<0,01**

Примечание: \* - метод Манна-Уитни; \*\* - метод углового преобразования Фишера

Сравнительная оценка параметров физического развития показала более высокие показатели роста (длины тела) и массы тела у пациентов регистра 2018 г., чем 2012 г. ( $p < 0,01$  в обоих случаях, метод Манна-Уитни), что логично связать с большим средним их возрастом. Несмотря на то, что средние величины ИМТ в когортах пациентов 2012 г. и 2018 г. статистически значимо не отличались ( $p > 0,05$ , метод Манна-Уитни), в динамике от 2012 до 2018 г.г. зарегистрировано статистически значимое уменьшение удельного веса пациентов с низким ИМТ ( $< 1$  SDS).

## Характеристика детей 0-14 лет с МВ из регистров 2012 и 2018 г.г.

в сравнении

Показатели	2012 год (n = 30 )	2018 г. (n = 43 )	p
Средний возраст детей 0-14 лет с МВ, Me(Q1-Q3)	4,0 (2,0-7,5)	7(3,3-9,0)	<0,01*
Средний возраст детей 0-14 лет с МВ с НС, Me(Q1-Q3)	n=18 2,0(0,3-3,0)	n=39 7,0(3,0-9,0)	<0,01*
Средний возраст детей 0-14 лет с МВ без НС, Me(Q1-Q3)	n=12 10,0(6,5-10,0)	n=4 13,0(12,8-13,0)	<0,01*
Уд. вес детей 0-14 лет с НС, %	60,0	90,7	<0,01**
Масса тела, кг, Me(Q1-Q3)	18,0(14,8-27,0)	22,5(15,3-27,8)	<0,01*
Рост (длина тела), см, Me(Q1-Q3)	105,0(94,1-119,1)	122,2(99,0-133,3)	<0,01*
ИМТ, кг/м <sup>2</sup> , Me(Q1-Q3)	15,1(13,8-16,1)	15,3(14,3-16,9)	>0,05*
Удельный вес с ИМТ < 1 SDS, %	40,0	18,6	<0,05**
Лучший ОФВ1 в % от нормы Me(Q1-Q3)	96,5(95,5-100,0)	90,0(87,6-101,9)	>0,05*
Хлориды пота: - % обследованных - Me(Q1-Q3)	100,0 103,9(98,2-114,7)	100,0 98,0 (75,7-108,3)	>0,05*
Генная диагностика: - известны обе мутации (%) - известна одна мутация (%) - обе мутации неизвестны (%)	13,3 83,3 3,40	100 0,00 0,00	<0,01**
Разность кишечных потенциалов (% обследованных)	0,00	0,00	-
Фекальная эластаза: - уровень охвата (%) - < 200 мкг/г (%) - > 200 мкг/г (%)	100,0 96,7 3,30	100,0 90,7 9,30	>0,05**
Нейтральный жир в кале: - высокий уровень (+++ и более, %) - нормальный и низкий (0 - ++, %)	46,7 53,3	25,6 74,4	<0,05**
Хр. колонизация Ps. Aeruginosa, %	0,00	7,00	>0,05**
Интермиттирующая колонизация Ps. Aeruginosa, %	20,0	14,0	>0,05**
Хр. колонизация St. Aureus, %	63,3	51,2	>0,05**
Хр. колонизация Burkholderia ceracia complex, %	0,00	2,33	>0,05**
Haemophilus influenza, %	0,00	0,00	-
Метициллин-резистентный St. Aureus, %	0,00	0,00	-
Негуберкулёзная микобактерия	0,00	0,00	-
Неферментирующая грам-отрицательная флора	0,00	2,33	>0,05**

Примечание: \* - метод Манна-Уитни; \*\* - метод углового преобразования Фишера

Нами не установлены статистически значимые различия между когортами пациентов из регистра 2012 и 2018 г.г. по показателю ОФВ1, который является интегральным параметром, отражающим бронхиальную проходимость ( $p > 0,05$ , метод Манна-Уитни).

Всем пациентам на этапе диагностики проводился пилокарпиновый тест с использованием аппарата «Нанодакт». Средние показатели хлоридов пота в когортах пациентов 2012 и 2018 г.г. статистически значимо не отличались ( $p > 0,05$ , метод Манна-Уитни).

В 2012 г. генетический диагноз был установлен полностью только в 13,3% случаях, у остальных пациентов была обнаружена либо только мутация в одном аллельном гене (83,3%), либо не обнаружена ни одна мутация, несмотря на полный охват пациентов генной диагностикой. В 2018 г. всем пациентам установлен полный генетический диагноз. Данная ситуация связана с тем, что в 2012 г. на региональном уровне для диагностики были доступны только мажорные мутации, а полное секвенирование гена *CFTR* было проведено лишь небольшой части пациентов в федеральном центре. В 2018 г. после внедрения нами в региональной генетической лаборатории метода анализа кривых плавления (HRMA) на первом этапе генной диагностики с последующим проведением прицельного секвенирования конкретного экзона/экзонов гена *CFTR* (см. главу 5) позволило обеспечить 100-процентную доступность для осуществления полной генной диагностики МВ.

В ХМАО-Югре, к сожалению, не внедрена методика определения разности кишечных потенциалов. В то же время для диагностики панкреатической недостаточности обеспечен полный охват пациентов исследованием фекальной эластазы. Как видно из таблицы 7, отсутствие значимой панкреатической недостаточности, как в регистре 2012 г, так и 2018 г., установлено лишь в единичных случаях у пациентов с преимущественно лёгочной формой заболевания.

Нами установлено статистически значимое уменьшение от 2012 г. до 2018 г. удельного веса пациентов со стеатореей (учитывался худший показатель в течение года - +++ и более), что было статистически значимым ( $p < 0,05$ , метод углового преобразования Фишера).

Важное значение для определения тактики антибактериальной терапии и прогноза заболевания имеет результат бактериологического мониторинга мокроты пациентов с МВ. Статистически значимых различий по частоте высева различных бактериальных агентов в когортах больных 2012 г. и 2018 г. нами не установлено ( $p > 0,05$  во всех случаях, метод углового преобразования Фишера). Однако, в 2018 г. у 3-х детей диагностирована хроническая колонизация *Ps. Aeruginosa*, у одного – *Burkholderia ceracia complex*, у одного – неферментирующая грамм-отрицательная флора (*Acinetobacter baumannii*), что обосновывает необходимость более жёсткого выполнения санитарно-противоэпидемических мероприятий и пересмотра тактики антибактериальной терапии.

У 4-х детей с МВ в 2018 году диагностирован полипоз носа, в 2012 году таких случаев не было. Таких лёгочных осложнений, как пневмоторакс и лёгочное кровотечение, за весь период ведения регистра также не было. Амилоидоз, онкологические заболевания, остеопороз, псевдо-Барттер синдром за период с 2012 по 2018 г.г. не регистрировались. В 2012 году у одного мальчика 10 лет диагностирован цирроз печени бел портальной гипертензии, в 2018 году он не вошёл в когорту детей с МВ, поскольку ему исполнилось 17 лет.

В таблице 5 представлена сравнительная характеристика методов лечения МВ в 2012 и 2018 г.г. Следует отметить, что в целом подходы к терапии МВ у детей не изменились. Все пациенты за период ведения регистра получали ингаляционно Дорназу альфа, минимикросферические панкреатические ферменты.

Таблица 5

Сравнительная характеристика подходов к терапии МВ у детей 0-14 лет в 2012 г. и 2018 г.

Показатели	2012 год (n = 30 )	2018 г. (n = 43 )	p
Дорназа альфа, %	100,0	100,0	-
Панкреатические ферменты, %	100,0	100,0	-
Внутривенные антибиотики:			
- всего, %	100,0	72,1	>0,05
- длительностью > 3 мес. в году, %	60,0	27,9	<0,05
Таблетированные антибактериальные препараты:			
- всего, %	93,3	25,6	<0,05
- длительностью > 3 мес. в году, %	83,3	14,0	<0,05
Ингаляционные антибактериальные препараты:			
- всего, %	36,7	32,6	>0,05
- длительностью > 3 мес. в году, %	23,3	14,0	>0,05
Азитромицин, %	16,7	4,65	>0,05
Ингаляционные бронхолитики:			
- всего, %	73,3	18,6	<0,01
- длительностью > 3 мес. в году, %	40,0	2,32	<0,01
Ингаляционные стероиды:			
- всего, %	40,0	18,6	<0,05
- длительностью > 3 мес. в году, %	33,3	4,65	<0,05
Таблетированные стероиды:			
- всего, %	0,00	0,00	-
- длительностью > 3 мес. в году, %	0,00	0,00	-
Ингаляции гипертонического раствора NaCl:			
- всего, %	0,00	11,6	>0,05
- длительностью > 3 мес. в году, %	0,00	4,65	>0,05
Ингаляции маннитола:			
- всего, %	0,00	0,00	-
- длительностью > 3 мес. в году, %	0,00	0,00	-
Урсодезоксихолиевая кислота, %	100,0	100,0	-
Жирорастворимые витамины, %	100,0	100,0	-
CFTR модуляторы, %	0,00	0,00	-
Ингибиторы протонной помпы, %	0,00	0,00	-
Кинезитерапия, %	100,0	100,0	-
Кислородотерапия > 3 мес. в году, %	0,00	0,00	-

Примечание: статистическая значимость различий исследовалась методом углового преобразования Фишера

Однако, частота применения отдельных видов терапии в ряде случаев имела статистически значимые различия. Так, в 2018 г. реже назначались пролонгированные курсы внутривенной антибиотикотерапии, использовались таблетированные антибактериальные препараты, ингаляционные стероиды,

ингаляционные бронхолитики. Не исключено, что это связано с реже встречавшимся более тяжёлым поражением лёгких у детей в 2018 г., по сравнению с 2012 г.

Далее нами исследованы связи между основными клинико-функциональными показателями МВ и, с одной стороны - возрастом постановки диагноза, с другой - длительностью заболевания. Для этого выделена группа пациентов из регистра 2012 г. без НС, что обеспечило больший разброс возраста на момент обследования (т.е., длительности болезни) и возраста постановки диагноза (у детей с НС этот разброс минимален).

Таблица 6

Корреляционные связи между возрастом постановки диагноза МВ, ИМТ, лучшим показателем ОФВ1, числом госпитализаций и суммарным количеством дней госпитализации в текущем календарном году у детей с МВ без НС (данные регистра 2012 года)

Показатели	Возраст постановки диагноза	Возраст на момент обследования	ИМТ	ОФВ1	Число госпитализаций в текущем году	Суммарное число к/д в текущем году
Возраст постановки диагноза	-	$r = 0,36$ $p = 0,070$	$r = - 0,80$ $p = 0,004$	$r = - 0,64$ $p = 0,04$	$r = 0,50$ $p = 0,114$	$r = 0,81$ $p = 0,003$
Возраст на момент обследования	-	-	$r = - 0,66$ $p = 0,021$	$r = - 0,62$ $p = 0,040$	$r = 0,50$ $p = 0,114$	$r = 0,63$ $p = 0,038$
ИМТ	-	-	-	$r = 0,64$ $p = 0,04$	$r = 0,44$ $p = 0,178$	$r = 0,064$ $p = 0,839$
ОФВ1	-	-	-	-	$r = 0,002$ $p = 0,989$	$r = -0,207$ $p = 0,521$
Число госпитализаций в текущем году	-	-	-	-	-	$r = 0,62$ $p = 0,003$
Суммарное число к/д в текущем году	-	-	-	-	-	-

Методом ранговой корреляции (таблица 6) установлены статистически значимые связи между возрастом при постановке диагноза МВ и ИМТ ( $r = - 0,80$ ,  $p < 0,05$ ), показателем ОФВ1 ( $r = - 0,64$ ,  $p < 0,05$ ), суммарным числом койко-дней в текущем году ( $r = 0,81$ ,  $p < 0,05$ ), что логично считать отражением

негативного влияния поздней диагностики МВ на течение заболевания. Средней силы статистически значимая связь ( $r = 0,64$ ,  $p < 0,05$ ) между ОФВ1 и ИМТ отражает патогенетическую связь между состоянием питания и функциональным состоянием бронхо-лёгочной системы у больного ребёнка. Статистически значимые обратные связи между возрастом на момент обследования, ИМТ ( $r = - 0,66$ ,  $p < 0,05$ ), показателем ОФВ1 ( $r = - 0,62$ ,  $p < 0,05$ ), суммарным числом койко-дней в текущем году ( $r = 0,63$ ,  $p < 0,05$ ) косвенно свидетельствуют об ухудшении клинико-функциональных показателей по мере увеличения возраста пациента, отражая процесс прогрессирования заболевания.

Таким образом, в когорте детей 0-14 лет с МВ в ХМАО-Югре в динамике с 2012 до 2018 года в условиях внедрения массового НС произошли изменения, которые характеризовались увеличением абсолютного числа пациентов, увеличением среднего их возраста и удельного веса детей с НС, уменьшением среднего возраста постановки диагноза.

Установленные методом ранговой корреляции связи между возрастом постановки диагноза МВ, возрастом на момент обследования, клинико-функциональными показателями и суммарным количеством дней пребывания в стационаре в текущем году свидетельствуют о влиянии на тяжесть заболевания двух факторов - своевременности постановки диагноза и длительности болезни. Поэтому для исследования влияния ранней диагностики МВ на основе его НС на особенности течения болезни требуется сравнительная оценка групп детей, сопоставимых по возрасту.

### 3.3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ МВ У ДЕТЕЙ С НС И БЕЗ НС.

Для объективизации сравнительной оценки течения МВ в зависимости от срока постановки диагноза (до внедрения НС – более поздняя диагностика, в условиях внедрения НС – более ранняя) нами проведена стандартизация

включённых в регистр пациентов с НС и без НС по возрасту для исключения очевидного влияния стажа заболевания на его течение, как описано в главе «Материалы и методы исследования». Сравнительный анализ клинических и лабораторных особенностей течения заболевания в группах больных, стандартизированных по возрасту, представлен в таблице 7.

В сравниваемых группах отсутствовали статистически значимые различия ( $p > 0,05$ ) по возрасту на момент анализа данных пациентов (метод Манна-Уитни), гендерной структуре (метод углового преобразования Фишера), результатов генной диагностики (метод углового преобразования Фишера), уровню хлоридов пота (метод Манна-Уитни). Это свидетельствовало о сопоставимости групп с НС и без НС по основным параметрам, которые могут влиять на особенности течения заболевания. Известно также влияние на тяжесть клинических проявлений типа мутации. Так, мутация F508del в гомозиготном состоянии или в компаунде с другими мутациями определяет наиболее тяжёлое течение МВ [36]. Данные таблицы 7 свидетельствуют об отсутствии межгрупповых различий по частоте встречаемости данной мутации как в гомо-, так и гетерозиготном положении ( $p > 0,05$ , метод углового преобразования Фишера).

Известно также, что мекониевый илеус в дебюте МВ является прогностически неблагоприятным с точки зрения тяжести заболевания [23]. Данное осложнение МВ в периоде новорождённости зарегистрировано в у одного больного с НС и ни у одного – без НС ( $p > 0,05$ , метод углового преобразования Фишера).

На более тяжёлое течение заболевания в группе без НС указывают более низкие показатели ИМТ и лучшего в текущем году ОФВ1 по данным спирометрии ( $< 0,05$  в обоих случаях, метод Манна-Уитни). Установленные закономерности свидетельствуют о худшем нутритивном статусе и более тяжёлом поражении органов дыхания с наличием бронхиальной обструкции у пациентов без НС, т.е с более поздней постановкой диагноза МВ. Как видно из

таблицы 7, в группе без НС диагноз устанавливался значительно позже, чем у пациентов с НС ( $p < 0,05$ , метод Манна-Уитни).

Таблица 7

Сравнительная оценка клинических, лабораторных и функциональных показателей в группах детей с МВ с НС и без НС (стандартизация по возрасту пациентов)

Показатели	Пациенты без НС n=11	Пациенты с НС n=16	p
Возраст в годах Me(Q1-Q3)	8,50(6,11-10,2)	8,32(7,00-9,11)	0,063**
Пол:			
М абс/%	5/45,5	7/43,8	>0,05*
Ж абс/%	6/54,5	9/56,2	
Возраст постановки диагноза в годах Me(Q1-Q3)	4,50(1,38-6,53)	0,63(0,15-1,82)	0,038**
Генетический диагноз:			
Установлены обе мутации абс/%	11/100,0	16/100,0	>0,05*
Мутация F508del абс/%	10/90,9	13/81,3	>0,05*
F508del / F508del, абс/%	1/9,10	1/6,30	>0,05*
F508del в компаунде абс/%	9/81,8	12/75,0	>0,05*
Сочетание других мутаций	1/9,10	3/18,7	>0,05*
Хлориды пота ммоль/л Me(Q1-Q3)	101,5(98,9-113,4)	102,0(77,5-108,5)	0,82**
Мекониевый илеус абс/%	0/00,0	1/6,25	>0,05*
ИМТ кг/м <sup>2</sup> Me(Q1-Q3)	15,3(14,9-15,6)	19,4(17,7-19,9)	0,025**
ОФВ1 в % от среднестатистической нормы Me(Q1-Q3)	93,0(86,5-95,0)	100,0(95,0-111,3)	0,011**
Интермиттирующая колонизация Ps. aeruginosa абс/%	5/45,5	2/12,5	<0,05*
Хр. колонизация St. aureus абс/%	8/72,7	11/68,8	>0,05*
Нейтр. жир более чем на ++	3/27,3	5/31,3	>0,05*

Примечание: \*\* метод Манна-Уитни; \* - метод углового преобразования Фишера

Результаты бактериологического исследования мокроты больных свидетельствовали о худшей ситуации в группе без НС (табл. 8), в которой чаще встречалась интермиттирующая колонизация Ps. aeruginosa ( $p < 0,05$ , метод углового преобразования Фишера). Это характеризовало более тяжёлое течение бронхолёгочного процесса в условиях поздней диагностики МВ. Однако, по частоте встречаемости хронической колонизации St. aureus различий не установлено. Следует подчеркнуть, что Ps. aeruginosa более значима, чем St. aureus, сточки зрения прогрессирования бронхолёгочного

процесса, колонизация *Ps. aeruginosa* сопряжена с более поражением лёгких у детей [144].

Таблица 8

Сравнительная оценка лечебных подходов в группах детей с МВ с НС и без НС (стандартизация по возрасту пациентов)

Показатели	Пациенты без НС n=11	Пациенты с НС n=16	p
Число госпитализаций в текущем году	4(4-5)	4(3-4)	0,081**
Суммарное число к/дней	70(56-70)	53(47-56)	0,004**
Дорназа альфа постоянно	11/100,0	16/100,0	-
Панкреатические ферменты (минимикросферы) постоянно абс./%	11/100,0	16/100,0	-
Доза панкреатина (минимикросферы) в сутки ед. по липазе на 1 кг массы Me(Q1-Q3)	3750(2100-4400)	3500(2000-4800)	0,54**
Антибиотики В/В	10/90,9	12/75,0	>0,05*
Антибиотики В/В более 3 мес в году абс./%	9/81,8	4/25,0	<0,01*
Антибиотики ингаляционные	7/63,6	8/50,0	>0,05*
Антибиотики ингаляционные более 3 мес в году абс./%	5/45,5	4/25,0	>0,05*
Антибактериальные препараты таблетированные	10/90,9	4/25,0	<0,01*
Антибактериальные препараты таблетированные более 3 мес в году абс./%	9/81,8	2/12,5	<0,01*
Азитромицин	2/18,2	1/6,25	>0,05*
Азитромицин более 3 мес в году абс./%	2/18,2	1/6,25	>0,05*
Бронхолитики	10/90,9	7/43,8	<0,01*
Бронхолитики длительностью более 3 мес в году абс./%	5/45,5	0/0,00	<0,01*
Ингаляционные стероиды			
Ингаляционные стероиды более 3 мес в году абс./%	5/45,5	0/0,00	<0,05*
Системные стероиды абс./%	0/0,00	0/0,00	-
Урсодезоксихолевая к-та более 3 мес в году абс./%	11/100,0	16/100,0	-
Жирорастворимые витамины более 3 мес в году абс./%	11/100,0	16/100,0	-
Кинезитерапия абс./%	11/100,0	16/100,0	-

Примечание: \*\* метод Манна-Уитни; \* - метод углового преобразования Фишера

Типичным для МВ является уже внутриутробное поражение *pancreas* (кистофиброз), в отличие от других органов (например, лёгких). Абсолютная панкреатическая недостаточность определяет необходимость регулярной и адекватной заместительной ферментотерапии. Доказана наибольшая эффективность применения форма выпуска панкреатина в виде минимикросфер с кислотозащитной оболочкой в желатиновой капсуле, что способствует

купированию стеатореи независимо от сроков постановки диагноза, улучшению нутритивного статуса. Доза препарата подбирается индивидуально, под контролем степени стеатореи по данным копрологического исследования [16].

Вследствие этого нами не установлены различия по частоте стеатореи ( $p > 0,05$  по методу углового преобразования Фишера) в сравниваемых группах. Для оценки влияния мальабсорбции и эффективности ферментотерапии более объективными являются показатели нутритивного статуса пациента, наиболее значимым из которых служит ИМТ. Стеаторея имеет преходящий характер: недостаточная доза панкреатина увеличивает степень стеатореи, а назначение адекватной дозы препарата способствует её исчезновению.

Частота госпитализаций в группах сравнения не имела статистически значимых различий ( $p > 0,05$ , метод Манна-Уитни), однако суммарное число койко-дней пациентов без НС было больше, чем в группе с НС, что оказалось статистически значимым ( $p < 0,05$ , метод Манна-Уитни). При плановом числе госпитализаций пациентов с МВ один раз в 3 месяца в группе без НС была необходимость более длительных нахождений в стационаре из-за более тяжёлого течения болезни при более поздней его диагностике.

Средняя доза панкреатических ферментов, которые все пациенты обеих групп получали пожизненно, не имела статистически значимых различий ( $p > 0,05$ , метод углового преобразования Фишера) у больных с НС и без НС.

Все пациенты обеих групп пожизненно получали также в виде ингаляций через компрессорный ингалятор Дорназу альфа по 2,5 мг один раз в день с целью улучшения мукоцилиарного клиренса за счёт снижения вязкости бронхиального секрета. Все дети с МВ в домашних условиях применяли кинезитерапию, обучение которой осуществлялось специалистами регионального центра МВ. Всем пациентам назначались регулярные курсы приёма жирорастворимых витаминов и урсодезоксихолевой кислоты. Сопоставимость сравниваемых групп по подходам к базисной терапии МВ

подтверждалась отсутствием статистически значимых различий частоты использования этих видов терапии ( $p > 0,05$  по методу углового преобразования Фишера).

Однако нами установлены статистически значимые различия в группах с НС и без НС по продолжительности внутривенной антибиотикотерапии и таблетированных антибактериальных препаратов (в последнем случае - в основном, ципрофлоксацин при колонизации *Ps. Aeruginosa*): в группе без НС суммарная длительность в днях этих курсов была более продолжительной, чем у детей с НС ( $p < 0,05$  в обоих случаях, метод углового преобразования Фишера).

Также детям без НС чаще и продолжительнее назначались ингаляционные бронходилататоры и ингаляционные кортикостероиды ( $p < 0,05$  в обоих случаях, метод углового преобразования Фишера), что свидетельствовало о тяжёлом поражении бронхолёгочного аппарата с выраженной бронхиальной обструкцией при более поздней диагностике МВ. Факты применения системных глюкокортикостероидов в группах наблюдения не установлены. Макролиды использовались с одинаковой частотой в обеих группах ( $p > 0,05$  по методу углового преобразования Фишера).

Таким образом, внедрение массового НС МВ способствовало лучшей выявляемости заболевания и его более ранней диагностике. Раннее начало базисной терапии МВ способствовало менее выраженному прогрессированию болезни в первую очередь по показателям нутритивного статуса и функционального состояния лёгких, что отражает клинический патоморфоз МВ в условиях внедрения массового НС.

Своевременное начало базисной терапии МВ после установления диагноза на основе НС способствует уменьшению потребности в более длительных курсах внутривенных, пероральных антибактериальных средств и препаратов для купирования бронхообструктивного синдрома (ингаляционные бронхолитики и кортикостероиды).

### 3.4. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ.

#### Клинический пример 1.

Ребенок Р.О.(жен.пол) 21.05.1994 г.р., впервые поступил в СГКБ, в педиатрическое отделение, в 2005 г. в возрасте 11 лет.

Дата поступления: 24.11.2005; дата выписки: 11.12.2005.

№ истории болезни: 2100172

Клинический диагноз: Муковисцидоз, смешанная форма, тяжёлое течение (мутации: delF508/?). Хронический гнойный обструктивный бронхит, обострение, ДН – 1 степени. Двухсторонние смешанные бронхоэктазы. Хроническая панкреатическая недостаточность. Хронический гастродуоденит, ремиссия. Дискинезия желчевыводящих путей. Белково-энергетическая недостаточность. Хроническая колонизация *Ps. aeruginosa*.

Поступила с жалобами на повышение температуры до 37,7 град.. слабость, недомогание, усиление кашля с выделением большего количества жёлто-зелёной мокроты. Из анамнеза жизни: ребёнок от 1-й беременности, протекавшей на фоне ОРЗ, хронического пиелонефрита. Первые срочные роды в сроке 40 недель гестации, масса тела при рождении 3550, длина 52см, закричала сразу. Выписана домой на 7 сутки. Находилась на искусственном вскармливании. Прибавка в массе на первом году жизни – соответственно возрасту, к 1 году – 11 кг. Аллергоанамнез отягощён: сладкое, мёд; сыпь на пенициллин, АЦЦ. Наследственность: по маминой линии в 2 мес. умерла сестра от пневмонии. Перенесённые заболевания: ветряная оспа, пневмония, повторные бронхиты.

Из анамнеза заболевания: со слов мамы респираторный синдром с 2-х месяцев, когда впервые диагностирована пневмония, сохраняющееся постоянно подкашливание. В 8 мес, 3 года и далее до 2-3р в год бронхиты без лихорадки с выделением мокроты гнойного характера. Неоднократно обследована по месту жительства (Краснодарский край), диагноз муковисцидоз впервые заподозрен в г.Анапа в 2001г, однако по результату потового теста (отрицательный) -

диагноз не подтверждён. В ноябре 2004 г. обследована в пульмонологическом отделении ДКБ № 9 г. Челябинска, где по результатам потового теста (хлориды пота с использованием аппарата Макродакт - 73, 75, 81,2 мЭв/мл) и дополнительного обследования: рентгенографии легких (сгущение и деформация бронхосудистого рисунка, бесструктурность корней), бронхоскопии (двусторонний диффузный катарально-гнойный эндобронхит), посева мокроты (высев *Ps. aeruginosa*), копрологии (нейтральный жир в кале +++), УЗИ органов брюшной полости (диффузные изменения поджелудочной железы) впервые установлен диагноз муковисцидоз. Диагноз муковисцидоза у ребенка подтверждён в г. Москва (Российский центр муковисцидоза). Базисную терапию по заболеванию (медикаментозную (ферментзаместительную (креон), ингаляционную терапию (пульмозим), урсофальк, АЦЦ) получает с 2004г (с 10лет)

В 2004 г. переехали в Сургут.

На момент поступления: кашель с мокротой зелёного цвета, плохой аппетит, затруднено носовое дыхание. На момент госпитализации получал лечение амбулаторно:

Небулайзерная терапия Беродуалом 20 кап. 3 р./день;

Небулайзерная терапия Лазолваном по 2 мл 3 р/д ежедневно;

Небулайзерная терапия Пульмикортом по 0,5 мг \* 2 р/д ежедневно;

Небулайзерная терапия Пульмозимом 2,5 мг/сут ежедневно;

Креон по 20.000 ЕД x 3 р/д во время еды, креон на перекус 10.000 ЕД;

Аевит по 1 др. 1р/д ежедневно; кинезитерапия ежедневно.

Объективный статус: общее состояние тяжёлое. Сознание ясное. Физическое развитие дисгармоничное, за счёт дефицита массы тела, роста. Рост -133см (ниже среднего: SDS -1 - (-2)), масса тела-24,8 кг (низкий показатель: SDS -2)), ИМТ 13,4 кг/м<sup>2</sup> (недостаточность питания: SDS -2)). Кожные покровы смуглые, бледные, сыпи нет, сухие на ощупь, в области рта шелушение. Изменения ногтевых фаланг пальцев по типу «часовых стёкол». Мышечный

тонус удовлетворительный. Грудная клетка цилиндрической формы, симметрична. Носовое дыхание незначительно затруднено, скудное слизистое отделяемое. Слизистые полости рта розовые, миндалины не гипертрофированы, небные дужки и слизистая задней стенки глотки не гиперемированы. Язык обложен белым налетом. Перкуторно - легочной звук. Аускультативно в лёгких выслушивается ослабленное дыхание, проводится по всем полям, влажные средне-, крупнопузырчатые хрипы с обеих сторон. ЧД 20 в мин. Тоны сердца громкие, ритмичные, соотношение тонов сохранено, шумов нет. ЧСС 88 уд в мин. Живот при пальпации мягкий, безболезненный. Печень и селезёнка не увеличены. Стул ежедневный, оформленный. Дизурических расстройств нет.

Результаты лабораторно-диагностических обследований:

Бак посев мокроты: *Ps. fluorescens/putida*  $10^5$ ; *Ps. aeruginosa*  $10^6$ ; *St. aureus*  $10^2$ ; *C. albicans*  $10^2$ . Бак посев из носа: отрицательный. Бак посев из зева: *P. fluorescens/putida* – массивный рост. Копрограмма: цвет – коричневый, консистенция – оформленный, лейкоц. 0-1-0 в п/зр, мышечные волокна +, нейтральный жир +, растительная клетчатка +. Микроскопия мокроты: цвет серо-зелён, характер – слизисто-гнойный, консистенция – вязкая, лейкоциты 8-12 в п/зр, эритроциты – единичные в п/зр, макрофаги 0-0-1 в п/зр, эпителий 2-4 в п/зр, микобактерии – отр. *Ps. aeruginosa* высевалась из мокроты при каждой госпитализации с уменьшением титра после курсов антибактериальной терапии. Эрадикация достигнута не была.

Общий анализ крови; лейкоцитарная формула: палочкоядерные - 7 %, сегментоядерные - 42 %, эозинофилы - 5 %, базофилы - 0 %, лимфоциты - 40 %, моноциты - 6 %. СОЭ по Панченкову: 27 мм/ч.

Общий анализ мочи: рН 6,5, уд вес 1022, белок отр, лейкоциты 1-3 в п/зр, эпителий плоский 2-4 в п/зр.

Б/х крови: общ белок 74 г/л, альбумины 30,4 г/л ( норма 35,0 – 52,0 г/л) глобулины 43,6 г/л (норма до 37г/л), АЛТ 6 U/l, АСТ 13 U/l, общ билирубин 6,1  $\mu\text{mol/l}$ , пр билирубин 1,3  $\mu\text{mol/l}$ , холестерин 2,08  $\text{mmol/l}$ , глюкоза 4,9 ммоль/л,

амилаза 60,1 U/l, мочеви́на 1,7 mmol/l, креатинин 54 umol/l, СРБ 23мг/л ( норма до 5 мг/л) , АСЛО отр, калий 4,39, Na 138 mmol/l, Cl 104 mmol/l, Ca 2,08 ммоль/л, магний 0,85 ммоль/л, фосфор 1,29 ммоль/л, КФК – 33ед/л (N до 145ед/л).

Результаты диагностических обследований:

Спирометрия: показатели ЖЕЛ резко снижены (70% от нормы). Пройодимость дыхательных путей резко затруднена (ОФВ1 – 64% от нормы). Вентиляционная недостаточность 2 степени по смешанному типу. Бронходилатационный тест положительный (ОФВ1 + 25%)

ЭКГ: Синусовый ритм. ЭОС расположена нормально.

Рентгенография лёгких: деформация корней лёгких, множественные очаговые затемнения по всем легочным полям. Ячеистость в виде сот.

УЗИ желчного пузыря: моторная функция замедлена.

УЗИ внутренних органов: признаки реактивного панкреатита, признаки дискинезии желчных путей.

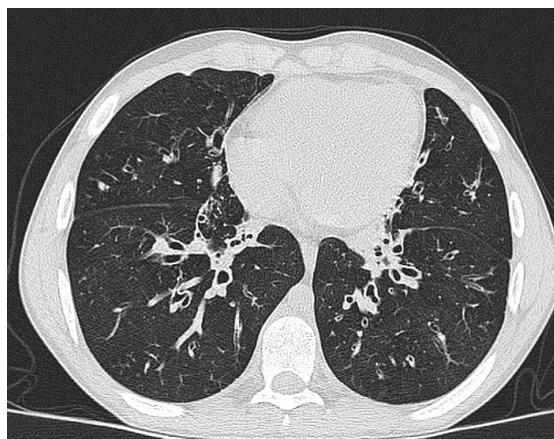


Рис. 5. КТ легких (срез 146/391, filter lungB, slice thk 1,5 mm, pitch 0.86, FOV 322 mm, L-500, W-1500).

ЭХОКГ: клапанный аппарат – без особенностей. Сократительная способность миокарда удовлетворительная. Признаки легочной гипертензии (систолическое давление в легочной артерии 47 мм рт. ст.).

Рентгенография лёгких от 24.11.2005 г. На фоне повышенной воздушности лёгких отмечается инфильтрация и деформация корней лёгких, усиленный бронхосудистый рисунок со сгущением в нижних отделах, больше справа.

КТ лёгких 28.11.2005 г.: картина лимфаденопатии лимфоузлов средостения. КТ - картина бронхоэктатической болезни лёгких (рис. 5).

Фибробронхоскопия (показанием явилась диагностика на КТ бронхоэктазий): правосторонний диффузный гнойный эндобронхит II –III ст. Левосторонний верхнедолевой гнойный эндобронхит II-III ст.

Лечение в стационаре (с 24.11.2005):

Максипим 1,5г x 3 р в день на физ р-ре в/в медленно продолжительность 17 дней;

Рибоксин 1таб x 3р в день продолжительность 14 дней;

Эссенциале по 1 капс x 3р в день продолжительность 17 дней;

Небулайзерная терапия Беродуалом (ипратропия бромид+фенотерол) 20 кап x 3 р в день продолжительность 20 дней;

Небулайзерная терапия Лазолваном 2 мл x 3 р в день продолжительность 20 дней;

Небулайзерная терапия пульмикортом 0,5 мг x 2 р в день продолжительность 20 дней;

Небулайзерная терапия амикацином 500 мг x 2 р в сутки продолжительность 16 дней;

Дифлюкан 150 мг x 1 р в сутки продолжительность 10 дней;

Линекс по 1 капс. x 3 р/д продолжительность 17 дней;

Креон по 20.000 ЕД x 3 р/д во время еды, на перекус 10.000 ЕД ежедневно;

Кинезитерапия ежедневно.

Данный клинический пример наглядно демонстрирует позднюю диагностику заболевания, до введения неонатального скрининга в ХМАО-Югре на муковисцидоз (в 2006 г.), наличие осложнений со стороны лёгких (бронхоэктазы), дефицит массы тела, проявлений хронической гипоксии

(изменения ногтевых фаланг пальцев по типу «часовых стёкол»), наличие хронической колонизации *Pseudomonas fluorescens/putida*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Точный генетический диагноз:

c.274G>A(p.E92K)/c.1521\_1523delCTT(p.Phe508del) был установлен в 2017 г. методом HRMA-секвенирования (см. главу 5).

Клинический пример 2.

Ребенок С.Д. (жен. пол) 12.02.2007 г.р., наблюдается в педиатрическом отделении с 2008 г. (с возраста 1 года), возраст на момент госпитализации в педиатрическое отделение СГКБ 11 лет.

Дата поступления: 15.08.2019; дата выписки: 23.08.2019.

№ истории болезни: 2102462

Жалобы на момент поступления на кашель, увеличение слизистого отделяемого из носа.

Клинический диагноз: Муковисцидоз, смешанная форма, средней степени тяжести. (Мутации: c.274G>A(p.E92K)/c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del)). Хронический гнойный обструктивный бронхит, обострение, ДН 0 степени. Хронический риносинусит, обострение. Хронический панкреатит, панкреатическая недостаточность. Интермиттирующая колонизация *Ps. aeruginosa* в сочетании со *Staphylococcus aureus*.

Из анамнеза жизни: Ребенок от III беременности, протекавшей на фоне гестоза, III родов в срок, масса тела при рождении 2730 г. Выписаны домой из роддома на 3 сутки. БЦЖ в поликлинике. Проф. прививки по индивидуальному графику. Наследственность: по линии матери – у прабабушки сахарный диабет, у тети – бронхиальная астма; сестра ребенка умерла в 3-х месячном возрасте от лимфобластного лейкоза. Из перенесенных заболеваний: ОРВИ, обструктивный бронхит. Операции – не было. Травм – не было. Гемотрансфузии – отрицает. Эпид. Анамнез: контакт с туберкулезными, инфекционными больными и

жидкий стул в течение 3-х недель отрицают. Из Сургута в течение 3-х последних недель не выезжала. Аллергоанамнез сыпь на куриное яйцо, смесь «Малютка», медикаментозная аллергия на препарат Изофра в виде крапивницы.

Из анамнеза заболевания: Диагноз выставлен в возрасте 1 месяца, на основании положительного результата НС, повышения хлоридов пота (Аппарат Нанодакт - 98 мкмоль/л и 113 мкмоль/л). Подтвержден генетически, обнаружена мутация del F508 в гене CFTR в гетерозиготном состоянии и E92K в гетерозиготном состоянии. До 5 месяцев развивалась в соответствии с возрастом, жалоб со стороны родителей не было. В 5 месяцев перенесла ротавирусную инфекцию, с 1 года жизни у девочки отмечается повторные обструктивные бронхиты. С 1 месяца получает медикаментозную терапию: ферментзаместительную (Креон), ингаляционную терапию (Пульмозим), Урсофальк, АЦЦ.

На момент госпитализации получал лечение амбулаторно:

Небулайзерная терапия пульмозимом по 2,5 мг \* 1 р/д утром, постоянно

Урсофальк (урсодезоксихолиевая кислота) 250 мг/5 мл по 12 мл \* 1 раз в сутки перед сном, постоянно

АЦЦ внутрь 200 мг \* 1 раза в сутки, постоянно

Креон (панкреатин) 12.000 ЕД внутрь по 1 капсуле \* 3 раза в сутки во время еды на основные приемы пищи, постоянно

Креон (панкреатин) 10.000 ЕД внутрь по 1 капсуле во время еды на перекус, постоянно; Аевит по 1 др. 1р/д ежедневно; кинезитерапия ежедневно.

Данные общего осмотра: состояние ребенка средней степени тяжести, обусловлено симптомами обострения хронического бронхита. Самочувствие страдает умеренно. Сознание ясное. Девочка контактна, адекватна, активна, аппетит, со слов мамы, снижен. Телосложение правильное, физическое развитие гармоничное, рост – 139см (средний показатель: SDS = 0), масса тела - 32 кг (средний показатель: SDS - 0,5), ИМТ 16,56 кг/м<sup>2</sup> (SDS ИМТ - 0,5).

Кожные покровы бледные, умеренной влажности, чистые, нарушений микроциркуляции нет, тени под глазами, температура тела  $36,0^{\circ}$  С. Отеков, пастозности нет. Тургор тканей удовлетворительный. Мышечный тонус удовлетворительный. Костно-суставная система без видимой патологии. Периферические лимфатические узлы, доступные пальпации, единичные, не увеличены. Носовое дыхание умеренно затруднено, отделяемого из носовых ходов нет. Слизистая полости рта розовая, миндалины увеличены до 1 степени, налетов нет, слизистая задней стенки глотки не гиперемирована. Во время осмотра продуктивный кашель. Грудная клетка цилиндрической формы, симметрично участвует в дыхании. При перкуссии легких легочный звук. При аускультации легких дыхание проводится по всем полям, жесткое, справа по передней поверхности умеренно ослаблено, здесь же выслушиваются единичные влажные мелкопузырчатые хрипы, ЧД – 24 в мин. Сатурация по данным пульсоксиметрии - 98%. Тоны сердца громкие, ритмичные, ЧСС - 92 в мин. АД 93/57 мм.рт.ст. Границы сердца в пределах возрастной нормы. Язык влажный, обложен налетом белого цвета. Живот мягкий, доступен пальпации во всех отделах, безболезненный. Печень у края реберной дуги, селезенка не пальпируется. Менингеальные знаки отрицательные. Симптом поколачивания отрицательный с обеих сторон. Мочеиспускание свободное, безболезненное. Стул оформленный, ежедневно.

Результаты лабораторно-диагностических обследований:

Общий анализ крови: количество лейкоцитов (WBC):  $7,6 \cdot 10^9$ /л, Количество эритроцитов (RBC):  $4,5 \cdot 10^{12}$ /л, Гемоглобин (концентрация) HGB: 127 г/л, Гематокрит (HTC): 34,2 %, Средний объем эритроцитов (MCV): 76 Мкм(фл), Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH): 28,2 Пкг, Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC): 371 г/л, Количество тромбоцитов (PLT):  $414 \cdot 10^9$ /л, Показатель гетерогенности эритроцитов по объему (RDW): 11 %CV, Тромбокрит (PCT): 0,21 %, Средней объем тромбоцитов (MPV): 5 fl, Ширина распределения тромбоцитов по объему

(PDW): 17,5 %. Лейкоцитарная формула: палочкоядерные - 0 %, сегментоядерные - 60 %, эозинофилы - 2 %, базофилы - 0 %, лимфоциты - 35 %, моноциты - 3 %. СОЭ по Панченкову: 6 мм/ч.

Общий анализ мочи: без патологии.

Копрограмма: Цвет: коричневый, консистенция кашицеобразная, лейкоциты: 0 - 1, мышечные волокна переваренные: +, мышечные волокна непереваренные: +, растительная клетчатка: +, растительная клетчатка (непереваримая): +, мыла: ++, йодофильная флора: +, дрожжевые грибы: +, простейшие: не обнаружено, яйца гельминтов: не обнаружены.

Амилаза крови: Альфа-амилаза (сыворотки крови): 118,7 U/l. СРБ: С-реактивный белок (СРБ): 0,7 mg/l.

Амилаза в моче: Альфа-амилаза (мочи): 223.

Микроскопия мокроты: цвет бел, характер – слизистый, консистенция – вязкая, лейкоцитов 2-3 в п зр, эритроцитов – нет, эпителий 1-2-1 в п зр, ВК – отр.

При микробиологическом исследовании мокроты впервые в данную госпитализацию выделена *Ps. aeruginosa*, титр  $5 * 100$  КОЕ/мл. Микробиологическое (культуральное) исследование слизи с миндалин и задней стенки глотки на аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы от 02.07.19: *Staphylococcus aureus*: умеренный рост.

Результаты инструментальных исследований.

Спирометрия: ЖЕЛ 90% от нормы, ОФВ1 – 95% от нормы. Бронходилатационный тест отрицательный (ОФВ1 + 9%).

Эхокардиография с цветным картированием и доплеровским анализом: камеры сердца не расширены, клапанный аппарат – без каких-либо особенностей, сократительная способность миокарда удовлетворительная. Сист. давление в лёгочной артерии = 21 мм рт ст.

ЭКГ в 12 отведениях. Заключение: ЭОС отклонена вправо. Синусовый ритм с ЧСС 98-76 в минуту, синусовая аритмия.

УЗИ органов брюшной полости с доплером: структурной патологии не выявлено.

Рентгенография придаточных пазух носа: верхнечелюстные пазухи тотально затемнены. Пневматизация лобной пазухи сохранена. Заключение: двусторонний верхнечелюстной синусит.

Рентгенография лёгких: лёгочные поля умеренно вздуты, усилен бронхосудистый рисунок, очаговых и инфильтративных теней нет.

КТ легких и средостении без контрастирования 20.08.2019 г.: объем легких без отклонений; легочные поля симметричные. Очаговых и инфильтративных изменений в легких нет. Трахея - без особенностей. Бронхи 1-3 порядка проходимы и не деформированы. Диафрагма – с обычным расположением, контуры ее ровные и четкие. Жидкости в плевральных полостях не выявлено. Средостение структурно, не смещено. В верхнем этаже переднего средостения выявлена тень тимуса размерами, правая доля-23x11мм, левая- 17x13мм. Лимфатические узлы средостения: не увеличены. Сердце расположено обычно. Грудной отдел аорты с ровными, четкими контурами. Пищевод на визуализируемом уровне без признаков патологической деформации (рис. 6).

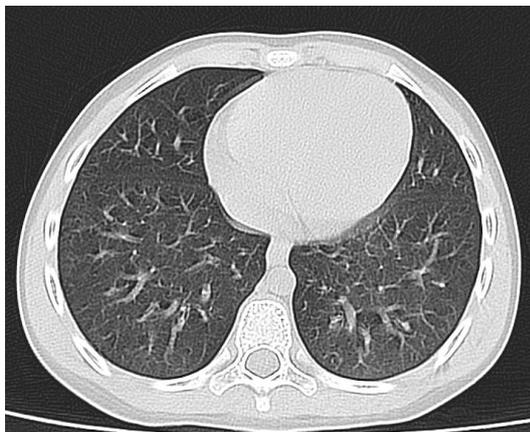


Рис. 6. КТ легких (срез 124/174, filter lungB, slice thk 2,0 mm, pitch 0.86, FOV 221 mm, L-500, W-1500).

Лечение за период госпитализации:

Тобрамицин (доза: 300 Мг) ингаляции через небулайзер 2 р/сут продолжительность 7 дней;

Креон 20 000 ЕД по 2 капс.\* 3 раза в день во время еды ежедневно;  
 Креон 10 000 ЕД по 1 капс. перорально на перекусы ежедневно;  
 Небулайзерная терапия Пульмозимом 2,5 мг 1 р./сут. ежедневно;  
 Урсофальк по 12 мл 1 р./сут. ежедневно;  
 N-ацетилцистеин (АЦЦ) по 200 мг 1 р./сут. ежедневно;  
 Ингаляции аппаратом Парисинус с 3% раствором натрия хлорида 1 р./сут.  
 продолжительность 7 дней; кинезитерапия ежедневно.

В таблице 9 представлены в сравнении основные показатели, характеризующие различную тяжесть МВ в зависимости от срока постановки диагноза. При полной сопоставимости по генетическому диагнозу, полу и возрасту на момент поступления в стационар пациентки имеют существенные различия по тяжести течения МВ.

Таблица 9

Сравнительная оценка клинико-функциональных и лабораторных показателей в зависимости от срока постановки диагноза

№ п/п	Показатели	Пациентка Р.О.	Пациентка С.Д.
1	Возраст на момент поступления в стационар	11 лет	11 лет
2	Пол	Женский	женский
3	Неонатальный скрининг	Не проводился	Проводился
4	Возраст постановки диагноза	10 лет	1 месяц
5	Генетический диагноз	delF508 / E92K	delF508 / E92K
6	Начало постоянной терапии (Панкреатин, Дорназа альфа)	10 лет	1 месяц
7	Бактериограмма мокроты	Хр. колонизация Ps. Aeruginosa	Интермиттирующая колонизация Ps. Aeruginosa
8	Данные рентгенографии и КТ лёгких	Двусторонние бронхоэктазы	Признаки бронхита
9	Спирометрия	Вентиляционная недостаточность 2 ст	Функции внешнего дыхания в пределах нормы
10	Сист. давление в лёгочной артерии	47 мм рт ст	21 мм рт ст
11	Рост	133 (SDS -1 - (-2))	139 см (SDS - 0)
12	Масса тела	24,8 кг (SDS -2)	32 кг (SDS - 0,5)
13	ИМТ	13,4 (SDS ИМТ - 2,0)	16,6 (SDS - 0,5)

Таким образом, на примере двух клинических случаев пациентов понимается важность ранней диагностики заболевания по данным НС, обеспечивающий раннее начало терапии заболевания, в том числе на доклиническом этапе. Диагностика МВ в неонатальном периоде, по данным скрининга, у ребенка позволила провести раннюю терапию заболевания, отсутствие осложнений в аналогичном возрасте, по сравнению с пациентом с поздней диагностикой МВ.

Прогноз заболевания серьезный и зависит от формы и тяжести течения МВ, возраста дебюта болезни, своевременности постановки диагноза и начала базисной терапии. Ранняя диагностика МВ повышает эффективность лечения, предупреждает развитие тяжелых осложнений муковисцидоза (таких как абсцессы, легочная гипертензия, цирроз печени, отставание в физическом развитии, белково-энергетическая недостаточность, вторичный остеопороз, амилоидоз почек, синегнойный сепсис), в том числе и необратимые изменения в легких. Ранняя терапия улучшает прогноз заболевания, повышает качество жизни и увеличивает продолжительность жизни пациентов с МВ.

## ГЛАВА 4. ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ОПТИМИЗАЦИЯ НЕОНАТАЛЬНОГО СКРИНИНГА НА ТЕРРИТОРИИ ХМАО-ЮГРЫ В ПЕРИОД 2006 – 2019 гг.

### 4.1. АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕОНАТАЛЬНОГО СКРИНИНГА В ХМАО-ЮГРЕ (2006 – 2017 гг.).

Неонатальный скрининг муковисцидоза проводится в ХМАО-Югре с 1 июня 2006 г., в соответствии с приказом МЗиСР РФ [34, 35]. По данным региональной медико-генетической консультации (г. Сургут), в период 2006 – 2017 гг. был обследован 283 741 ребенок, при этом среднемноголетний охват (доля обследованных НС детей от всего числа живорожденных) НС МВ составил 96,3% (таблица 10), причем за период 2006 – 2008 гг. – 87,0% вследствие старта НС с июня 2006 г., и нехватки реагентику в начале 2008 г. За период бесперебойного проведения НС в 2009 – 2017 гг. охват составил 98,9% (рис. 7). За время проведения скрининга было выявлено 32 пациента с подтвержденным диагнозом МВ, однако, общее количество новых пациентов за этот же период несколько больше (36 детей) вследствие переезда в Округ из других регионов 4 человек. Всего в Округном регистре по состоянию на конец 2019 г. состояло 58 пациентов с МВ (из них 49 детей, 9 взрослых).

Таблица 10

#### Результаты НС на МВ в ХМАО-Югре в период 2006–2017 гг.

\* 2006 – НС выполнялся с июня по декабрь; 2008 г. – НС выполнялся кроме марта

год	число живорожд.	число обследов-х новорожд.	% охвата НС	ИРТ1(+)	ИРТ2(+)	случаи МВ	частота МВ
2006	20 030	16 926	84,5%*	113	4	1	1 : 20 030
2007	21 348	21 169	99,2%	368	29	2	1 : 10 674
2008	22 766	17 738	77,9%*	305	30	0	-
2009	23 350	23 318	99,9%	496	57	6	1 : 3 892
2010	24 509	24 405	99,6%	433	45	3	1 : 8 170
2011	24 893	24 695	99,2%	401	40	3	1 : 8 298
2012	27 320	26 761	98,0%	616	100	4	1 : 6 830
2013	27 462	26 863	97,8%	750	160	3	1 : 9 154
2014	27 384	27 299	99,7%	591	130	1	1 : 27 384
2015	26 665	26 312	98,7%	568	132	3	1 : 8 888
2016	25 324	25 116	99,2%	518	104	3	1 : 8 441
2017	23 566	23 139	98,2%	404	95	3	1 : 7 855
<b>ВСЕГО:</b>	<b>294 617</b>	<b>283 741</b>	<b>96,3%</b>	<b>5 563</b>	<b>926</b>	<b>32</b>	<b>1 : 9 207</b>

Положительный тест ИРТ-1 был выявлен в 5 563 случаях, что составило 1,96% от общего числа первичного теста. Положительный ИРТ-2 (ретест) был выявлен в 926 случаях (16,6% от объемов положительного теста ИРТ-1 и 0,33% от объемов всех исследований). Частота МВ в регионе составила 1: 9 207 новорожденных, что соответствует общероссийским показателям [14] (за период 2007 – 2013 гг. – 10 433 в РФ, в УрФО в 2012 г. – 9 857).



Рис.7. Охват неонатальным скринингом в ХМАО-Югре за период 2006 – 2017 гг.

Операционные характеристики теста ИРТ-1 (Рис.8) следующие: уровень чувствительности (Se) – 100,0% из-за отсутствия ложноотрицательных показателей, тогда как среднемноголетняя специфичность (Sp) – 98,1% из-за наличия 5 531 ложноположительных результатов. Прогностичность положительного результата (PPV, доля истинно положительных результатов, или вероятность развития МВ при положительном тесте) весьма низка и составила 0,65% за период 2006 – 2017 гг., тогда как прогностичность отрицательного результата (NPV, доля истинно отрицательных результатов, вероятность отсутствия МВ при отрицательном тесте) равна 100%, что также обусловлено отсутствием ложноотрицательных результатов.

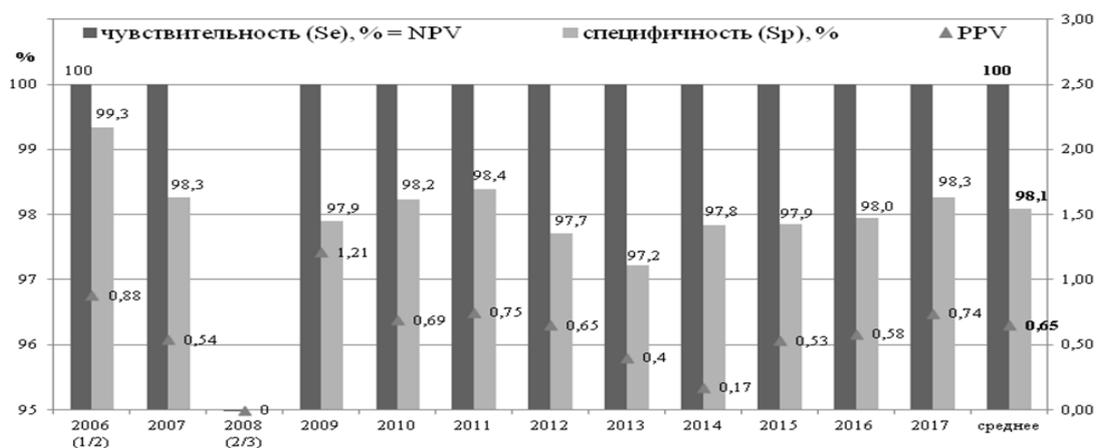


Рис. 8. Операционные характеристики теста ИРТ-1.

Высокое суммарное число ретестов за 12 лет проведения НС МВ соответствует в среднем 3-х месячному объему исследований, выполняемому лабораторией МГК. У всех новорожденных с положительным ИРТ-2 (n=926) провели комплексное обследование – потовый тест трижды, копроскопию и первый этап молекулярно-генетической диагностики – тестирование на 8-10 частых мутаций. В период 2006 – 2013 гг. наблюдался постепенный рост числа положительных результатов ИРТ-1 с пиком в 2013 г. (рис. 9) при отсутствии роста в числе вновь выявленных случаев заболевания. Методом ранговой корреляции была выявлена сильная отрицательная связь ( $r=0,78$ ;  $p=0,001$ ) между применением фиксированного порогового уровня (ПУ) ИРТ-1, рекомендованного производителем наборов для НС МВ (PerkinElmer, США), и количеством ложноположительных результатов ИРТ-1.

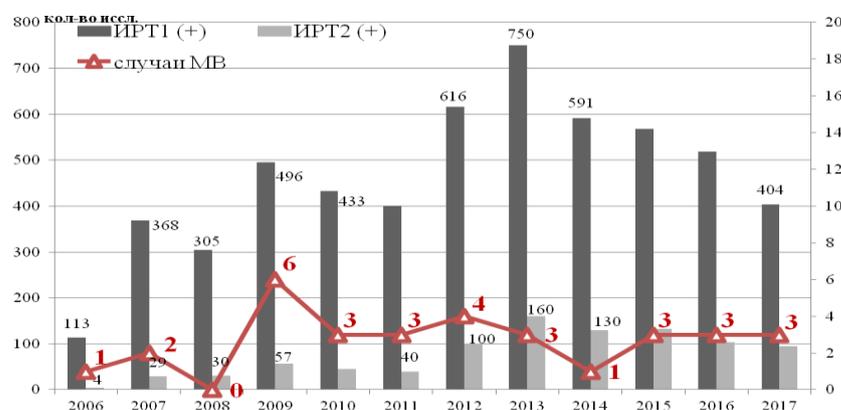


Рис. 9. Результаты биохимического НС на МВ в 2006 – 2017 гг.

В связи с большим количеством ложноположительных результатов НС и выявлением отрицательной динамики (рост числа ложноположительных случаев от года к году) нами было предложено уточнить региональные референсные показатели ИРТ и определить верхнюю точку (пороговое значение) референсного интервала значений [131]. Использование референс-интервалов, рассчитанных другими исследователями с использованием различных тест-систем и оборудования, может приводить к значительным искажениям операционных характеристик теста ( $Se$ ,  $Sp$ ) [111, 209]. Кроме того, производитель коммерческих наборов реактивов для определения уровней ИРТ рекомендует проводить самостоятельный расчет локальных пороговых уровней и по умолчанию предлагает установить порог на уровне 99,0 перцентиля в выборке исследуемых образцов. В русскоязычном сегменте научной литературы приведены только практические результаты НС МВ без обсуждения вопроса использования локальных референсных величин и пороговых уровней в биохимическом сегменте НС. Такая неопределенность побудила нас выполнить отдельное исследование с целью поиска оптимального алгоритма расчета порога ИРТ на региональном уровне. В качестве примера были взяты исследования по оптимизации НС МВ, проведенные специалистами Университета и Школы медицины Висконсина (США), и показывающие эффективность использования «плавающего» (floating) порогового уровня ИРТ в программе НС МВ [140, 222].

#### 4.2. РАСЧЕТ РЕГИОНАЛЬНЫХ РЕФЕРЕНСНЫХ ВЕЛИЧИН ИРТ В НЕОНАТАЛЬНОМ СКРИНИНГЕ НА МУКОВИСЦИДОЗ.

В сплошном ретроспективном исследовании результатов НС МВ за 2006 – 2017 гг. была проанализирована информация по всем подтвержденным случаям МВ у 32 детей. На диаграмме (Рис. 10) отображены уровни ИРТ-1, ИРТ-2 для каждого такого случая. Значения концентрации ИРТ-2 примерно в половине случаев ( $n=14$ ) были больше уровней ИРТ-1. Красным цветом отмечены 2

случая, для которых неизвестны значения ИРТ-2. В одном случае ретест не был проведен из-за отсутствия реактивов (начало 2006 г.). Другой случай был вначале зарегистрирован как ложноотрицательный (из-за нормального значения ретеста и развившейся позже клинической картиной МВ). Однако, при проведении уточняющего молекулярно-генетического исследования обоих образцов сухих пятен крови на фильтровальных бланках НС выяснилась ошибочная атрибуция ретест-бланка другому человеку.

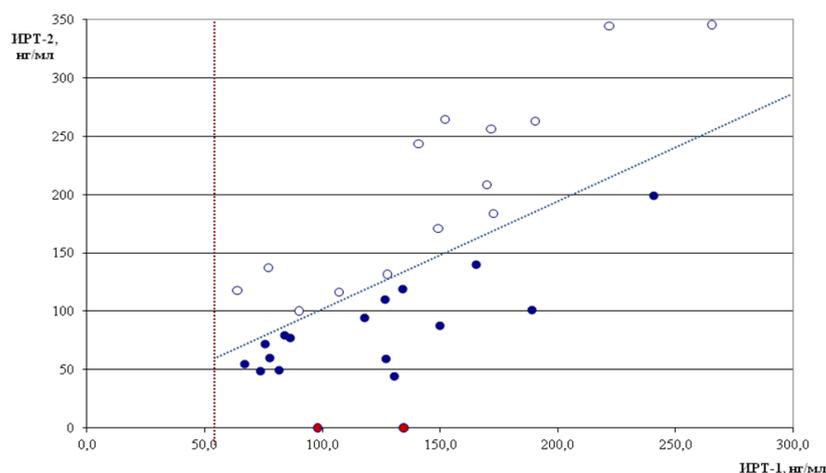


Рис. 10. Цифры первичного теста (ИРТ-1) и ретеста (ИРТ-2) для всех случаев МВ, выявленных НС за период 2006 – 2017 гг. Светлые точки:  $[ИРТ-2] > [ИРТ-1]$ ; темные точки:  $[ИРТ-1] > [ИРТ-2]$ . Вертикальная красная линия – ФПУ (ИРТ-1)=57,8 нг/мл, рекомендованный производителем реактики.

Для расчета плавающего ПУ ИРТ-1 совместно с ИТ-специалистами СурГУ было разработано специализированное ПО “fIRT” (floating IRT), позволяющее проводить быструю статистическую обработку больших выборок ( $n > 500$ ). На первом этапе была визуализирована в виде гистограммы случайная выборка из 5 000 значений ИРТ-1, определенных в 2009 г. в программе регионального НС МВ (рис. 11). Самое частое значение уровня ИРТ-1 = 12,5 нг/мл. Тип распределения выборки – лог-нормальный (т.е., при логарифмировании всех значений гистограмма носит нормальное распределение).

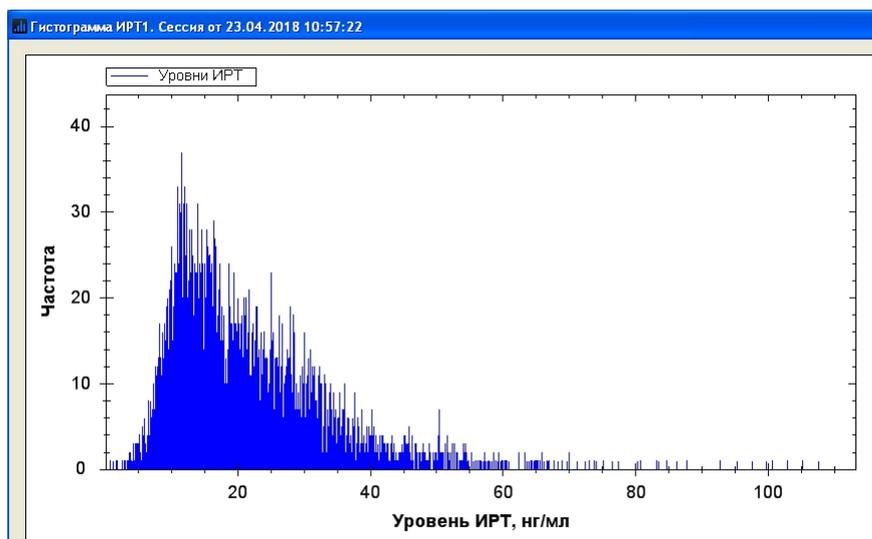


Рис. 11. Гистограмма выборки уровней ИРТ-1 для  $n=5\ 000$  (данные 2009 г.).

Наличие неоцифрованных данных рукописных журналов НС МВ (около 283 000 уникальных значений ИРТ-1 за 12-летний период) осложняло задачу создания алгоритма по расчету региональных значений ПУ ИРТ. Это обусловило использование подхода «горячих» точек (hot spots), при котором для последующей статистической обработки были оцифрованы 32 ограниченных набора данных ( $n=1\ 000$ ), сгруппированных вокруг каждого подтвержденного случая МВ. Вследствие этого общий объем выборки уменьшился почти на порядок до 32 000 единиц. Для каждого набора данных использовался принцип «скользящего окна», позволивший провести ретроспективное моделирование использования подхода ППУ ИРТ-1.

Путем последовательного перебора и для удобства расчетов в качестве оптимального был выбран 99,5-й перцентиль для каждой используемой выборки. При использовании меньшего значения (99-й, 95-й) ППУ ИРТ-1 сильно снижается, что делает нецелесообразным его использование (рис. 12).

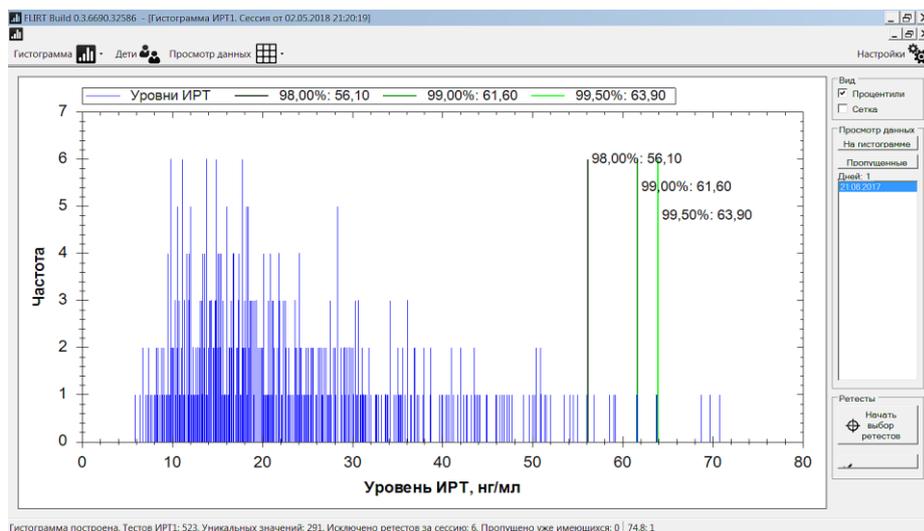


Рис. 12. ППУ ИРТ-1 для разных перцентилей выборки (n=500)

Необходимо отметить, что для каждого сета данных ППУ вычисляется для *всей* совокупности результатов за несколько рабочих дней, что значительно повышает информационную емкость и статистическую достоверность методики. Использование алгоритма расчета ППУ ИРТ-1 в трех случаях, при которых наблюдались низкие цифры ИРТ-1 (67,3; 66,8; 77,6 нг/мл), также продемонстрировало его применимость (рис. 13). Диапазон ППУ находится в пределах 61,1 – 72,2 нг/мл, а уровни ИРТ-1 достаточно высоки, чтобы не привести к ложноотрицательному результату скрининга.

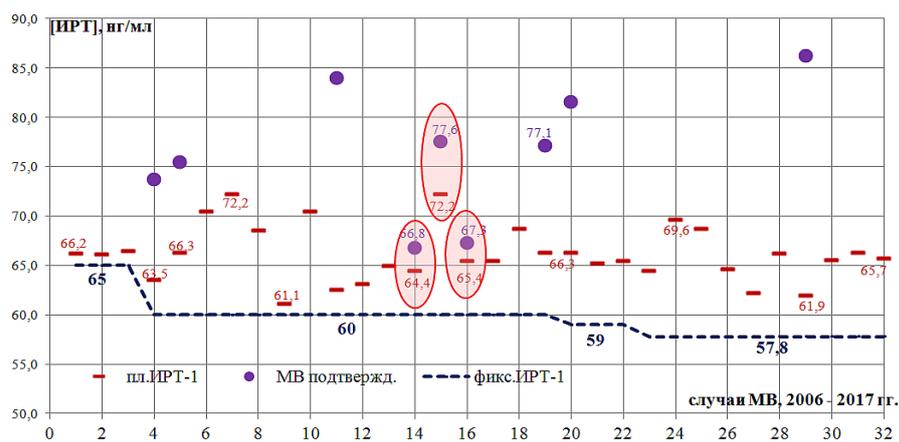


Рис. 13. Сравнение стандартного подхода и подхода с расчетом ППУ ИРТ-1 для случаев МВ в ХМАО за период 2006 – 2017 гг.

Фиолетовые точки – уровни ИРТ-1 (>90,0 нг/мл на диаграмме не отражены); красной штриховкой выделены случаи максимального «сближения» ППУ и значений ИРТ-1.

Перспективные результаты использования ПО fIRT в 2018-2019 г.г. представлены в таблице 11, из которой видно, что использование нового подхода (ППУ) позволило уменьшить число ложноположительных результатов в 2018 г. на 74,8%, в 2019 г. – на 78,6%.

Таблица 11

Сравнительная оценка результатов НС на МВ в 2018-19 г.г. при использовании фиксированного ПУ и ППУ ИРТ

Год	Кол-во исследований ИРТ-1 ежегодно	Положительный ИРТ-1 Абс/%		Ложноположительные результаты ИРТ-1 Абс/%		Установлено случаев МВ в 2018-19 г.г.		
		1	2	1	2	Всего	Положительный тест ИРТ-1	
							1	2
2018	22 226	360/1,62	93/0,42	357/1,61	90/0,41	3	3	3
2019	21 320	407/1,91	110/0,52	397/1,86	85/0,40	5	5	5

Примечание: 1 – стандартный подход (ФПУ ИРТ=57,8нг/мл); 2 – метод ППУ (ИРТ >99,5 процентиля)

Специфичность метода ППУ, по сравнению с использованием фиксированного ПУ, в 2018 г. составила 99,6% и 98,3% , в 2019 г. – 99,6% и 98,1%, соответственно, при сохранении 100% чувствительности в 2018 и 2019 г.г. Это позволило без ущерба качества диагностики МВ сократить число ретестов и снизить необходимость дальнейшего дорогостоящего обследования новорождённых с ложноположительным тестом.

## ГЛАВА 5. ВАЛИДАЦИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДИК РАСШИРЕННОЙ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ УТОЧНЯЮЩЕЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МУКОВИСЦИДОЗА.

Принятый в Российской Федерации алгоритм диагностики МВ включает в себя двухкратное определение уровней ИРТ в сухих пятнах крови с последующим проведением потового теста [21, 31]. Задачей генной диагностики является обнаружение хотя бы одной клинически значимой мутации в гене *CFTR* у 90% пациентов с МВ [80], что обеспечивается использованием панели частых (мажорных) мутаций. В федеральных генетических центрах РФ используют панели из 35-50 мутаций, характерных для российской популяции [21], что позволяет выявить 75-90% патогенных вариантов [36]. Поиск второй мутации для пациентов из регионов затрудняется рядом организационных и финансовых моментов, т.к. требует проведения дорогостоящих и продолжительных по времени методик секвенирования нуклеотидной последовательности. Как правило, подобные исследования для пациентов ХМАО-Югры выполняются ретроспективно. Трудоемкие методики секвенирования мало распространены в регионах РФ, их потенциал до сих пор слабо реализован вследствие как дефицита высококвалифицированных специалистов, так и по причине малого количества образцов для исследования и затратных коммерческих реактивов.

Поэтому в качестве второго этапа генетической диагностики МВ в клинической практике нами впервые в РФ использован метод анализа кривых плавления высокого разрешения (HRMA, или HRM-анализ) [143], позволяющий выполнять как генотипирование известных мажорных мутаций, так и «сканирование» неизвестных вариантов в пределах экзонов (кодирующих частей гена) и экзон-интронных границ гена МВ [142]. Основным преимуществом предложенного метода HRMA является резкое снижение объемов исследований для секвенирования – следующего этапа генной диагностики. При использовании HRM-анализа для всех 27 экзонов и экзон-

интронных границ гена *CFTR* возможно быстро выявить 2-3 экзона, содержащих 1-2 мутации, что выявляется по отклонениям в паттернах кривых плавления по сравнению с контрольными образцами. Соответственно, секвенирование целесообразно проводить не всех экзонов, а только 2-3-х, выбранных методом HRMA. Такой подход значительно ускоряет ход расширенной генной диагностики. Валидация метода HRMA была проведена на базе региональной лаборатории медико-генетической консультации г. Сургута. Были использованы 38 контрольных образца ДНК, полученных от пациентов с подтвержденным диагнозом МВ и известными мутациями гена *CFTR*, и от 5 здоровых индивидов (Таблица 12). Всем образцам был присвоен уникальный идентификационный номер, персональная информация была полностью обезличена. Часть образцов биоматериала была любезно предоставлена к.б.н. О.С. Готовым, г. Санкт-Петербург. Всем образцам было ранее проведено секвенирование гена *CFTR* в федеральных генетических центрах РФ, и наличие либо отсутствие мутаций было известно.

Количество мутантных аллелей в контрольной выборке 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 3 мутациями. Охарактеризованный по мутациям банк образцов геномной ДНК стал основой для валидации новой методики HRMA для поиска неизвестных мутаций в гене МВ.

HRM-анализ проводился для каждого экзона гена *CFTR* после стандартной ПЦР в режиме реального времени с интеркалятором-флуорофором, двухцепочечные ампликоны (продукты реакции) анализировались в «закрытом» режиме в амплификаторе с функцией контролируемого плавления. После выявления экзонов с отклонениями в  $T_m$  проводилось их «избирательное» секвенирование методом прямого секвенирования по Сэнгеру (методика и последовательности праймеров были адаптированы из работ [59, 62]).

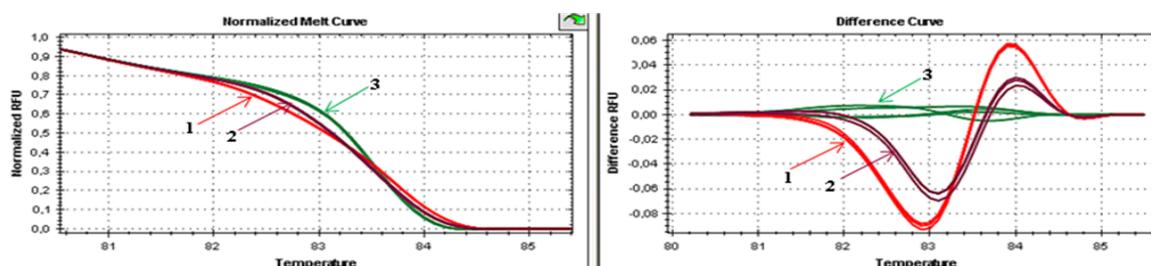
Список исследуемых мутаций гена *CFTR* в контрольной выборке

Мутации		Наименование патогенного варианта (мутации) HGVS-традиционное	Тип*		класс SNP	частота, %
№	экзон					
1	1	c.43delC(p.Leu15PhefsX10; 175delC)	del	1	-	1,3
2	2	c.91C>T(p.Arg31Cys ; R31C)	C>T	3	I	2,5
3	2, 3	c.54-5940_273+10250del21kb (p.Ser18ArgfsX16; CFTRdele2,3)	del	1	-	2,5
4	3	c.262_263delTT (p.Leu88IlefsX22; 394delTT)	Del	1	-	1,3
5		c.252T>A (p.Tyr84X)	T>A	4	IV	1,3
6	4	c.274G>A(p.Glu92Lys, E92K)	G>A	3	I	5,1
7		c.412_413insACT (p.Leu137_Leu138insThr ; L138ins)	Ins	3	-	2,5
8		c.489+1G>T (621+1G->T)	G>T	5	II	2,5
9	6	c.650A>G(p.Glu217Gly; E217G)	A>G	3	I	3,8
10		c.653T>A(p.Leu218X; L218X)	T>A	4	IV	1,3
11		c.698T>G(p.Leu233Arg)	T>G	3	II	1,3
12	7	c.831G>A(p.Trp277X)	G>A	4	I	1,3
13	8	c.1040G>A(p.Arg347His; R347H)	G>A	3	I	1,3
14	11	c.1397C>G(p.Ser466X; S466X(TAG))	C>G	4	III	2,5
15		c.1399C>T (p.Leu467Phe ; 1531C/T(L467F))	C>T	3	I	1,3
16		c.1521_1523delCTT(p.Phe508del; [delta]F508)	del	2	-	41,8
17		c.1526G>A(p.Gly509Asp)	G>A	3	I	1,3
18		c.1545_1546delTA(p.Tyr515X; 1677delTA)	del	4	-	3,8
19		c.1580insA(p.Glu528ArgfsX39)	Ins	1	-	1,3
20	12	c.1624G>T(p.Gly542X; G542X)	G>T	4	II	1,3
21	13	c.1704G>T(p.Leu568Phe ; L568F)	G>T	3	II	1,3
22	14	c.1845_1846delAA (p.Lys615fs)	del	1	-	1,3
23		c.2002C>T (p.Arg668Cys ; R668C)	C>T	3	I	1,3
24		c.2012delT(p.Leu671X; 2143delT)	del	4	-	1,3
25	20	c.3196C>T(p.Arg1066Cys ; R1066C)	C>T	3	I	2,5
26		c.3208C>T(p.Arg1070Trp ; R1070W)	C>T	3	I	1,3
27		c.3209G>A(p.Arg1070Gln; R1070Q)	G>A	3	I	2,5
28	22	c.3485G>T (p.Arg1162Leu; 3617G/T)	G>T	3	II	1,3
29		c.3705T>G(p.Ser1235Arg; S1235R)	T<G	3	II	1,3
30	23	c.3846G>A(p.Trp1282X; W1282X)	G>A	4	I	1,3
31	24	c.3909 C>G(p.Asn1303Lys; N1303K)	C>G	3	III	1,3
32		c.3929G>A (p.Trp1310X; W1310X)	G>A	4	I	1,3
33	25	c.3983 T>A (p.Ile1328Lys)	T>A	3	IV	1,3

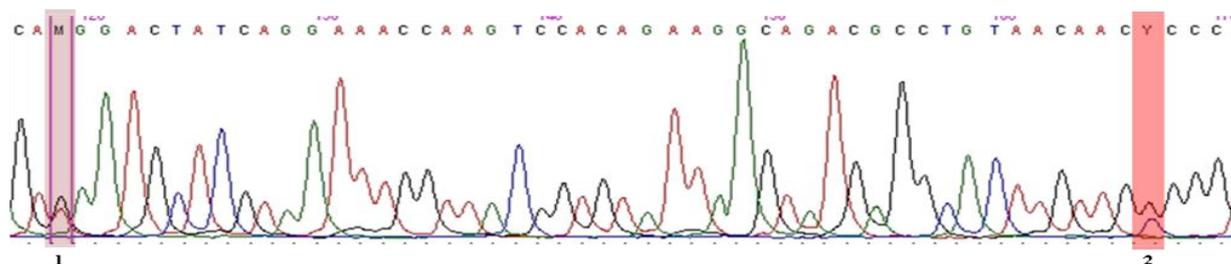
\* тип мутации: del – делеция; ins – инсерция; C>T – замена цитозина на тимин; G>A – гуанина на аденин; 1 – со сдвигом рамки считывания (frameshift); 2 – без сдвига рамки считывания; 3 – миссенс; 4 – нонсенс; 5 – дефект сплайсинга

Все образцы контрольной ДНК проводились в трех повторах через процедуру ПЦР и HRMA с последующим секвенированием (Рис. 14).

Воспроизводимость результатов была зависима от сопоставимости концентраций контрольной и тестируемой ДНК (одинаковые концентрации соответствовали одному типу кривой). Распознавание гетеро-/гомозиготного статуса определялось уникальным профилем плавления, который строился автоматически в виде двух графиков: нормализованной зависимости уровня флуоресценции от температуры и разности относительных единиц флуоресценции (RFU, relative fluorescence units) по температуре между кластеризованными кривыми (difference curve). Отличие гетерозиготного типа от дикого типа (wild-type) проводилось по разнице температур плавления ( $T_m$ , melting temperature) и по форме кривой. Отличить гомозиготный тип возможно по сдвигу в температуре плавления в меньшую сторону или используя приём гетерозиготной конверсии (предварительного смешивания с образцом ДНК wild-type в одинаковой концентрации).



а)



б)

Рис. 14 а). Профили плавления для 2 вариантов в экзоне 6 гена *CFTR*: 1) с.650A>G(p.Glu217Gly; E217G); 2) с.698T>G(p.Leu233Arg); 3) контроль ДНК wild-type; б) фрагмент электрофореграммы секвенирования соответствующего компаунд-гетерозиготного образца ДНК.

У всех контрольных образцов ДНК отклонения паттерна плавления от нормы («дикого типа») были визуализированы с помощью специализированного коммерческого программного обеспечения (ПО), которое автоматически обрабатывает массив данных уровней флуоресценции и  $T_m$ , производя в автоматическом режиме субтракцию фона, нормализацию сигналов и построение кривых плавления, удобных для интерпретации оператором. Наличие мутаций в гомозиготном состоянии подтверждалось с помощью приема «гетерозиготной конверсии», т.е. повторного тестирования с использованием смешивания образца и контроля wild-type с равными концентрациями ДНК [59].

Валидирующее исследование подтвердило возможность метода HRM-анализа одновременно выявлять мутации в разных экзонах гена (Рис. 15). Это обеспечивается разностью в  $T_m$  для каждого из тестируемых экзонов, что в свою очередь является предметом предварительного дизайна праймеров для ПЦР [149] с использованием ПО uMELT [103].

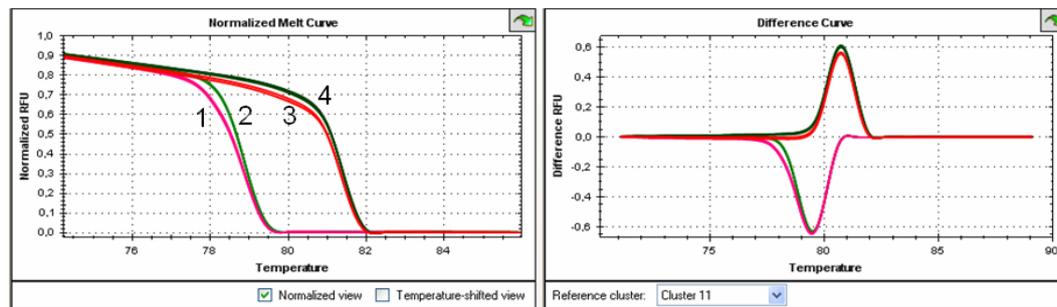


Рис. 15. Детекция двух независимых мутаций в разных экзонах гена *CFTR* для компаунд-гетерозиготного образца [ $\Delta$ ]F508/E92K (1 – E92K; 3 – [ $\Delta$ ]F508; 3 и 4 – wild-type ДНК)

Исследованные мутации являются 1-, 2-, 3-нуклеотидными инсерциями/делециями (ins/del) и включают все 4 класса (I-IV) однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs, single nucleotide polymorphisms), которые отличаются между собой по величине сдвига  $T_m$ : класс I – замены G/A, C/T ( $\Delta T_m > 0,5^\circ\text{C}$ ), класс II – G/T, C/A, класс III – C>G ( $0,2 < \Delta T_m < 0,5^\circ\text{C}$ ); класс IV

– A/T,  $\Delta T_m < 0,2^\circ\text{C}$ . Валидируемый метод доказал свою эффективность в обнаружении даже IV класса SNP с минимальной разницей температур плавления между мутантным и диким типом (3 мутации в выборке).

В спектре мутаций контрольной выборки (Рис. 16) преобладал самый частый патогенный вариант –  $[\text{delta}]F508$  (41,8%), далее в порядке убывания частоты находится т.н. «чувашская» мутация E92K (5,1%), E217G, «кавказская» мутация 1677delTA (по 3,8%). Таким образом, частоты четырех мажорных мутации составили более половины общей частоты изученных мутаций, а суммарная частота 29 редких вариантов составила 45,6%.

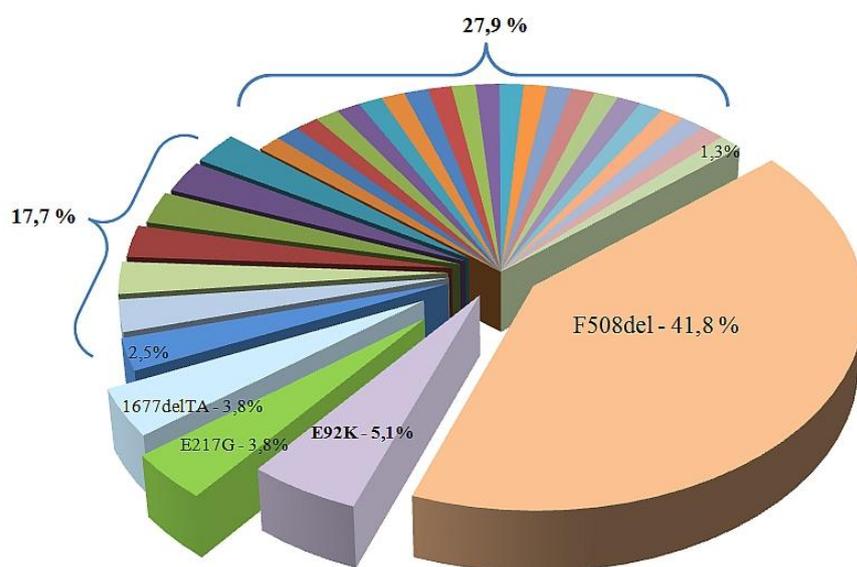


Рис. 16. Аллельная частота мутаций гена *CFTR* в контрольной выборке для валидации метода HRMA. Фигурными скобками объединены группы редких мутаций с частотой встречаемости 2,5% и 1,3%.

Были определены также операционные характеристики предложенного комплекса методик HRMA + секвенирование. Специфичность метода составила 100%, т.е. были корректно определены отклоняющиеся от контрольных паттерны плавления для образцов ДНК, содержащих мутации и паттерны плавления образцов ДНК «дикого типа». Чувствительность метода ниже – 97,3% («славянская» мутация в двух образцах не была заподозрена), что определяется принципиальной невозможностью и HRMA, и классического

секвенирования определять обширные генные перестройки. Для исследования такого типа мутаций традиционно используется метод MLPA (multiplex ligation probe amplification, мультиплексная зависящая от лигирования амплификация зондов) [37, 193], который и был успешно применен для тестирования соответствующих образцов.

Валидированные методы HRMA, секвенирования, MLPA были использованы для расширенного генетического тестирования всех пациентов с диагнозом МВ, включенных в региональный регистр (ведется с 2012 г.). По состоянию на конец 2019 г. было обследовано 54 человека, из них детей – 46, взрослых – 8. Было выявлено 36 вариантов (34 – достоверно патогенные, 2 – с неизвестной клинической значимостью, предположительно непатогенные) во всех экзонах, кроме №№ 5, 9, 12, 15, 17-19, 26, 27.

Количество исследованных аллелей составило 111, из них 9 мажорных мутаций с частотой более 1%, и 25 редких мутаций, каждая из которых встречается лишь у одного пациента (Таблица 13). У трех пациентов было обнаружено по 3 аллеля, что объясняет нечетное суммарное число всех вариантов ( $n=111$  вместо ожидаемого  $54 \times 2 = 108$ ). Так, у двух человек мутации S466X, R1070Q были выявлены в cis-положении (т.е. на одной хромосоме), образуя комплексный аллель [S466X;R1070Q], который по данным [36] встречается только в российской популяции. У одной пациентки с МВ в дополнение к 2 мутациям был выявлен вариант с неизвестной клинической значимостью L467F.

Все выявленные варианты были подтверждены независимыми исследованиями методом NGS (секвенирования нового поколения) на базе ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О.Отта» (г. Санкт-Петербург) и МГНЦ им. Н.П. Бочкова (г. Москва) со 100% воспроизводимостью.

Список патогенных вариантов гена *CFTR* у пациентов из регионального регистра МВ в ХМАО-Югре.

№	Название варианта	класс*	Экзон	тип мутации	кол-во (n=111)	частота, %
1	[delta]F508 #	II	11	делеция без сдвига рамки считывания (СРС)	57	51,4
2	1677delTA	I	11	делеция с СРС	6	5,4
3	E92K	V	4	миссенс; дефект сплайсинга	5	4,5
4	CFTRdele2,3	I	2-3	обширная перестройка	4	3,6
5	R1066C	II	20	миссенс	4	3,6
6	L138ins	IV	4	инсерция без СРС	2	1,8
7	S466X**	I	11	нонсенс	2	1,8
8	L467F	-	11	VUCS §	2	1,8
9	R1070Q**,#	I	20	миссенс	2	1,8
10	175delC	I	1	делеция с СРСя	1	0,9
11	c.252T>A (p.Tyr84X)	I	3	нонсенс	1	0,9
12	394delTT	I	3	делеция с СРСя	1	0,9
13	574delA	I	4	делеция с СРСя	1	0,9
14	621+1G>T	I	интрон 4	дефект сплайсинга	1	0,9
15	E217G	-	6	VUCS §	1	0,9
16	L218X	I	6	нонсенс	1	0,9
17	c.698T>G(p.Leu233Arg)	-	6	миссенс	1	0,9
18	c.G831A(p.W277X)	I	7	нонсенс	1	0,9
19	R334W	IV	8	миссенс	1	0,9
20	R347H	IV	8	миссенс	1	0,9
21	c.1312A>G (p.Thr438Ala)	-	10	миссенс	1	0,9
22	c.1580insA(p.Glu528ArgfsX39)	-	11	нонсенс	1	0,9
23	G542X	I	13	нонсенс	1	0,9
24	L568F	-	13	миссенс	1	0,9
25	R668C	-	14	миссенс	1	0,9
26	2143delT	-	14	делеция с СРСя	1	0,9
27	Q781X	I	14	нонсенс	1	0,9
28	R785X	I	14	нонсенс	1	0,9
29	intron 16 c.2657+5G>A	V	интрон 16	дефект сплайсинга	1	0,9
30	R1070W	-	20	миссенс	1	0,9
31	D1152H	IV	21	миссенс	1	0,9
32	3617G/T	-	22	VUCS §	1	0,9
33	W1282X	I	23	нонсенс	1	0,9
34	N1303K	II	24	миссенс	1	0,9
35	W1310X	I	24	нонсенс	1	0,9
36	c.3983 T>A (p.Ile1328Lys)	-	25	миссенс	1	0,9

Примечания: \* по данным [152], \*\* в российской популяции S466X всегда сцеплена с R1070Q [36], \*\*\* вероятно патогенный вариант, § VUCS - вариант неизвестного клинического (патогенного) значения, # мутации, для которых имеется таргетная терапия, - нет данных.

При обследовании всей когорты пациентов было выявлено разнообразие спектра патогенных вариантов гена *CFTR* (Рис. 17).

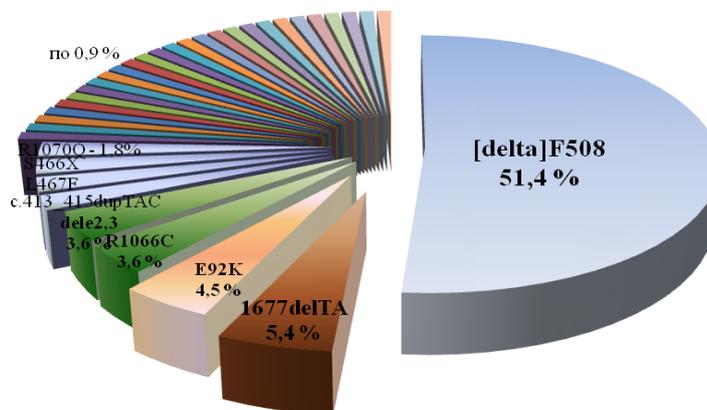


Рис. 17. Спектр региональных мутаций гена *CFTR* у пациентов из регионального регистра МВ в ХМАО-Югре.

Тяжелые мутации I класса встречались чаще всего (16 из 36), преимущественно типа «нонсенс», II типа – только 3 мутации (однако, самые частые, включая [delta]F508). Обнаружено 6 «мягких» вариантов классов IV, V с остаточной функцией хлорного канала, у которых частично сохранена экзокринная функция поджелудочной железы.

Варианты с неизвестным клиническим значением (VUCS) обнаружены в компаунд-гетерозиготном состоянии с [delta]F508 у 4 пациентов со средне-тяжелым течением МВ. У 14 пациентов выявлена мутация [delta]F508 в гомозиготном состоянии, что обусловило тяжелое течение МВ у двух взрослых пациентов с МВ (без НС).

Интересно отметить, что по региональной структуре мутаций ХМАО-Югра больше всего соответствует Северо-Кавказскому федеральному округу, согласно данным общероссийского регистра 2017 г. [39]. В обоих округах «славянская» мутация *CFTR*dele2,3 смещена со 2-го места (в сводном регистре) на 4 и 6 места (ХМАО и СКФО, соответственно), а её место заняла

«кавказская» мутация 1677delTA. Еще одна мутация R1066C, специфичная для населения Северного Кавказа, встречается с той же частотой 3,6%, что и «славянская» мутация CFTRdele2,3, что возможно является отражением динамики миграционных потоков такого развитого региона, как ХМАО-Югра. На 3-м месте по частоте – мутация E92K, характерная также для пациентов с МВ из Приволжского федерального округа. Остальные 25 редких вариантов (частота 0,9%) были выявлены лишь однажды.

## ГЛАВА 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### 6.1. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В соответствии с поставленными задачами для достижения цели исследования, работа была разделена на три этапа.

На первом этапе решались 3 первые задачи исследования, связанные с клинико-эпидемиологическими особенностями МВ у детей в условиях массового внедрения НС на примере ХМАО-Югры. Для этого проведено сплошное когортное сравнительное ретроспективное исследование.

Для решения первых 2-х задач использовали данные регионального регистра МВ за период с 2012 г. (начало ведения регистра) по 2018 г. Обращает на себя внимание факт значительных колебаний частоты рождения детей с МВ в разрезе каждого года (от 0,0 в 2014 до 1-го случая на 5 560 живорождённых в 2012 г.). Вероятно, это связано с относительно малым числом новорождённых на отдельно взятой территории и редкостью самого заболевания.

Это обосновывает необходимость расчёта среднемноголетнего показателя, который за период ведения регистра (2012-18 г.г.) составил 1 случай на 9 025 новорождённых, что соответствует таковому в РФ [39]. За период ведения регистра был один случай летального исхода от МВ в 2012 году у подростка, а среди детей 0-14 лет с МВ смертности не было.

Нами установлены связи между уровнями рождаемости, удельным весом детей в общей популяции населения на территории и распространённостью МВ на 100 000 человек на примере всех 6-ти регионов УрФО – Ямало-Ненецкий и Ханты-Мансийский автономные округа, Свердловская, Челябинская, Тюменская и Курганская области ( $r = 0,80$  и  $r = 0,70$ , соответственно;  $p < 0,05$  в обоих случаях, метод ранговой корреляции). Этим можно объяснить факт наибольшей распространённости МВ в ХМАО-Югре (3,0 на 100 000 населения) в условиях самой высокой рождаемости и наиболее высокого удельного веса детей в структуре населения, по сравнению с другими регионами УрФО и связать это с эффектом «накопления» больных, прежде всего в когорте детей.

Установленные нами эпидемиологические показатели МВ в ХМАО-Югре могут быть использованы при планировании ресурсов здравоохранения для оказания медицинской помощи больным МВ на территории ХМАО-Югры.

При анализе регистра МВ установлены количественные и структурные изменения когорты детей с МВ с 2012 г. по 2018 г., которые заключались в следующем.

Зарегистрировано увеличение на 35,7% абсолютного числа пациентов в ХМАО-Югре с 2012 до 2018 г.г. главным образом за счёт детей 0-14 лет (на 43,3%), в меньшей степени – за счёт больных старше 14 лет (на 16,7%). Одновременно увеличился средний возраст больных в 1,46 раза также за счёт когорты детей (в 2,1 раза), в отличие от пациентов-подростков и взрослых (в 1,23 раза), что оказалось достоверным статистически во всех возрастных группах ( $p < 0,05$ ; метод Манна-Уитни).

Установленную динамику изучаемых показателей логично связать с ростом числа пациентов в первую очередь детского возраста, так как за период с момента внедрения НС МВ (с 2006 г.), благодаря которому улучшилась ранняя диагностика заболевания, максимальный возраст больных в последний анализируемый год (2018) составил 12 лет. При этом в возрастной структуре больных МВ значимой динамики за исследуемый период не установлено ( $p > 0,05$ , метод углового преобразования Фишера): дети 0-14 лет во все годы наблюдения составляли около 2/3 больных МВ.

Структура пациентов по полу, как в целом, так и в когорте детей до 14 лет, статистически значимо не изменялась от 2012 до 2018 г.г. ( $p > 0,05$ , метод углового преобразования Фишера) и характеризовалась небольшим преобладанием больных девочек.

Возрастал от года к году и статистически значимо различался в 2012 г. и в 2018 г. удельный вес детей с НС: 60,0% до 90,7%, соответственно;  $p < 0,01$  методом углового преобразования Фишера.

По данным 2018 года средний возраст при установлении диагноза МВ у пациентов без НС был статистически значимо большим, чем с НС. При этом средний возраст больных в когорте пациентов в 2018 году без НС закономерно также был большим, чем у больных с НС. В период проведения НС диагноз МВ в абсолютном большинстве случаев устанавливался в грудном возрасте.

Для сравнительной характеристики основных клинических, лабораторных и функциональных показателей в когорте детей 0-14 лет с МВ нами взяты данные из регистра 2012 г. и 2018 г. За 7-летний период количественная и структурная характеристика когорты детей с МВ претерпела изменения, главными из которых были статистически значимые увеличение среднего возраста пациентов ( $p < 0,01$  метод, Манна-Уитни) и рост удельного веса больных, которым проводился НС ( $p < 0,01$ , метод углового преобразования Фишера). При этом увеличился средний возраст как среди пациентов с НС, так и без него ( $p < 0,01$  в обоих случаях, метод Манна-Уитни).

При отсутствии статистически значимых различий в когортах пациентов 2012 г. и 2018 г. по среднему значению ИМТ ( $p > 0,05$ , метод Манна-Уитни), зарегистрировано статистически значимое уменьшение удельного веса пациентов с низким ИМТ ( $< 1$  SDS) от 2012 к 2018 г.г. от 40,0% до 18,6% ( $p < 0,05$ , метод углового преобразования Фишера). При этом рост и масса тела статистически значимо возрастали от 2012 г. к 2018 г. ( $p < 0,01$  в обоих случаях, метод Манна-Уитни), что логично связать с увеличением среднего возраста больных.

Статистически значимых различий в когортах детей с МВ 2012 г. и 2018 г. по показателю ОФВ1, который отражает степень бронхиальной проходимости, нами не установлено ( $p > 0,05$ , метод Манна-Уитни).

Полнота охвата больных генной диагностикой возросла за период ведения регистра: в 2012 г. генетический диагноз был установлен полностью только в 13,3% случаях, у остальных пациентов была обнаружена либо только мутация в одном аллельном гене (83,3%), либо не обнаружена ни одна мутация; в 2018 г.

всем пациентам установлен полный генетический диагноз. Данная ситуация связана с тем, что в 2012 г. на региональном уровне для диагностики были доступны только мажорные мутации, а полное секвенирование гена *CFTR* было проведено лишь небольшой части пациентов в федеральном центре. В 2018 г. после внедрения нами в региональной генетической лаборатории метода анализа кривых плавления (HRMA) на первом этапе генной диагностики с последующим проведением прицельного секвенирования конкретного экзона/экзонов гена *CFTR* (см. главу 5) позволило обеспечить 100-процентную доступность для осуществления полной генной диагностики МВ [21].

Нами не установлено статистически значимых различий удельного веса пациентов со стеатореей (учитывался худший показатель в течение года - +++ и более;  $p > 0,05$ , метод углового преобразования Фишера).

Статистически значимых различий по частоте высева различных бактериальных агентов в когортах больных 2012 г. и 2018 г. нами не установлено ( $p > 0,05$  во всех случаях, метод углового преобразования Фишера). Однако, в 2018 г. у 3-х детей диагностирована хроническая колонизация *Ps. Aeruginosa*, у одного – *Burkholderia ceracia complex*, у одного – неферментирующая грам-отрицательная флора (*Acinetobacter baumannii*), что обосновывает необходимость более жёсткого выполнения санитарно-противоэпидемических мероприятий и пересмотра тактики антибактериальной терапии.

Сравнительный анализ методов лечения в регистрах 2012 г. и 2018 г. показал следующее. В целом подходы к терапии МВ у детей не изменились. Все пациенты за период ведения регистра получали ингаляционно Дорназу альфа, минимикросферические панкреатические ферменты. Однако частота применения отдельных видов терапии в ряде случаев имела статистически значимые различия. Так, в 2018 г. реже назначались пролонгированные курсы (в сумме более 3 месяцев в году) внутривенной антибиотикотерапии (60,0% и 27,9%, соответственно;  $p < 0,05$  методом углового преобразования Фишера),

использовались таблетированные антибактериальные препараты (83,3% и 14,0%, соответственно;  $p < 0,05$  методом углового преобразования Фишера), ингаляционные стероиды (33,3% и 4,65%, соответственно;  $p < 0,05$  методом углового преобразования Фишера), ингаляционные бронхолитики (40,0% и 2,32%, соответственно;  $p < 0,01$  методом углового преобразования Фишера). Не исключено, что это связано с реже встречавшимся более тяжёлым поражением лёгких у детей в 2018 г., по сравнению с 2012 г.

Далее нами исследованы связи между основными клинико-функциональными показателями МВ и, с одной стороны - возрастом постановки диагноза, с другой - длительностью заболевания. Для этого выделена группа пациентов из регистра 2012 г. без НС, что обеспечило больший разброс возраста на момент обследования (т.е., длительности болезни) и возраста постановки диагноза (у детей с НС этот разброс минимален).

Установленные методом ранговой корреляции достоверные связи между возрастом при постановке диагноза МВ и ИМТ ( $r = - 0,80$ ,  $p < 0,05$ ), показателем ОФВ1 ( $r = - 0,64$ ,  $p < 0,05$ ), суммарным числом койко-дней в текущем году ( $r = 0,81$ ,  $p < 0,05$ ) логично считать отражением негативного влияния поздней диагностики МВ на течение заболевания. Статистически значимые обратные связи между возрастом на момент обследования, ИМТ ( $r = - 0,66$ ,  $p < 0,05$ ), показателем ОФВ1 ( $r = - 0,62$ ,  $p < 0,05$ ), суммарным числом койко-дней в текущем году ( $r = 0,63$ ,  $p < 0,05$ ) косвенно свидетельствуют об ухудшении клинико-функциональных показателей по мере увеличения возраста пациента, отражая процесс прогрессирования заболевания.

Таким образом, в когорте детей 0-14 лет с МВ в ХМАО-Югре в динамике с 2012 до 2018 года в условиях внедрения массового НС произошли изменения, которые характеризовались увеличением абсолютного числа пациентов, увеличением среднего их возраста и удельного веса детей с НС, уменьшением среднего возраста постановки диагноза, меньшей лекарственной нагрузкой на пациентов.

Установленные связи между возрастом постановки диагноза МВ, возрастом на момент обследования, клинико-функциональными показателями и суммарным количеством дней пребывания в стационаре в текущем году свидетельствуют о влиянии на тяжесть заболевания двух факторов - своевременности постановки диагноза и длительности болезни.

Поэтому для решения 3-й задачи проведена предварительная стандартизация пациентов по возрасту (см. главу «Материалы и методы исследования») для нивелирования фактора длительности заболевания с целью оценки эффективности ранней диагностики МВ в условиях массового внедрения НС.

В стандартизированных по возрасту сравниваемых группах отсутствовали статистически значимые различия ( $p > 0,05$ ) по возрасту на момент анализа данных пациентов (метод Манна-Уитни), гендерной структуре (метод углового преобразования Фишера), результатов генной диагностики по частоте мутации F508del (метод углового преобразования Фишера), уровню хлоридов пота (метод Манна-Уитни), частоте мекониевого илеуса (метод углового преобразования Фишера). В то же время в группе без НС диагноз устанавливался значительно позже, чем у пациентов с НС (4,50(1,38-6,53) и 0,63(0,15-1,82) лет, соответственно;  $p < 0,05$ , метод Манна-Уитни). Это свидетельствовало о сопоставимости групп с НС и без НС по основным параметрам, которые могут влиять на особенности течения заболевания, кроме возраста постановки диагноза.

На более тяжёлое течение заболевания в группе без НС указывают более низкие показатели ИМТ и лучшего в текущем году ОФВ1 по данным спирометрии (ИМТ: 15,3(14,9-15,6) и 19,4(17,7-19,9) кг/м<sup>2</sup>, соответственно; ОФВ1: 93,0(86,5-95,0) и 100,0(95,0-111,3) % от нормы, соответственно;  $p < 0,05$  в обоих случаях, метод Манна-Уитни). Установленные закономерности свидетельствуют о худшем нутритивном статусе и более тяжёлом поражении

органов дыхания с наличием бронхиальной обструкции у пациентов без НС, т.е с более поздней постановкой диагноза МВ.

Негативным следует считать чаще встречающуюся в группе без НС интермиттирующую колонизацию *Ps. aeruginosa* (45,5% и 12,5%, соответственно;  $p < 0,05$  по методу углового преобразования Фишера), что по сравнению с другими бактериальными агентами, имеет большую значимость с точки зрения прогрессирования бронхолёгочного процесса при МВ [1].

Нами не установлены различия по частоте стеатореи (27,3% и 31,3%, соответственно;  $p > 0,05$  по методу углового преобразования Фишера) в группах с НС и без НС. Для оценки влияния мальабсорбции и эффективности ферментотерапии более объективными являются показатели нутритивного статуса пациента, наиболее значимым из которых служит ИМТ. Стеаторея имеет преходящий характер: недостаточная доза панкреатина увеличивает степень стеатореи, а назначение адекватной дозы препарата способствует её исчезновению.

Частота госпитализаций в группах сравнения не имела статистически значимых различий ( $p > 0,05$ , метод Манна-Уитни), однако суммарное число койко-дней пациентов без НС было больше, чем в группе с НС, что оказалось статистически значимым ( $p < 0,05$ , метод Манна-Уитни). При плановом числе госпитализаций пациентов с МВ один раз в 3 месяца в группе без НС была необходимость более длительных нахождений в стационаре из-за более тяжёлого течения болезни при более поздней его диагностике.

По основным показателям базисной терапии МВ (удельный вес детей с МВ, получающих панкреатические ферменты, Дорназу альфа, жирорастворимые витамины, урсодезоксихолиевую кислоту, применяющих регулярно кинезитерапию) не установлено статистически значимых различий у пациентов без НС и с НС ( $p > 0,05$  во всех случаях по методу углового преобразования Фишера).

Однако нами установлены статистически значимые различия в группах с НС и без НС по продолжительности внутривенной антибиотикотерапии и таблетированных антибактериальных препаратов (в последнем случае - в основном, ципрофлоксацин при колонизации *Ps. Aeruginosa*): в группе без НС суммарная длительность в днях этих курсов была более продолжительной, чем у детей с НС ( $p < 0,05$  в обоих случаях, метод углового преобразования Фишера).

Также детям без НС чаще и продолжительнее назначались ингаляционные бронходилататоры и ингаляционные кортикостероиды ( $p < 0,05$  в обоих случаях, метод углового преобразования Фишера), что свидетельствовало о тяжёлом поражении бронхолёгочного аппарата с выраженной бронхиальной обструкцией при более поздней диагностике МВ. Факты применения системных глюкокортикостероидов в группах наблюдения не установлены. Макролиды использовались с одинаковой частотой в обеих группах ( $p > 0,05$  по методу углового преобразования Фишера).

Таким образом, внедрение массового НС МВ способствовало лучшей выявляемости заболевания и его более ранней диагностике. Раннее начало базисной терапии МВ способствовало менее выраженному прогрессированию болезни в первую очередь по показателям нутритивного статуса и функционального состояния лёгких, что отражает клинический патоморфоз МВ в условиях внедрения массового НС.

Своевременное начало базисной терапии МВ после установления диагноза на основе НС способствует уменьшению потребности в более длительных курсах внутривенных, пероральных антибактериальных средств и препаратов для купирования бронхообструктивного синдрома (ингаляционные бронхолитики и кортикостероиды).

Для решения 4-й задачи было проведено сплошное ретроспективно-проспективное когортное сравнительное исследование, по результатам которого была доказано эффективное использование региональных пороговых

величин биомаркера ИРТ. Ретроспективная часть исследования обеспечила полный анализ данных биохимической части НС МВ. Было выявлено большое число ложноположительных результатов, что является неизбежным при использовании протокола ИРТ/ИРТ и рекомендованного производителем реагентику фиксированного ПУ ИРТ-1. Следствием этого является рост нерациональных трат на проведение повторного теста (ИРТ-2) и негативное влияние на психологическое состояние родителей, ожидающих результаты ретеста.

Использование предложенной методики расчета плавающего ПУ ИРТ (для 99,5 перцентиля выборки исследуемых образцов) на ретроспективных данных показало не меньшую результативность в сравнении с традиционным подходом, использующим фиксированный ПУ для всех подтвержденных случаев МВ, выявленных в НС в ХМАО за период 2006 – 2017 гг. Внедрение автоматизированного метода расчета ППУ с помощью авторской программы ЭВМ “fIRT” позволяет в рабочем порядке с минимальными затратами времени проводить все необходимые статистические расчеты. Использование программы в проспективной части исследования (2018 – 2019 гг.) показало снижение общего количества ретестов на 74,8% в 2018 г. и на 75,8% в 2019 г. При этом специфичность теста ИРТ повысилась до 99,6% при сохранении 100%-й чувствительности и отсутствии ложноотрицательных результатов скрининга.

Для решения 5-й задачи впервые в РФ было проведено предварительное валидирующее исследование для оценки применимости методики анализа кривых плавления высокого разрешения (HRMA) в рутинной практике региональной генетической лаборатории для поиска мутаций в кодирующей части гена *CFTR* (экзонах) и последующего секвенирования по Сэнгеру только тех экзонов, в которых были обнаружены отклонения от контролей. Результаты исследования продемонстрировали успешное использование комплекса методов HRMA-секвенирование: при 100% специфичности чувствительность

методик ниже (97,3%) за счет невозможности выявления протяженных генных перестроек. Однако, данный вид мутаций определяется с помощью метода MLPA. Таким образом, комбинация трех видов молекулярно-генетических методов позволила провести расширенное генетическое исследование у всех пациентов с МВ, внесенных в региональный регистр ХМАО-Югры и определить структуру региональных мутаций. При обследовании всей когорты пациентов было выявлено разнообразие спектра патогенных вариантов гена *CFTR*.

Неоспоримое преимущество предложенного метода HRM-анализа – быстрое проведение расширенного генетического исследования мутаций в гене *CFTR* на региональном уровне. В качестве стартового биоматериала может быть использована как цельная кровь с ЭДТА, так и сухие пятна крови на бланках НС. В реальной клинической ситуации, когда ребенок находится далеко от лаборатории (что актуально для ХМАО-Югры) и важно как можно быстрее провести диагностический поиск, использование бланков НС значительно упрощает задачу генной диагностики. Предложенный метод может быть без затруднений интегрирован в общий рабочий процесс любой ПЦР-лаборатории, оборудованной амплификатором с функцией плавления в режиме реального времени и классическим секвенатором. При условии предварительной подготовки планшетов с реактивами, хранящихся при  $-30^{\circ}\text{C}$  в течение 1 месяца без потери качества, «закрытый» формат исследования (без открывания пробирок и риска контаминации) позволяет уже в течение 3 часов провести сканирование гена на предмет неизвестных мутаций и определить 2-3 экзона, для которых в ближайшие 1-2 рабочих дня проводится расшифровка нуклеотидной последовательности с выявлением мутаций.

Кроме того, расшифрованная структура мутаций региона ХМАО-Югра позволяет с помощью предложенного метода HRM-анализа разработать панель частых региональных мутаций у пациентов с МВ, диагностируемых в округе,

что повысит информативность первого этапа генной диагностики МВ и ускорит процесс расширенного поиска мутаций в гене *CFTR*.

На рис. 18 представлен рекомендуемый алгоритм (последовательность действий) диагностики МВ, учитывающий как использование ППУ в биохимической части НС, так и возможности проведения расширенной генной диагностики на региональном уровне.

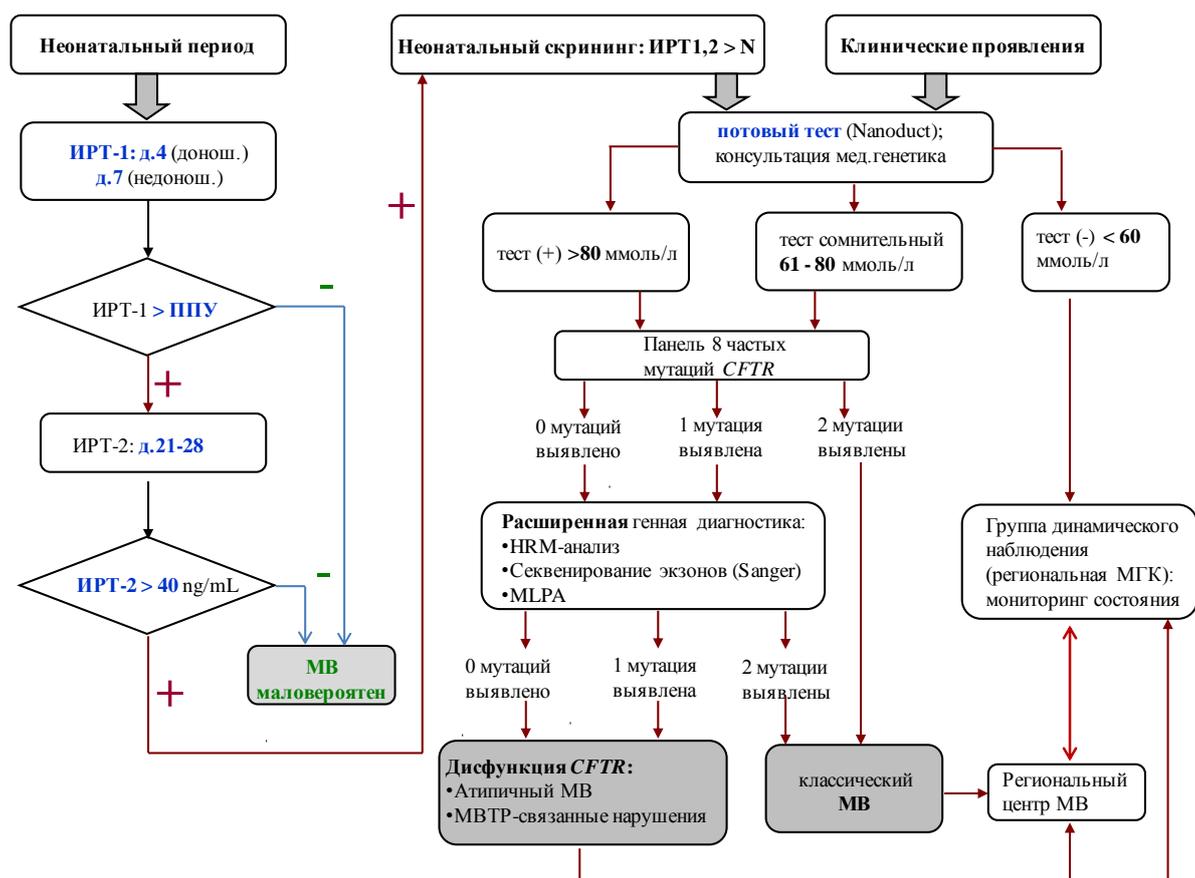


Рис. 18. Алгоритм диагностики МВ в ХМАО-Югре.

При наличии повышенных цифр ИРТ-1, ИРТ-2 проводится трижды потовый тест. При положительном (>80 ммоль/л) или сомнительном (61 – 80 ммоль/л) результате потового теста проводится ДНК-диагностика с коммерческим набором на 8 частых мутаций. Чаще всего обнаруживается лишь одна мажорная мутация в гетерозиготном состоянии. В таком случае начинается второй этап – расширенная генная диагностика: сканирование экзонов и экзон-интронных границ гена *CFTR* методом HRM-анализа,

секвенирование отдельных экзонов гена и MLPA для исключения делеций/дупликаций. Если вторая мутация не выявляется и после проведения расширенного обследования, то подобные пациенты нуждаются в динамическом наблюдении у врача-генетика в региональной медико-генетической консультации (МГК) с целью своевременной фиксации первых клинических проявлений МВ. По крайней мере, подобные пациенты являются носителями патогенных вариантов гена *CFTR*, а их родители нуждаются в генетическом консультировании. Специалисты уже на региональном уровне должны быть озабочены надлежащей идентификацией пациентов с атипичным МВ и *CFTR*-связанными нарушениями (дисфункцией *CFTR*).

## 6.2 ВЫВОДЫ

1. Среднемноголетний показатель заболеваемости МВ в ХМАО-Югре за период с 2012 по 2018 г.г. составил 1 случай на 9025 живорождённых детей. Самая высокая распространённость МВ в ХМАО-Югре среди 6-ти субъектов УрФО, 3,0 на 100 000 населения, связана с более высокой рождаемостью, большим удельным весом детей 0-14 лет в структуре населения и как следствие – с эффектом «накопления» больных в популяции детей.

2. Клинико-лабораторные и функциональные показатели МВ у детей определяются сочетанным влиянием двух факторов, характеризующих когорту пациентов в процессе массового внедрения НС в динамике – уменьшением возраста постановки диагноза и увеличением среднего возраста больных.

3. Связанный с ранней диагностикой МВ на основе массового внедрения НС и своевременно начатой комплексной терапией клинический патоморфоз заболевания характеризовался более благоприятным течением болезни по данным оценки нутритивного статуса (ИМТ), функциям внешнего дыхания (ОФВ1), частоте интермиттирующей колонизации *Ps. Aeruginosa* с возможностью уменьшения объёма терапии и сокращения длительности пребывания в стационаре.

4. Чувствительность НС на МВ в ХМАО-Югре при применении рекомендованного изготовителем реактивов для определения ИРТ его фиксированного порогового уровня составила 100%, специфичность – 98,1%. Внедрение разработанной авторской программы ЭВМ “floating level of IRT” по определению «плавающего» порогового уровня ИРТ позволило уменьшить число ложноположительных результатов НС на 74,8% в 2018 г., на 78,6% – в 2019 г, и повысить уровень специфичности метода до 99,6% при сохранении 100% его чувствительности.

5. Применение HRMA с последующим прямым секвенированием по Сэнгеру отдельных экзонов, содержащих мутации, позволяет значительно расширить диагностику спектра мутаций на региональном уровне и в 98%

случаев установить тип мутации в гене *CFTR*, чувствительность – 97,3%, специфичность – 100%. Ложноотрицательные результаты характерны для протяженных делеций/инсерций и сложных перестроек в гетерозиготном состоянии, что требует проведения MLPA. Полный охват генной диагностикой детей с МВ в ХМАО-Югре с использованием HRMA позволил установить следующую структуру мутаций в гене *CFTR*: 51,4% - F508del; 5,4% - 1677delTA; 4,5% - E92K; по 3,6% - CFTRdele2,3 и R1066C; по 1,8% - L138ins, S466X, R1070Q, L467F; суммарная аллельная частота 27 редких мутаций (частота каждой 0,9%), составила 24,3%.

### 6.3. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Департаменту здравоохранения ХМАО-Югры и региональному центру МВ рекомендуется: учитывать установленные эпидемиологические показатели МВ при планировании кадровых и материальных ресурсов для оказания медицинской помощи детям с МВ.

Педиатрам, оказывающим медицинскую помощь детям с МВ, рекомендуется учитывать клинические особенности течения заболевания в зависимости от возраста постановки диагноза у пациентов с наличием или отсутствием НС при планировании и осуществлении лечебно-профилактических мероприятий. Медико-генетической консультации БУ ХМАО-Югры Окружной кардиологический диспансер «Центр диагностики и сердечно-сосудистой хирургии» рекомендуется:

- внедрение разработанной программы ЭВМ по определению референсных значений ИРТ с целью сокращения ложноположительных результатов теста и затрат на дальнейших этапах диагностики МВ (ретест, потовый тест, молекулярно-генетическая диагностика);

- внедрение метода HRMA с последующим секвенированием по Сэнгеру для повышения качества молекулярно-генетической диагностики заболевания на региональном уровне и снижения потребности в дорогостоящем обследовании в федеральных центрах.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амелина, Е.Л. Муковисцидоз: определение продолжительности жизни / Е.Л. Амелина, А.В. Черняк, А.Л. Черняев // Пульмонология. – 2001. – № 3 – С. 61-64.
2. Ашерова, И.К. Регистр как средство улучшения качества медицинской помощи больным муковисцидозом / И.К. Ашерова, Н.И. Капранов // Педиатрическая фармакология. – 2012. – №3– С. 96-100.
3. Бельмер, С.В. Применение высокоактивных форм панкреатина в педиатрической практике / С.В. Бельмер, В.Ф. Приворотский, С.В. Рычкова [и др.] // Вопросы детской диетологии. – 2014. – Т.12. – №3. – С. 66-71.
4. Бойцов, С.А. Регистры в кардиологии. Основные правила проведения и реальные возможности / С.А. Бойцов, С.Ю. Марцевич, Н.П. Кутищенко [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2013. Том 12. – № 1. – С. 4 – 9.
5. Боровиков, В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA / В.П. Боровиков. – Москва: Горячая линия-Телеком, 2016. – 288 с. – ISBN 978-5-9912-0326-5.
6. Бушина, М.Г. Распространенность и клинико-лабораторные особенности муковисцидоза у детей и подростков Оренбургского региона: автореф. дис. ...канд. мед. наук / Бушина Марина Георгиевна. – Оренбург, 2009. – 34 с.
7. Власов, В.В. Эффективность диагностических исследований / В.В. Власов. – Москва: Медицина, 1988. – 256 с. – ISBN 5-225-00104-1.
8. Воронина, О.Л. Особенности микробиома респираторного тракта больных муковисцидозом / О.Л. Воронина, Н.Н. Рыжова, М.С. Кунда [и др.] //Биохимия. – 2020. – Том 85. - № 1. – С. 3-14.
9. Гаймоленко, И.Н. Трудности диагностики муковисцидоза у детей / И.Н. Гаймоленко, А.Г. Опарина, А.И. Петрова, Д.П. Плеско // Забайкальский медицинский вестник. – 2018. – № 4. – С. 156-161.

10. Герасимова, А.С. Впервые диагностированный муковисцидоз у беременной женщины / А.С. Герасимова, Е.А. Челбаева, Е.А. Демчук, Г.Н. Тарасеева // Туберкулез и болезни легких. – 2019. – Т. 97. – № 4. – С. 47-51.
11. Гланц, С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. / С. Гланц. – Москва: Практика, 1999. – 459 с. – ISBN 5-89816-009-4.
12. Голубцова, О.И. Особенности муковисцидоза у пациентов, жителей Чувашской Республики / О.И. Голубцова, С.А. Красовский, П.И. Павлов [и др.] // Пульмонология. – 2013. – № 3. – С.80-88.
13. Горинова, Ю.В. Генотип-фенотипические корреляции течения кистозного фиброза у российских детей. Первое описание одиннадцати новых мутаций / Ю.В. Горинова, К.В. Савостьянов, А.А. Пушков [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2018. – Том 17. – № 1. – С. 61-69.
14. Капранов, Н.И. Муковисцидоз / под редакцией Н.И. Капранова, Н.Ю. Каширской. – Москва: издательский дом «Медпрактика-М», 2014. – 672 с.
15. Капранов, Н.И. Исторические и современные аспекты муковисцидоза в России / Н.И. Капранов, Н.Ю. Каширская, И.К. Ашерова, Е.И. Кондратьева, В.Д. Шерман // Педиатрическая фармакология. – 2013. – 10 (6). – С. 53–60
16. Каширская, Н.Ю. Состояние желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы и гепатобилиарной системы у больных муковисцидозом : автореф. дисс. ... д-ра мед. наук / Каширская Наталья Юрьевна. – М., 2001. – 46 с.
17. Каширская, Н.Ю. Поражение гепатобилиарной системы при муковисцидозе / Н.Ю. Каширская, Н.И. Капранов, З.А. Кусова, И.К. Ашерова, А.Ю. Воронкова // Педиатрия. – 2012. – Том 91. – № 4. – С.106-114.
18. Каширская, Н.Ю. Поражение желудочно-кишечного тракта и гепатобилиарной системы при муковисцидозе / Н.Ю. Каширская, Н.И. Капранов // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2014. – Т. 93. – № 4. – С. 141-149.
19. Клименко, В.А. Течение муковисцидоза у детей в зависимости от мутаций генов-модификаторов воспаления интерлейкина-4 и интерлейкина-10 / В.А.

- Клименко, Н.Н. Дробова // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2018. – Т.17. – № 6. – С. 77-84.
20. Кондратьева, Е.И. Характеристика мутаций больных муковисцидозом в Российской Федерации по данным регистра 2017 года и возможности таргетной терапии / Е.И. Кондратьева, Н.В. Петрова Н.В., С.А. Красовский [и др.] // Вопросы практической педиатрии. – 2018. – Т. 13. № 6. – С. 58-66.
21. Кондратьева, Е.И. Национальный консенсус «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» / Под редакцией Е.И. Кондратьевой, Н.Ю. Каширской, Н.И. Капранова. – Москва: «ООО «Компания БОРГЕС», 2018. – 356 с.
22. Кондратьева, Е.И. Актуальные вопросы диагностики муковисцидоза / Е.И. Кондратьева, В.Д. Шерман, Н.И. Капранов, Н.Ю. Каширская // Практика педиатра. – 2015. – №2 – С.20-27.
23. Кондратьева, Е.И. Клинико-генетическая характеристика и исходы мекониевого илеуса при муковисцидозе / Е.И. Кондратьева, В.Д. Шерман, Е.Л. Амелина [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2016. – Т.61. – № 6. – С.77-81.
24. Кондратьева, Е.И. Функциональные методы диагностики нарушений гена *CFTR* и его продукта / Е.И. Кондратьева, Ю.Л. Мельяновская, В.Д. Шерман [и др.] // Вопросы практической педиатрии. – 2018. – Т. 13. – № 4. – С. 50-64.
25. Кондратьева, Е.И. Функция легких детей и подростков больных муковисцидозом в Российской Федерации / Е.И. Кондратьева, С.А. Красовский, А.Ю. Воронкова // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2016. – Т. 95. – № 4. – С. 136-142.
26. Красовский, С.А. Динамика показателей национального регистра больных муковисцидозом за 2011-2017 года / С.А. Красовский, Е.Л. Амелина, Н.Ю. Каширская // Сибирское медицинское обозрение. – 2019. - № 2 (116). – С. 14-18.

27. Красовский, С.А. Роль регистра московского региона в ведении больных муковисцидозом // С.А.Красовский, Е.А.Амелина, А.В. Черняк [и др.] // Пульмонология.– 2013. – № 2. – С.27-32.
28. Красовский, С.А. Муковисцидоз взрослых: увеличение выживаемости больных в Москве и Московской области / С.А. Красовский, Е.Л. Амелина, А.В. Черняк [и др.] // Терапевтический архив. – 2012. – №3. – С.54-58.
29. Красовский, С.А. Клинико-генетическая, микробиологическая и функциональная характеристика больных муковисцидозом, проживающих в Москве и Московской области / С.А. Красовский, В.С. Никонова, Н.Ю. Каширская [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2013. – №12. – С.17-23.
30. Красовский, С.А. Особенности муковисцидоза взрослых, по данным национального регистра 2013 года / С.А.Красовский, Е.Л.Амелина, Н.Ю.Каширская, А.В.Черняк // Consilium Medicum. – 2015. – №11. – С.53-59.
31. Кусова, З.А. Эффективность программы массового обследования новорожденных на муковисцидоз: автореф. ... дисс.канд. мед. наук / Кусова Залина Ахсаровна. – М., 2011. – 25 с.
32. Малолетникова, И.М. Причины поздней диагностики муковисцидоза / И.М. Малолетникова, А.И. Зарянкина, Ю.Ю. Абдуллина // Проблемы здоровья и экологии. – 2016. – № 4 (50). – С. 93-95.
33. Муковисцидоз (клиническая картина, диагностика, лечение, реабилитация, диспансеризация): учебное пособие для врачей / А.В. Орлов, О.И. Симонова, Е.А. Рославцева, Д.И. Шадрин. – Санкт-Петербург.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2014. – 160 с.
34. Новиков, П.В. Первые итоги расширенного неонатального скрининга на наследственные болезни обмена веществ в Российской Федерации / П.В. Новиков, А.А. Ходунова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2012. – том 57. – № 5. – С. 5-12.
35. О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания / Приказ МЗиСР РФ № 185 от 22.03.2006.

36. Петрова, Н.В. Особенности спектра мутаций, выявленных при комплексном исследовании гена *CFTR* у российских больных муковисцидозом / Н.В. Петрова, Е.И. Кондратьева, А.Ю. Марахонов [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2019. – Т.47. – №1. – С.38-46.
37. Петрова, Н.В. Особенности спектра патогенных генетических вариантов гена *CFTR* у больных муковисцидозом из Российской Федерации / Н.В. Петрова, Е.И. Кондратьева, А.В. Поляков, Т.Э. Иващенко [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2019. – № 2 (116). – С.47-59
38. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – Москва: Медиа Сфера, 2002. – 312 с. – ISBN 5-89084-013-4.
39. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2017 год. / Под редакцией А.Ю. Воронковой, Е.Л. Амелиной, Н.Ю. Каширской [и др.] – Москва: ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2019. – 68 с.
40. Репина, С.А. Патогенный вариант 3849+10KVC>T гена *CFTR* как главный предиктор сохранения фертильности у мужчин с муковисцидозом / С.А. Репина, С.А. Красовский, Т.М. Сорокина [и др.] // Генетика. – 2019. – Т. 55. – № 12. – С. 1481-1486.
41. Репина, С.А. Андрологическое обследование пациентов с легочной и смешанной формами муковисцидоза / С.А. Репина, С.А. Красовский, Р.В. Роживанов [и др.] // Андрология и генитальная хирургия. – 2018. – Т.19. – № 2. – С. 31-39.
42. Самсонова, М.С. Современные аспекты изучения качества жизни у детей с муковисцидозом / М.С. Самсонова, О.И. Симонова, И.В. Винярская // Российский педиатрический журнал. – 2016. – Том 19. – № 1. – С. 43-48.
43. Серова, И.А. Муковисцидоз в парадигме предиктивно-превентивной и персонализированной медицины (PPPM) / И.А. Серова, Н.Б. Мерзлова, В.В. Шадрин // Философские проблемы биологии и медицины, сборник статей,

Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва. – 2015. – С. 96-99.

44. Симонова О.И. Ингаляционный тобрамицин в борьбе с хронической синегнойной инфекцией / О.И. Симонова, Ю.В. Горинова, А.С. Игнатова [и др.] // Поликлиника. – 2018. - № 5. – С. 57-60.
45. Симонова, О.И. Значение потового теста в современной диагностике муковисцидоза: многолетний собственный опыт / О.И. Симонова, Ю.В. Горинова, Е.М. Васильева [и др.] // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2014. – Т. 93. – № 4. – С. 74-79.
46. Тепаев, Р.Ф. Парентеральное питание в педиатрии и детской хирургии / Р.Ф. Тепаев, А.Е. Александров, И.В. Киргизов [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2012. – Том 9. - № 1. – С. 36-44.
47. Чикунов, В.В. Совершенствование диагностики и диспансерного наблюдения больных муковисцидозом в Красноярском крае: автореф. дис. ...канд. мед.наук / Чикунов Владимир Викторович. – Красноярск, 2008. – 24 с.
48. Шадрина, В.В. Муковисцидоз у детей: распространенность, возрастные особенности клинико-лабораторных показателей и оптимизация наблюдения в специализированном центре: автореф. ...дис. канд. мед. наук / Шадрина Вера Владиславовна. – Пермь, 2007. – 23 с.
49. Шадрина, В.В. Особенности течения мутации L138INS при муковисцидозе у ребенка, проживающего в Пермском крае / В.В. Шадрина, Н.Б. Мерзлова // Актуальные проблемы современной педиатрии. V Пичугинские чтения. Материалы российской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 95-летию пермской педиатрической школы. – Пермь. – 2017. – С. 455-458.
50. Шадрина, В.В. Особенности фенотипических проявлений мутации 3272-16T>A при муковисцидозе у детей: описание трех случаев // В.В. Шадрина, С.А. Красовский, Е.Г. Фурман // Фарматека. – 2018. – № 3. – С. 75-79.

51. Шерман, В.Д. Влияние неонатального скрининга на течение муковисцидоза на примере группы пациентов московского региона / В.Д. Шерман, Е.И. Кондратьева, А.Ю. Воронкова и др. // Медицинский совет. – 2017. – № 18. – С.124-128.
52. Шумкова, Г.Л. Хронический риносинусит у взрослых больных муковисцидозом: клинические проявления и подходы к лечению / Г.Л. Шумкова, Е.Л. Амелина, В.М. Свистушкин [и др.] // Пульмонология. – 2019. – Т. 29. – № 3. – С. 311-320.
53. Ahmed, M.I. Early detection of non-tuberculous mycobacteria in children with cystic fibrosis using induced sputum at annual review / M.I. Akhmed, H. Kulkarni, S. Shajapal [et al.] // Pediatric Pulmonology. – 2019. – Vol. 54. – P. 257 – 263.
54. Alaa, A.M. Prognostication and Risk Factors for Cystic Fibrosis via Automated Machine Learning / A.M. Alaa, M. van der Schaar // Scientific Reports. – 2018. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-29523-2.pdf> (дата обращения: 15.11.2019).
55. Almannai, M. Newborn screening: a review of history, recent advancements, and future perspectives in the era of next generation sequencing / M. Almannai, R. Marom, V.R. Sutton // Current Opinion in Pediatrics. – 2016. – Vol. 28. - № 6. – P. 694 – 699.
56. Altman, K. Nutrition in cystic fibrosis: From the past to the present and into the future / K. Altman, C.M. McDonald, S.H. Michel, K. Maguiness // Pediatric Pulmonology. – 2019. – Vol. 54. – Supplement 3. – S56 – S73.
57. Andersen, D.H. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study / D.H. Andersen // American Journal of Diseases of Children. – 1938. – Vol. 56. – P. 344-399
58. Ashkenazi, M. Nutritional Status in Childhood as a Prognostic Factor in Patients with Cystic Fibrosis / M. Ashkenazi, N. Nathan, I. Sarouk [et al.] // Lung. – 2019. – Vol. 197. – № 3. – P. 371 - 376.

59. Audrezet, M.P. Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene / M.P. Audrezet, A. Dabricot, C. Le Marechal, C. Ferec // *The Journal of Molecular Diagnostics*. – 2008. – Vol. 10. – P. 424 – 434.
60. Baishya, J. Selective pressures during chronic infection drive microbial competition and cooperation / J. Baishya, C.A. Wakeman. – DOI: 10.1038/s41522-019-0089-2 // *NPJ Biofilms and Microbiomes*. – 2019. – URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6555799/pdf/41522\\_2019\\_Article\\_89.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6555799/pdf/41522_2019_Article_89.pdf) (дата обращения: 15.12.2019)
61. Bardin, P. Emerging microRNA Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis / P. Bardin, F. Sonnevile, H. Corvol, O. Tabary – DOI: 10.3389/fphar.2018.01113 // *Frontiers in Pharmacology*. – 2018. – Vol. 9. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.01113/pdf> (дата обращения: 15.11.2019).
62. Bareil, C. Comprehensive and rapid genotyping of mutations and haplotypes in congenital bilateral absence of the vas deferens and other CFTR-related disorders / C. Bareil, C. Guittard, J.P. Altieri // *The Journal of Molecular Diagnostics*. – 2007. – Vol. 9. – № 5. – P. 582 – 588.
63. Bear, C.E. A Therapy for Most with Cystic Fibrosis / C.E. Bear // *Cell*. – 2020. – Vol. 180. – № 2. – P.211.
64. Beauchamp, M. Sweat-testing: a review of current technical requirements / M. Beauchamp, L.C. Lands // *Pediatric Pulmonology*. – 2005. – Vol. 39. – № 6. – P. 507 – 511.
65. Bell, S.C. The future of cystic fibrosis care: a global perspective / S.C. Bell, M.A. Mall, H. Gutierrez [et al.] // *The Lancet. Respiratory Medicine*. – 2020. – Vol. 8. – № 1. – P. 65 – 124.
66. Bergougnoux, A. Multicenter validation study for the certification of a CFTR gene scanning method using next generation sequencing technology / A. Bergougnoux, V.

- D'Argenio, S. Sollfrank [et al.] / *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. – 2018. – Vol. 56. – № 7. – P. 1046 – 1053.
67. Bezzerri, V. Shwachman-Diamond Syndrome: Molecular Mechanisms and Current Perspectives / V. Bezzerri, M. Cipolli // *Molecular Diagnosis and Therapy*. – 2019. – Vol. 23. – № 2. – P. 281 – 290.
68. Birket, S.E. Revealing the molecular signaling pathways of mucus stasis in cystic fibrosis / S.E. Birket, S.M. Rowe // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2019. – Vol. 129. – № 10. – P. 4089 – 4090.
69. Bombieri, C. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders / C. Bombieri, M. Claustres, K. De Boeck [et al.] // *Journal of Cystic Fibrosis*. – 2011. – Vol. 10. – Supplement 2. – S86 – S102.
70. Brennan, M.L. Cystic fibrosis: a review of associated phenotypes, use of molecular diagnostic approaches, genetic characteristics, progress, and dilemmas / M.L. Brennan, I. Schrijver // *The Journal of Molecular Diagnostics*. – 2016. – Vol. 18. – № 1. – P. 3-14.
71. Brockow, I. Parents' experience with positive newborn screening results for cystic fibrosis / I. Brockow, U. Nennstiel // *European Journal of Pediatrics*. – 2019. – Vol. 178. – № 6. – P. 803 – 809.
72. Brodlie, M. Targeted therapies to improve CFTR function in cystic fibrosis / M. Brodlie, I.J. Haq, K. Roberts [et al.]. – DOI: 10.1186/s13073-015-0223-6 // *Genome Medicine*. – 2015. – Vol. 7. – URL: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13073-015-0223-6> (дата обращения: 15.12.2019).
73. Bush, A. Evolution of cystic fibrosis lung function in the early years / A. Bush, P.D. Sly // *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. – 2015. – Vol. 21 – P. 602 – 608.
74. Cabrini, G. Innovative Therapies for Cystic Fibrosis: The Road from Treatment to Cure / G. Cabrini // *Molecular Diagnosis and Therapy*. – 2019. – Vol. 23. – № 2. – P. 263 – 279.

75. Callebaut, I. CFTR structure / I. Callebaut, P.A. Chong, J.D. Forman-Kay // // Journal of Cystic Fibrosis. – 2018. – Vol. 17. – № 2S. – S.5 – S8.
76. Castellani, C. Cystic fibrosis: a clinical view / C. Castellani, B.M. Assael // Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS). – 2017. – Vol. 74. – № 1. – P. 129 – 140.
77. Castellani, C. Newborn screening for cystic fibrosis / C. Castellani, J. Massie, M. Sontag, K.W. Southern // The Lancet. Respiratory Medicine. – 2016. – Vol. 4. – № 8. – P. 653 – 661.
78. Castellani, C. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision / C. Castellani, A.J.A. Duff, S.C. Bell [et al.] // Journal of Cystic Fibrosis. – 2018. – Vol. 17. – P. 153 – 178.
79. Castellani, C. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening / C. Castellani, K.W. Southern, K. Brownlee // Journal of Cystic Fibrosis. – 2009. – Vol. 8. – P. 153 – 173.
80. Castellani, C. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice / C. Castellani, H. Cuppens, M. Macek Jr. [et al.] // Journal of Cystic Fibrosis. – 2008. – Vol. 8. – P. 179 – 196.
81. Christopher Boyd, A. New approaches to genetic therapies for cystic fibrosis / Boyd A. Christopher, S. Guo, L. Huang [et al.]. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.12.012 // Journal of Cystic Fibrosis. – 2020. – URL: [https://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569-1993\(19\)30992-0/pdf](https://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569-1993(19)30992-0/pdf) (дата обращения 25.01.2020).
82. Collaco, J.M. Sources of Variation in Sweat Chloride Measurements in Cystic Fibrosis / J.M. Collaco, S.M. Blackman, K.S. Raraigh [et al.] // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2016. – Vol. 194. – № 11. – P. 1375 – 1382.
83. Conway, S. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Framework for the Cystic Fibrosis Centre / S. Conway, I.M. Balfour-Lynn, K. De Rijcke [et al.] // Journal of Cystic Fibrosis. – 2014. – Vol. 13. – Supplement 1. – S3 – S22.

84. Corriveau, S. Cystic fibrosis survival: the changing epidemiology / S. Corriveau, J. Sykes, A.L. Stephenson // *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. – 2018. – Vol. 24. – № 6. – P. 574 – 578.
85. Crossley, J.R. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn / J.R. Crossley, R.B. Elliott, P.A. Smith // *The Lancet*. – 1979. – Vol. 313. – P. 472 – 474.
86. Currier, R.J. Genomic sequencing in cystic fibrosis newborn screening: what works best, two-tier predefined CFTR mutation panels or second-tier CFTR panel followed by third-tier sequencing? / R.J. Currier, S. Sciortino, R. Liu [et al.] // *Genetics in Medicine*. – Vol. 19. – № 10. – P. 1159 – 1163.
87. Cutting, G.R. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application / G.R. Cutting // *Nature Reviews. Genetics*. – 2015. – Vol. 16. – № 1. – P. 45 – 56.
88. Cystic Fibrosis Canada. The Canadian Cystic Fibrosis Registry 2018 Annual Data Report / Торонто, Канада. – 2018. – URL: <https://www.cysticfibrosis.ca/uploads/RegistryReport2018/2018RegistryAnnualDataReport.pdf> (дата обращения: 20.10.2019).
89. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: 2017 annual data report / Бетесда, США. – 2018. – URL: <https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/PatientRegistry/2017-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf> (дата обращения: 20.10.2019).
90. Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1): сайт. – Торонто (Канада), 2010 – . – URL: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html> (дата обращения: 15.01.2020).
91. Dasenbrook, E.C. Cystic fibrosis patient registries: a valuable source for clinical research / E.C. Dasenbrook, G.S. Sawicki // *Journal of Cystic Fibrosis*. – 2018. – Vol. 17. – № 4. – P. 433 – 440.
92. Davies, G. Pulmonary function deficits in newborn screened infants with cystic fibrosis managed with standard UK care are mild and transient / G. Davies, J. Stocks, L.P. Thia. – DOI: 10.1183/13993003.00326-2017 // *The European Respiratory*

Journal. – 2017. – URL: <https://erj.ersjournals.com/content/erj/50/5/1700326.full.pdf>  
(дата обращения: 18.11.2019).

93. Davies, J.C. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ivacaftor in patients aged 2–5 years with cystic fibrosis and a CFTR gating mutation (KIWI): an open-label, single-arm study / J.C. Davies, S. Cunningham, W.T. Harris [et al.] // *The Lancet. Respiratory Medicine*. – 2016. – Vol. 4. – № 2. – P. 107 – 115.
94. De Boeck, K. Year to year change in FEV1 in patients with cystic fibrosis and different mutation classes / K. De Boeck, A. Zolin. // *Journal of Cystic Fibrosis*. – 2017. – Vol. 16. – № 2. – P. 239 – 245.
95. De Boeck, K. The diagnosis of cystic fibrosis / K. De Boeck, F. Vermeulen, L. Dupont // *La Presse Médicale*. – 2017. – Vol. 46. – E97 – E108.
96. De Boeck, K. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms / K. De Boeck, M. Wilschanski, C. Castellani [et al.] // *Thorax*. 2006 – Vol. 61. – № 7. – P. 627 – 635.
97. De Boeck, K. The relative frequency of *CFTR* mutation classes in European patients with cystic fibrosis // K. de Boeck, A. Zolin, H. Cuppens [et al.] // *Journal of Cystic Fibrosis*. – 2014. – Vol. 13. – № 4. – P. 403-409.
98. De Souza, D.A.S. Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling / D.A.S. De Souza, F.R. Faucz, L. Pereira-Ferrari [et al.] // *Andrology*. – 2018. – Vol. 6. – № 1. – P. 127 – 135.
99. De Wachter, E. What can the CF registry tell us about rare CFTR-mutations? A Belgian study / E. De Wachter, M. Thomas, S.S. Wanyama [et al.] – DOI: 10.1186/s13023-017-0694-1 // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2017. – Vol. 12. – № 1. – URL: <https://ojrd.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13023-017-0694-1>  
(дата обращения: 25.10.2019).
100. Dequeker, E. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – updated European recommendations / E.

- Dequeker, M. Sturhmann, M.A. Morris [et al.] // *European Journal of Human Genetics*. – 2009. – Vol. 17. – P. 51 – 65.
101. Dodge, J.A. Pancreatic enzymes and Fibrosing Colonopathy / J.A. Dodge // *Journal of Cystic Fibrosis*. – 2015. – Vol. 14. – № 1. – P. 153. doi: 10.1016/j.jcf.2014.09.002.
102. Duncan, G.A. Microstructural alterations of sputum in cystic fibrosis lung disease / G.A. Duncan, J. Jung, A. Joseph [et al.]. – DOI: 10.1172/jci.insight.88198 // *JCI Insight*. – 2016. – URL: <https://insight.jci.org/articles/view/88198/pdf> (дата обращения: 19.11.2019).
103. Dwight, Z. uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application / Z. Dwight, R. Palais, C.T. Wittwer // *Bioinformatics*. – 2011. – Vol. 27. – № 7. – P. 1019 – 1020.
104. Elborn, J.S. Cystic fibrosis / J.S. Elborn // *The Lancet*. – 2016. – Vol. 388. – P. 2519–2531.
105. El-Koofy, N. Nutritional rehabilitation for children with cystic fibrosis: Single center study / N. El-Koofy, M. El-Mahdy, M. Fathy [et al.] // *Clinical Nutrition ESPEN*. – 2020. – Vol. 35. – P. 201 – 206.
106. Elliott, A.M. Rapid detection of the ACMG/ACOG-recommended 23 CFTR disease-causing mutations using ion torrent semiconductor sequencing / A.M. Elliott, J. Radecki, B. Moghis [et al.] // *Journal of Biomolecular Techniques*. – 2012. – Vol. 23. – № 1. – P. 24 – 30.
107. Estabrooks, S. Regulation of CFTR Biogenesis by the Proteostatic Network and Pharmacological Modulators / S. Estabrooks, J.L. Brodsky. – DOI: 10.3390/ijms21020452 // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/2/452/pdf> (дата обращения: 25.01.2020).
108. Esther, C.R. Jr. Mucus accumulation in the lungs precedes structural changes and infection in children with cystic fibrosis / C.R. Esther Jr, M.S. Muhlebach, C. Ehre [et al.]. – DOI: 10.1126/scitranslmed.aav3488 // *Science Translational Medicine*. – 2019.

- URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6566903/pdf/nihms-1028510.pdf> (дата обращения: 15.11.2019).
109. European Cystic Fibrosis Society (ECFS) Patient Registry Annual Data Report 2017. – 2019. – URL: [https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-images/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFS-PR\\_Report2017\\_v1.3.pdf](https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-images/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFS-PR_Report2017_v1.3.pdf) (дата обращения: 20.10.2019).
110. Farber S. The relation of pancreatic achylato meconium ileus / S. Farber // J. Pediat. – 1946. – № 24 – P. 387 – 392.
111. Farrell, C.L. Indirect Reference Intervals: Harnessing the Power of Stored Laboratory Data / C.L. Farrell, L. Nguyen // The Clinical Biochemist. Reviews. – 2019. – Vol. 40. - № 2. – P. 99 – 111.
112. Farrell, P.M. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation / P.M. Farrell, T.B. White, C.L. Ren [et al.] / The Journal of Pediatrics. – 2017. – Vol. 181S. – S4 – S15.
113. Farrell, P.M. Diagnosis of cystic fibrosis in screened populations / P.M. Farrell, T.B. White, M.S. Howenstine [et al.] // The Journal of Pediatrics. – 2017. – Vol. 181S. – S. 33 – 44.
114. Farrelly, P.J. Gastrointestinal surgery in cystic fibrosis: a 20-year review / P.J. Farrelly, C. Charlesworth, S. Lee, K.W. Southern // Journal of Pediatric Surgery. – 2014. – Vol. 49. – № 2. – P. 280 – 283.
115. Figuerdo, L.J.E. A simple, fast and inexpensive method for mutation scanning of CFTR gene / L.J.E. Figuerdo, A.A. Cayarga, G.Y.J. Gonzalez [et al.]. – DOI: 10.1186/s12881-017-0420-9 // BMC Medical Genetics. –2017. – URL: <https://bmcmedgenet.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12881-017-0420-9> (дата обращения: 12.12.2019).
116. Fink, A.K. Data that empower: The success and promise of CF patient registries / A.K. Fink, D.R. Loeffler, B.C. Marshall [et al.] // Pediatric Pulmonology. – 2017. – Vol. 52 (S48). – S44-S51.

117. Ford, B. CFTR structure: lassoing cystic fibrosis / B. Ford // Nature Structural and Molecular Biology. – 2017. – Vol. 24. – № 1. – P. 13 – 14.
118. Foskett, J.K. CFTR nonsense mutations: Therapeutic benefits from clinically approved drugs? / J.K. Foskett // Journal of Cystic Fibrosis. – 2017. – Vol. 16. – № 1. – P. 9 – 10.
119. Gallati, S. Disease-modifying genes and monogenic disorders: experience in cystic fibrosis / S. Gallati // The Application of Clinical Genetics. – 2014. – Vol. 7. – P. 133 – 146.
120. Gentsch, M. Ion channel modulators in cystic fibrosis / M. Gentsch, M.A. Mall // Chest. – 2018. Vol. 154. – P. 383–393.
121. Gibson, L.E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis / L.E. Gibson, R.E. Cooke // Pediatrics. – 1959. – Vol. 23. – № 3. – P. 545 – 549.
122. Goss, C.H. Comparison of nutrition and lung function outcomes in patients with cystic fbrosis living in Canada and the United States / C.H. Goss, J. J. Sykes, S. Stanojevic, B. Marshall [et al.]. // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2018. – Vol. 197. – № 6. – P. 768 – 775.
123. Greally, P. Challenges with current inhaled treatments for chronic Pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis / P. Greally, P. Whitaker, D. Peckham // Current Medical Research and Opinion. – 2012. – Vol. 28. – P. 1059-1067.
124. Green, J. Interventions for treating distal intestinal obstruction syndrome (DIOS) in cystic fibrosis / J. Green, W. Carroll, F.J. Gilchrist. – DOI: 10.1002/14651858.CD012798.pub2 // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2018. – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD012798.pub2/full#0> (дата обращения: 18.11.2019).
125. Hamed, K. Tobramycin inhalation powder for the treatment of pulmonary Pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis: a review based on

- clinical evidence / K. Hamed, L. Debonnett // Therapeutic Advances in Respiratory Diseases. – 2017. – Vol. 11. – № 5. – P. 193 – 209.
126. Hammond, K.B. Clinical evaluation of the macroduct sweat collection system and conductivity analyzer in the diagnosis of cystic fibrosis / K.B. Hammond, N.L. Turcios, L.E. Gibson // The Journal of Pediatrics. – 1994. – Vol. 124. – № 2. – P. 255 – 260.
127. Personalized medicine in CF: from modulator development to therapy for cystic fibrosis patients with rare CFTR mutations / M. Harutyunyan, Y. Huang, K.S. Mun [et al.] // American journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology. – 2018. – Vol. 314. – № 4. – L.529 – 543.
128. Hayeems, R.Z. False-Positive Newborn Screening for Cystic Fibrosis and Health Care Use / R.Z. Hayeems, F.A. Miller, M. Vermeulen [et al.]. – DOI: 10.1542/peds.2017-0604 // Pediatrics. – 2017. – URL: <https://pediatrics.aappublications.org/content/pediatrics/140/5/e20170604.full-text.pdf> (дата обращения: 15.12.2019).
129. Henneman, L. Responsible implementation of expanded carrier screening / L. Hennemann, P. Borry, D. Chokoshvili [et al.] // European Journal of Human Genetics. – 2016. – Vol. 24. – e1 – e12.
130. Hill, D.B. Pathological mucus and impaired mucus clearance in cystic fibrosis patients result from increased concentration, not altered pH / D.B. Hill, R.F. Long, W.J. Kissner [et al.]. – DOI: 10.1183/13993003.01297-2018 // The European Respiratory Journal. – 2018. – URL: <https://erj.ersjournals.com/content/erj/52/6/1801297.full-text.pdf> (дата обращения: 15.11.2019).
131. Horowitz, G.L. Reference Intervals: Practical Aspects / G.L. Horowitz // The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EJFICC). – 2008. – Vol. 19. – № 2. – P. 95-105.
132. Ivanov, M. Targeted sequencing reveals complex, phenotype-correlated genotypes in cystic fibrosis / M. Ivanov, A. Matsvay, O. Glazova, S. Krasovskiy [et al.]. – DOI:

10.1186/s12920-018-0328-z // BMC Medical Genomics. – 2018. – URL: <https://bmcmedgenomics.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12920-018-0328-z> (дата обращения: 10.01.2020).

133. Jackson, A.D. Epidemiology of CF: How registries can be used to advance our understanding of the CF population / A.D. Jackson, C.H. Goss // *Journal of Cystic Fibrosis*. – 2018. – Vol. 17. – № 3. – P. 297 – 305.
134. Joshi, D. Cystic fibrosis precision therapeutics: Emerging considerations / D. Joshi, A. Ehrhardt, J.S. Hong, E.J. Sorscher // *Pediatric Pulmonology*. – 2019. – Vol. 54. – Suppl. 3. – S13-S17.
135. Kaditis, A.G. Effect of allergic bronchopulmonary aspergillosis on FEV1 in children and adolescents with cystic fibrosis: a European Cystic Fibrosis Society Patient Registry analysis / A.G. Kaditis, M. Miligkos, A. Bossi [et al.] // *Archives of Disease in Childhood*. – 2017. – Vol. 102. – № 8. – P. 742 – 747.
136. Kakavas, V.K. PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases / V.K. Kakavas, P. Plageras, T.A. Vlachos [et al.] // *Molecular Biotechnology*. – 2008. – Vol. 38. – № 2. – P. 155 – 163.
137. Keogh, R.H. A guide to interpreting estimated median age of survival in cystic fibrosis patient registry / R.H. Keogh, S. Stanojevic // *Journal of Cystic Fibrosis*. – 2018. – Vol. 17. – P. 213 – 217.
138. Kerem, B.S. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis / B.S. Kerem, J.M. Rommens, J.A. Buchanan [et al.] // *Science*. – 1989. – Vol. 245. – P. 1073-1080.
139. King, J.R. Ethnicity-based carrier screening / J.R. King, S. Klugman // *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. – 2018. – Vol. 45. – P. 83 -101.
140. Kloosterboer, M. Clarification of laboratory and clinical variables that influence cystic fibrosis newborn screening with initial analysis of immunoreactive trypsinogen / M. Kloosterboer, G. Hoffman, M. Rock [et al.] // *Pediatrics*. – 2009. – Vol. 123. – P. 338 – 346.
141. Kozakova, J. Dry powder inhaler of colistimethate sodium for lung infections in cystic fibrosis: optimization of powder construction / J. Kozakova, A. Altay, V.

- Zdimal [et al.] // Drug Development and Industrial Pharmacy. – 2019. – Vol. 45. – № 10. – P. 1664 – 1673.
142. Krenkova, P. Evaluation of high-resolution melting (HRM) for mutation scanning of selected exons of the *CFTR* gene / P. Krenkova, P. Norambuena, A. Stamberгова, M. Macek Jr // Folia Biologica (Praha). – 2009. – Vol. 55. – № 6. – P. 238 – 242.
143. Langaee, T. Cross-Validation of High-Resolution Melting Analysis-Based Genotyping Platform / T. Langaee, L. Stauffer, C. Galloway // Genetic Testing and Molecular Biomarkers. – 2017. – Vol. 21. – № 4. – P. 259 – 264.
144. Langton, H.S.C. Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis / H.S.C. Langton, A.R. Smyth. – DOI: 10.1002/14651858.CD004197.pub5 // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2017. – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD004197.pub5/epdf/full/en> (дата обращения: 15.12.2019).
145. Le Gallo, M. Next-Generation Sequencing / M. Le Gallo, F. Lozy, D.W. Bell // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2017. – № 943. – P. 119 – 148.
146. Lefterova, M.I. Next-Generation Molecular Testing of Newborn Dried Blood Spots for Cystic Fibrosis / M.I. Lefterova, P. Shen, J.I. Odegaard [et al.] // The Journal of Molecular Diagnostics. – 2016. – Vol. 18. – № 2. – P. 267 – 282.
147. Leung, D.H. Effects of diagnosis by newborn screening for cystic fibrosis on weight and length in the first year of life / D.H. Leung, S.L. Heltshe, D. Borowitz [et al.] // JAMA Pediatrics. – 2017. – Vol. 171. – № 6. – P. 546 – 554.
148. Levy, H. New challenges in the diagnosis and management of cystic fibrosis / H. Levy, P.M. Farrell // The Journal of Pediatrics. – 2015. – Vol. 166. – P. 1337 – 1341.
149. Li, M. Quantifying variant differences in DNA melting curves: Effects of length, melting rate, and curve overlay / M. Li, R.A. Palais, L. Zhou, C.T. Wittwer // Analytical Biochemistry. – 2017. – Vol. 539. – P. 90 – 95.

150. London, N.R. Jr. Differential Diagnosis of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps / N.R. London Jr, D.D. Reh // *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*. – 2016. – Vol. 79. – № 1 – 12.
151. Loukas, Y.L. Clinical diagnostic next-generation sequencing: the case of CFTR carrier screening / Y.L. Loukas, G. Thodi, E. Molou [et al.] // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. – 2015. – Vol. 75. – P.374-381.
152. LOVD v.3 Build 21 «Консенсус по клиническим эффектам генетических вариантов *CFTR*»: сайт. – Нидерланды. – 2004 – . – URL: <https://cftr.lovd.parseq.pro/genes> (дата обращения: 20.01.2020).
153. Marquez Loza, L.I. Lentiviral Vectors for the Treatment and Prevention of Cystic Fibrosis Lung Disease / L.I. Marquez Loza, E.C. Yuen, P.B. Jr. McCray – DOI: 10.3390/genes10030218 // *Genes*. – 2019. – Vol. 10. – № 3. – P. 218. – URL: <https://www.mdpi.com/2073-4425/10/3/218/pdf> (дата обращения: 15.11.2019).
154. Marson, F.A.L. Classification of CFTR mutation classes / F.A.L. Marson, C.S. Bertuzzo, J.D. Ribeiro // *The Lancet. Respiratory Medicine*. – 2016. – Vol. 4. – P. e37–38.
155. Marsteller, N.L. Cystic fibrosis patients at risk for disease progression marked by decline in FEV1% predicted: development of the cystic fibrosis risk of disease progression score / N.L. Marsteller, E. Nussbaum, T. Morphey, I.S. Randhawa // *Journal of Thoracic Disease*. – 2019. – Vol. 11. – № 12. – P. 5557 – 5565.
156. Martelli, V. Validation of short- and long-term demographic forecasts using the Canadian Cystic Fibrosis Registry / V. Martelli, J. Sykes, P.R. Burgel [et al.]. – DOI: 10.1183/13993003.01667-2019 // *The European Respiratory Journal*. – 2020. – URL: <https://erj.ersjournals.com/content/erj/55/1/1901667.full.pdf> (дата обращения: 26.01.2020).
157. Martiniano, S.L. Cystic fibrosis: a model system for precision medicine / S.L. Martiniano, S.D. Sagel, E.T. Zemanick // *Current Opinion in Pediatrics*. – 2016. – Vol. 28. – P. 312–317.

158. Martins, R.D.S. Identification of a novel large deletion and other copy number variations in the CFTR gene in patients with Cystic Fibrosis from a multiethnic population / R.D.S. Martin, J.M. Campos, D.S.A. Moreira [et al.]. – DOI: 10.1002/mgg3.645 // Molecular Genetics and Genomic Medicine. – 2019. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/mgg3.645> (дата обращения: 25.12.2019).
159. Mattar, A.C. Comparison between classic Gibson and Cooke technique and sweat conductivity test in patients with and without cystic fibrosis / A.C. Mattar, E.N. Gomes, F.V. Adde [et al.] // Jornal de Pediatria. – 2010. – Vol. 86. – № 2. – P. 109 – 114.
160. Mavilia, M. Distal intestinal obstructive syndrome (DIOS): a gastrointestinal complication of cystic fibrosis in adults / M. Mavilia // Clinical Journal of Gastroenterology. – 2019. – Vol. 12. – № 6. – P. 571 – 573.
161. Mayer-Hamblett, N. Azithromycin for Early Pseudomonas Infection in Cystic Fibrosis. The OPTIMIZE Randomized Trial / N. Mayer-Hamblett, G. Retsch-Bogart, M. Kloster [et al.] // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2018. – Vol. 198. – № 9. – P. 1177 – 1187.
162. McCormack, P. Autogenic drainage for airway clearance in cystic fibrosis / P. McCormack, P. Burnham, K.W. Southern. – DOI: 10.1002/14651858.CD009595.pub2 // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2017. – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD009595.pub2/full> (дата обращения: 03.09.2019).
163. McIlwaine, M. Positive expiratory pressure physiotherapy for airway clearance in people with cystic fibrosis / M., McIlwaine, B. Button, S.J. Nevitt. – DOI: 10.1002/14651858.CD003147.pub5 // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2019. – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD003147.pub5/full> (дата обращения: 04.09.2019).

164. McKone, E.F. Cystic fibrosis survival and socioeconomic status across Europe / E.F. McKone, C. Ariti, A. Jackson [et al.] // Journal of Cystic Fibrosis. Abstracts of the 40th European Cystic Fibrosis Conference. – 2017. – Vol. 16. – S20.
165. Merrick, S. An evaluation of the "cut and push" method of percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG) removal / S. Merrick, S. Harnden, S. Shetty [et al.]. // Journal of parenteral and enteral nutrition. – 2008. – Vol. 32. – № 1. – P. 78 – 80.
166. Meshram, G.G. Complete Rectal Prolapse in Children: Case Report, Review of Literature, and Latest Trends in Management / G.G. Meshram, N. Kaur, K.S. Hura // Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. – 2018. – Vol. 6. – № 9. – P. 1694 – 1696.
167. Middleton, P.G. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele / P.G. Middleton, M.A. Mall, P. Drevinek [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2019. – Vol. 381. – № 19. – P. 1809 – 1819.
168. Milosevic, K. Analysis of *CFTR* Gene Variants in Idiopathic Bronchiectasis in Serbian Children / K. Milosevic, A. Nikolic, D.A. Rankov [et al.] // Pediatric Allergy, Immunology, Pulmonology. – 2013. – Vol. 26. – № 2. – P. 93 – 98.
169. Mirtajani, S.B. Geographical distribution of cystic fibrosis; the past 70 years of data analysis / S.B. Mirtajani, P. Farnia, M. Hassanzad [et al.] // Biomedical and Biotechnology Research Journal. – 2017. – Vol. 1. – P. 105 – 112.
170. Morrell, M.R. Lung Transplantation for Cystic Fibrosis / M.R. Morrell, J.M. Pilewski // Clinics in chest medicine. – 2016. – Vol. 37. – № 1. – P. 127 – 138.
171. Mulder, D.S. Registry-Based Medical Research: Data Dredging or Value Building to Quality of Care? / D.S. Mulder, J. Spicer // The Annals of Thoracic Surgery. – 2019. – Vol. 108. – № 1. – P. 274 – 282.
172. Munck, A. Cystic fibrosis screen positive, inconclusive diagnosis (CFSPID): a new designation and management recommendations for infants with an inconclusive diagnosis following newborn screening / A. Munck, S.J. Mayell, V. Winters [et al.] // Journal of Cystic Fibrosis. – 2015. – Vol. 14. – P. 706 – 713.

173. O'Toole, G.A. Cystic Fibrosis Airway Microbiome: Overturning the Old, Opening the Way for the New / G.A. O'Toole. – DOI: 10.1128/JB.00561-17 // Journal of Bacteriology. – 2018. – Vol. 200. – № 4. – URL: <https://jb.asm.org/content/jb/200/4/e00561-17.full-text.pdf> (дата обращения: 18.09.2019).
174. Oates, G.R. Socioeconomic status and health outcomes: cystic fbrosis as a model / G.R. Oates, M.S. Schechter // Expert Review of Respiratory Medicine. – 2016. – Vol. 10. – №9. – P. 967 – 977.
175. Oliver, K.E. Transformative therapies for rare CFTR missense alleles / K.E. Oliver, S.T. Han, E.J. Sorscher, G.R. Cutting // Current Opinion in Pharmacology. – 2017. – Vol. 34. – P. 76 – 82.
176. Pagin, A. Applicability and Efficiency of NGS in Routine Diagnosis: In-Depth Performance Analysis of a Complete Workflow for CFTR Mutation Analysis / A. Pagin, A. Devos, M. Figeac [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0149426 // Public Library of Science (PLoS) One. – 2016. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0149426&type=printable> (дата обращения: 12.12.2019).
177. Palser, S. Treatments for preventing recurrence of infection with Pseudomonas aeruginosa in people with cystic fibrosis / S. Palser, S. Smith, E.F. Nash [et al.]. – DOI: 10.1002/14651858.CD012300.pub2 // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2019. – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD012300.pub2/full#0> (дата обращения: 10.01.2020).
178. Pankow, S. ΔF508 CFTR interactome remodelling promotes rescue of cystic fibrosis / S. Pankow, C. Bamberger, D. Calzolari // Nature. – 2015. – Vol. 528. – № 7583. – P. 510 – 516.
179. Parkins, M.D. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal Pseudomonas aeruginosa Infections in Cystic Fibrosis / M.D. Parkins, R. Somayaji, V.J. Waters. – DOI: 10.1128/CMR.00019-18 // Clinical Microbioly Reviews. – 2018. – URL:

- <https://cmr.asm.org/content/cmr/31/4/e00019-18.full-text.pdf> (дата обращения: 03.09.2019).
180. Patel, S. Potentiators (specific therapies for class III and IV mutations) for cystic fibrosis / S. Patel, I.P. Sinha, K. Dwan [et al.]. – DOI: 10.1002/14651858.CD009841.pub3 // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2015. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6353056/pdf/CD009841.pdf> (дата обращения: 15.11.2019).
181. Paterson, S.L. Tezacaftor and ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis / S.L., Paterson, P.J. Barry, A.R. Horsley // Expert Review of Respiratory Medicine. – 2020. – Vol. 14. – № 1. – P. 15 – 30.
182. Patterson, K.D. Factors affecting the growth of infants diagnosed with cystic fibrosis by newborn screening / K.D. Patterson, T. Kyriacou, M. Desai [et al.] // BMC Pediatrics. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 1 – 7.
183. Pederzini, F. Development of a screening system for cystic fibrosis: meconium or blood spot trypsin assay or both? / F. Pederzini, D. Faraguna, L. Giglio [et al.] // Acta Paediatrica Scandinavica. – 1990. – Vol. 79. – P. 935 – 942.
184. Petrova, N.V. Comprehensive genotyping reveals novel *CFTR* variants in cystic fibrosis patients from the Russian Federation / N.V. Petrova, A.V. Marakhonov, T.A. Vasilyeva [et al.]. // Clinical Genetics. – 2019. – Vol. 95. – № 3. – P. 444 – 447.
185. Petrova, N.V. Spectrum of *CFTR* mutations in Chechen cystic fibrosis patients: high frequency of c.1545\_1546delTA (p.Tyr515X; 1677delTA) and c.274G>A (p.Glu92Lys, E92K) mutations in North Caucasus / N.V. Petrova, N.Y. Kashirskaya, D.K. Sayadaeva, A.V. Polyakov [et al.]. – DOI: 10.1186/s12881-019-0785-z // BMC Medical Genetics. – 2019. – URL: <https://bmcmedgenet.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12881-019-0785-z> (дата обращения: 10.01.2020).

186. Petrova, N.V. High prevalence of W1282X mutation in cystic fibrosis patients from Karachay-Cherkessia / N.V. Petrova, N.Y. Kashirskaya, T.A. Vasilyeva [et al.] // Journal of Cystic Fibrosis. – 2016. – Vol. 15. – № 3 – E28 – 32.
187. Prentics, B. Diagnosing cystic fibrosis-related diabetes: current methods and challenges / B. Prentice, S. Hameed, C.F. Verge [et al.] // Expert Review of Respiratory Medicine – 2016. – Vol. 10. – № 7. – P. 799 – 811.
188. Quinton, P.M. Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland / P.M. Quinton // Physiology (Bethesda). – 2007. – Vol. 22. – P. 212 – 225.
189. Ratjen, F. Efficacy and safety of lumacaftor and ivacaftor in patients aged 6–11 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial / F. Ratjen, C. Hug, G. Marigowda [et al.] // The Lancet. Respiratory Medicine. – 2017. – Vol. 5. – P. 557 – 567.
190. Raynal, C. A classification model relative to splicing for variants of unknown clinical significance: application to the CFTR gene / C. Raynal, D. Baux, C. Theze [et al.] // Human Mutation. – 2013. – Vol. 34. – № 5. – P. 774 – 784.
191. Sanders, D.B. Failure to recover to baseline pulmonary function after cystic fibrosis pulmonary exacerbation / D.B. Sanders, R.C. Bittner, M. Rosenfeld [et al.] // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2010. – Vol. 182. – P. 627 – 632.
192. Schluter, D.K. Impact of newborn screening on outcomes and social inequalities in cystic fibrosis: a UK CF registry-based study / D.K. Schluter, K.W. Southern, C. Dryden [et al.] // Thorax. – 2020. – Vol. 75. – № 2. – P. 123 – 131.
193. Schrijver, I. The Spectrum of *CFTR* Variants in Nonwhite Cystic Fibrosis Patients: Implications for Molecular Diagnostic Testing / I. Schrijver, L. Pique, S. Graham [et al.] // The Journal of Molecular Diagnostics. – 2016. – Vol. 18. – № 1. – P. 39 – 50.
194. Schuler, D. Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements / D. Schuler D, I. Sermet-Gaudelus, M. Wilschanski [et al.] // Journal of Cystic Fibrosis. – 2004. – Vol. 3. – Suppl. 2. – P. 151 – 155.

195. Scriver, C.R. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease / C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly [et al.]. – 8<sup>th</sup> ed. – New York: McGraw Hill, 2001. – 7012 P. ISBN 007136322X, 9780071363228.
196. Self, W.H. Staphylococcus aureus community-acquired pneumonia: prevalence, clinical characteristics, and outcomes / W.H. Self, R.G. Wunderink, D.J. Williams [et al.] // Clinical Infectious Diseases. – 2016. – Vol. 63. – № 3. – P. 300 – 309.
197. Servidoni, M.F. Rectal forceps biopsy procedure in cystic fibrosis: technical aspects and patients perspective for clinical trials feasibility / M.F. Servidoni, M. Sousa, A.M. Vinagre [et al.]. – DOI: 10.1186/1471-230X-13-91 // BMC Gastroenterology. – 2013. – URL: <https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-230X-13-91> (дата обращения: 15.12.2019).
198. Shanthikumar, S. Gene modifiers of cystic fibrosis lung disease: A systematic review / S. Shanthikumar, M.N. Neeland, R. Saffery, S. Ranganathan // Pediatric Pulmonology. – 2019. – Vo. 54. – № 9. – P. 1356 – 1366.
199. Shei, R.J. The epithelial sodium channel (ENaC) as a therapeutic target for cystic fibrosis / R.J. Shei, J.E. Peabody, N. Kaza [et al.] // Current Opinion in Pharmacology. – 2018. – Vol. 43. – P. 152 – 165.
200. Sherrard, L.J. Assessment of stability and fluctuations of cultured lower airway bacterial communities in people with cystic fibrosis / L.J. Sherrard, G.G. Einarsson, E. Johnston [et al.] // Journal of Cystic Fibrosis. – 2019. – Vol. 18. – № 6. – P. 808 – 816.
201. Sims, E.J. Neonatal screening for cystic fibrosis is beneficial even in the context of modern treatment / E.J. Sims, J. McCormick, G. Mehta [et al.] // The Journal of Pediatrics. – 2005. – Vol. 147. – Supplement 3. – S42 – S46.
202. Skov, M. Cystic fibrosis – an example of personalized and precision medicine / M. Skov, C.R. Hansen, T. Pressler // APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica. – 2019. – Vol. 127. – № 5. – P. 352 – 360.
203. Smith, S. Inhaled antibiotics for pulmonary exacerbations in cystic fibrosis / S. Smith, N.J. Rowbotham, E. Charbek. – DOI: 10.1002/14651858.CD008319.pub3. //

- The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2018. – URL: [https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD008319.pub3/pdf/CD008319/CD008319\\_abstract.pdf](https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD008319.pub3/pdf/CD008319/CD008319_abstract.pdf) (дата обращения: 15.12.2019).
204. Smith, S. Inhaled anti-pseudomonal antibiotics for long-term therapy in cystic fibrosis / S. Smith, N.J. Rowbotham, K.H. Regan. – DOI: 10.1002/14651858.CD001021.pub3 // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2018. – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD001021.pub3/epdf/full/en> (дата обращения: 18.12.2019).
205. Smyth, A.R. European Cystic Fibrosis Society standards of care: best practice guidelines / A.R. Smyth, S.C. Bell, S Bojcin [et al.] // Journal of Cystic Fibrosis. – 2014. – Vol. 13 (Supplement 1). – S23 – S42.
206. Snell, G. The evolution of lung transplantation for cystic fibrosis: A 2017 update / G. Snell, A. Reed, M. Stern, D. Hadjiliadis // Journal of Cystic Fibrosis. – 2017. – Vol. 16. – № 5. – P. 554 – 564.
207. Solomon, G.M. Standardized Measurement of Nasal Membrane Transepithelial Potential Difference (NPD) / G.M. Solomon, I. Bronsveld, K. Hayes [et al.]. – DOI: 10.3791/57006 // Journal of Visualized Experiments: JoVE. – 2018. – № 139. – URL: <https://www.jove.com/pdf/57006> (дата обращения: 15.12.2019).
208. Somaraju, U.R. Pancreatic enzyme replacement therapy for people with cystic fibrosis / U.R. Somaraju, A. Solis-Moya. – DOI: 10.1002/14651858.CD008227.pub3 // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2016. – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD008227.pub3/full> (дата обращения: 03.09.2019).
209. Sontag, M.K. Improving the Sensitivity and Positive Predictive Value in a Cystic Fibrosis Newborn Screening Program Using a Repeat Immunoreactive Trypsinogen and Genetic Analysis / M.K. Sontag, R. Lee, D. Wright [et al.] // The Journal of Pediatrics. – 2016. – Vol. 175. – P. 150 – 158.

210. Sosnay, P.R. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene / P.R. Sosnay, K.R. Siklosi, F. Van Goor [et al.] // *Nature Genetics*. – 2013. – Vol. 45. – № 10. – P. 1160 – 1167.
211. Sosnay, P.R. Diagnosis of Cystic Fibrosis in Nonscreened Populations / P.R. Sosnay, T.B. White, P.M. Farrell [et al.] // *The Journal of Pediatrics*. – 2017. – 181S. – S52 – S57.
212. Sosnay, P.R. Applying Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Genetics and CFTR2 Data to Facilitate Diagnoses / P.R. Sosnay, D.B. Salinas, T.B. White [et al.] // *The Journal of Pediatrics*. – 2017. – Vol. 181S. – S 27 – S 32.
213. Southern, K.W. A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe / K.W. Southern, A. Munck, R. Pollitt [et al.] // *Journal of Cystic Fibrosis*. – 2007. – Vol. 6. – P. 57 – 65.
214. Southern, K.W. Aerosolized agents for airway clearance in cystic fibrosis / K.W. Southern, J.P. Clancy, S. Ranganathan // *Pediatric Pulmonology*. – 2019. – Vol. 54. – № 6. – P. 858 – 864.
215. Southern, K.W. Macrolide antibiotics for cystic fibrosis / K.W. Southern, P.M. Barker, A. Solis-Moya, L. Patel. – DOI: 10.1002/14651858.CD002203.pub4 // *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2012. – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD002203.pub4/full> (дата обращения: 12.12.2019).
216. Southern, K.W. Correctors (specific therapies for class II CFTR mutations) for cystic fibrosis / K.W. Southern, S. Patel, I.P. Sinha, S.J. Nevitt. – DOI: 10.1002/14651858.CD010966.pub2 // *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2018. – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD010966.pub2/epdf/full/en> (дата обращения: 15.09.2019).
217. Stephenson, A.L. The changing epidemiology and demography of cystic fibrosis / A.L. Stephenson, S. Stanojevic, J. Sykes, P.R. Burgel // *La Presse Médicale*, 2017. – Vol. 46. – № 6. – e87-e95.

218. Stephenson, A.L. Survival comparison of patients with cystic fibrosis in Canada and the United States: a population-based cohort study / A.L. Stephenson, J. Sykes, S. Stanojevic, B.S. Quon [et al.]. // *Annals of Internal Medicine*. – 2017. – Vol. 166. – P. 537 – 546.
219. Sykes, J. A standardized approach to estimating survival statistics for population-based cystic fibrosis registry cohorts / J. Sykes, S. Stanojevic, C.H. Goss [et al.] // *Journal of Clinical Epidemiology*. – 2016. – Vol. 70. – P. 206 – 213.
220. Taulan, M. Large genomic rearrangements in the CFTR gene contribute to CBAVD / M. Taulan, A. Girardet, C. Guittard [et al.]. – DOI: 10.1186/1471-2350-8-22 // *BMC Medical Genetics*. – 2007. – Vol. 8. – URL: <https://bmcmedgenet.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2350-8-22> (дата обращения: 15.12.2019).
221. Taylor, C.J. Comparison of two pancreatic enzyme products for exocrine insufficiency in patients with cystic fibrosis / C.J. Taylor, R. Thieroff-Ekerdt, S. Shiff, L. Magnus. [et al.]. // *Journal of Cystic Fibrosis*. – 2016. – Vol. 15. – № 5. – P. 675 – 680.
222. Therrell, B.L. Jr. Immunoreactive trypsinogen (IRT) as a biomarker for cystic fibrosis: challenges in newborn dried blood spot screening / B.L. Therrell Jr., W.H. Hannon, G. Hoffman [et al.] // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2012. – Vol. 106 – P. 1 – 6.
223. Tridello, G. Early diagnosis from newborn screening maximises survival in severe cystic fibrosis / G. Tridello, C. Castellani, I. Meneghelli [et al.] // *European Respiratory Journal (ERJ) Open Research*. – 2018. – Vol. 4. – P. 00109 – 02017.
224. Turck, D. ESPEN-ESPGHAN guidelines on nutrition care for infants, children and adults with cystic fbrosis / D. Turck, C.P. Braegger, C. Colombo [et al.] // *Clinical Nutrition*. – 2016. – Vol. 35. – P. 557 -577.
225. UK Cystic Fibrosis Registry. Annual Data Report 2018 / Лондон, Великобритания. – 2019. – URL: [https://www.cysticfibrosis.org.uk/~/\\_media/documents/the-work-we](https://www.cysticfibrosis.org.uk/~/_media/documents/the-work-we)

- [do/uk-cf-registry/2018-registry-annual-data-report.ashx?la=en](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/401212/uk-cf-registry-2018-registry-annual-data-report.pdf) (дата обращения: 20.10.2019).
226. Untergasser, A. Primer3 – new capabilities and interfaces / A. Untergasser, I. Cucutache, T. Koressaar [et al.]. – DOI: 10.1093/nar/gks596 // Nucleic Acids Research. – 2012. – Vol. 40. - № 15. – URL: <https://academic.oup.com/nar/article-pdf/40/15/e115/25343564/gks596.pdf> (дата обращения: 15.12.2019).
227. Vernooij-van Langen, A. Clinical evaluation of the Nanoduct sweat test system in the diagnosis of cystic fibrosis after newborn screening / A. Vernooij-van Langen, E. Dompeling, J.B. Yntema [et al.] // European Journal of Pediatrics. – 2015. – Vol. 174. – № 8. – P. 1025 – 1034.
228. Villamizar O. Targeted Activation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator / O. Villamizar, S.A. Waters, S. Tristan [et al.]. // Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy. – 2019. – Vol. 27. – № 10. – P. 1737 – 1748.
229. Viviani, L. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) amongst individuals with cystic fibrosis (CF) / L. Viviani L, M.J. Harrison, A. Zolin [et al.] // Journal of Cystic Fibrosis. – 2016. – Vol. 15. – № 5. – P. 619 – 623.
230. Wark, P. Nebulised hypertonic saline for cystic fibrosis / P. Wark, V.M. McDonald. – DOI: 10.1002/14651858.CD001506.pub4 // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2018. – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD001506.pub4/epdf/full/en> (дата обращения: 15.11.2019).
231. Webster, H.L. Laboratory diagnosis of cystic fibrosis / H.L. Webster // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. – 1983. – Vol. 18. – № 4. P. 313 – 338.
232. Wheatley, C.M. Influence of the Vibralung Acoustical Percussor on pulmonary function and sputum expectoration in individuals with cystic fibrosis / C.M. Wheatley, S.E. Baker, C.M. Daines, H. Phan [et al.]. – DOI: 10.1177/1753466618770997 // Therapeutic Advances in Respiratory Disease. – 2018.

- URL: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1753466618770997> (дата обращения: 04.09.2019).
233. Wilson, L.M. Airway clearance techniques for cystic fibrosis: an overview of Cochrane systematic reviews / L.M. Wilson, L. Morrison, K.A. Robinson. – DOI: 10.1002/14651858.CD011231.pub2 // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2019. – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD011231.pub2/epdf/full/en> (дата обращения: 03.09.2019).
234. Yang, C. Dornase alfa for cystic fibrosis / C. Yand, M. Montgomery. – DOI: 10.1002/14651858.CD001127.pub4 // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2018. – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD001127.pub4/pdf/full/en> (дата обращения: 18.12.2019).
235. Yohe, S. Review of Clinical Next-Generation Sequencing / S. Yohe, B. Thyagarajan // Archives of Pathology and Laboratory Medicine. – 2017. – Vol. 141. – № 11. – P. 1544 – 1557.
236. Zimmermann, P. The Immunomodulatory Effects of Macrolides-A Systematic Review of the Underlying Mechanisms / P. Zimmermann, V.C. Ziesenitz, N. Curtis, N. Ritz. – DOI: 10.3389/fimmu.2018.00302 // Frontiers in Immunology. – 2018. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00302/pdf> (дата обращения: 20.12.2019).
237. Zolin, A. Cystic fibrosis mortality in childhood. Data from European Cystic Fibrosis Society Patient Registry / A. Zolin, A. Bossi, N. Cirilli, N. Kashirskaya [et al.] // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2018. – Vo. 15. – № 9 . – E2020.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

гДНК – геномная ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота)

ИРТ – иммунореактивный трипсиноген

МВ – муковисцидоз

ППУ – плавающий пороговый уровень

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ФПУ – фиксированный пороговый уровень

CFTR – cystic fibrosis transmembrane regulator – трансмембранный регулятор кистозного фиброза (муковисцидоза)

HRMA – (high resolution melting analysis) – анализ кривых плавления высокого разрешения

MLPA – (multiplex ligation-dependent probe amplification) – амплификация мультиплексных лигируемых зондов

NPV – (negative predictive value) – прогностичность отрицательного результата

PPV – (positive predictive value) – прогностичность положительного результата

Se – чувствительность (sensitivity)

Sp – специфичность (specificity)

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**RU** **2017663099**

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ ПРОГРАММЫ ДЛЯ ЭВМ

<p>Номер регистрации (свидетельства): <a href="#">2017663099</a></p> <p>Дата регистрации: <b>24.11.2017</b></p> <p>Номер и дата поступления заявки: <b>2017619871 03.10.2017</b></p> <p>Дата публикации: <a href="#">24.11.2017</a></p> <p>Контактные реквизиты: <b>нет</b></p>	<p>Авторы: <b>Мещеряков Виталий Витальевич (RU), Донников Максим Юрьевич (RU), Девицын Иван Николаевич (RU)</b></p> <p>Правообладатель: <b>Бюджетное учреждение высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа - Югры « Сургутский государственный университет» (RU)</b></p>
---	--

Название программы для ЭВМ:

**Floating Level of IRT**

**Реферат:**

Программа предназначена для автоматизированной статистической обработки лабораторных биохимических количественных данных уровней сывороточного биомаркера иммунореактивного трипсиногена (ИРТ), полученных при проведении неонатального скрининга на муковисцидоз. Программа может применяться врачами клинической лабораторной диагностики, врачами-генетиками, педиатрами в рамках научных исследований, а также в лабораториях медико-генетических консультаций для хранения и обработки текущих результатов анализов с расчетом плавающего порогового уровня ИРТ. Программа позволяет вводить, редактировать и хранить результаты исследований, строить гистограммы с возможностью исключения статистических выбросов, определять произвольные процентиля данных. Имеется возможность импорта/экспорта данных формата Excel.

**Тип реализующей ЭВМ:** IBM PC - совмест. ПК

**Язык программирования:** C#

**Вид и версия операционной системы:** Windows XP и выше

**Объем программы для ЭВМ:** 93 Кб

[http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS\\_Ru#1512803572447](http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1512803572447)