

ТИЩЕНКО О.^{1, 2✉}, ТИРКУС М.^{1, 3}, ШИМАНСЬКА І.^{1, 4}, МАТІЙЦІВ Н.^{1, 3}, МАКУХ Г.^{1, 2, 3}

¹ ТОВ «Науковий медико-генетичний центр «Леоген»»,

Україна, 79059, м. Львів, вул. Максимовича, 72, ORCID: 0009-0005-8376-9855, 0009-0006-9353-4707, 0000-0002-4403-6166, 0000-0002-1582-2037, 0000-0001-7749-5353

² Регіональний центр неонатального скринінгу, КНП «Львівський обласний клінічний перинатальний центр»,

Україна, 79032, м. Львів, вул. Д. Вашингтона, 9

³ Національний університет ім. Івана Франка,

Україна, 79000, м. Львів, вул. Грушевського, 4

⁴ Інститут спадкової патології НАН України,

Україна, 79008, м. Львів, вул. Миколи Лисенка, 31-А

✉ oksana.v.tyshchenko@gmail.com, 0973172021

ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ПІДХОДІВ У ДІАГНОСТИЦІ ВАРІАНТІВ ГЕНА CFTR: ІСТОРИЧНА ПЕРСПЕКТИВА ТА ВЛАСНИЙ ДОСВІД

Мета. Проаналізувати використання різних молекулярно-генетичних методів діагностики муковісцидозу, оцінити їх ефективність, переваги та обмеження, а також визначити оптимальні підходи для виявлення варіантів у гені CFTR. **Методи.** Було проведено аналіз даних національного реєстру пацієнтів із муковісцидозом та виконані лабораторні дослідження на базі Інституту спадкової патології та НМГЦ «Леоген». **Результати.** Показано, що комбіноване застосування методів першої лінії, що ідентифікують мажорні варіанти в популяції та MLPA дозволяє виявити до 80 % варіантів CFTR, а NGS забезпечує більш детальну ідентифікацію мутацій, включаючи рідкісні варіанти. **Висновки.** Найбільш ефективним підходом є етапна стратегія, що включає тестування поширених варіантів та подальше NGS-дослідження у разі негативного результату. Використання міжнародних стандартів HGVS та баз даних CFTR2 та NCBI є важливим для уніфікації діагностичних висновків.

Ключові слова: муковісцидоз, CFTR, молекулярна діагностика, NGS, MLPA.

Муковісцидоз (MB; OMIM № 219700) являє собою найпоширеніше аутосомно-рецесивне захворювання в європейській популяції, яке спричинене генетичними варіантами в гені CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) [1]. Це призводить до порушення транспорту іонів хлору та натрію через клітинні мембрани, що, своєю чергою, викликає дисфункцію екзокринних залоз, проявляючись у згущенні секретів та розвитку па-

тологій дихальної, травної та репродуктивної систем. Станом на сьогодні зареєстровано більше ніж 2000 варіантів цього гена. Генетична діагностика мутацій CFTR є незамінним етапом для підтвердження діагнозу, прогнозування клінічного перебігу захворювання та окреслення стратегії лікування, зокрема, у контексті підбору таргетної терапії.

Від моменту першого опису мутації F508del (с.1521_1523delCTT), у 1989 році технології молекулярної діагностики зазнали значної еволюції – від рестрикційного аналізу та методів гібридизації до високопродуктивного секвенування нового покоління (NGS) [2]. Однак, незважаючи на технологічний прогрес, проблема ефективної діагностики залишається нагальною, оскільки жоден з існуючих методів не є універсальним, а вибір алгоритму тестування залежить від специфіки клінічного запиту та доступних технологічних рішень.

У даній статті представлено аналіз історичного розвитку методів молекулярної діагностики CFTR, їх ефективність, переваги та обмеження, а також власний досвід застосування різних методик у лабораторній практиці.

Матеріали і методи

Для оцінки ефективності різноманітних підходів до молекулярно-генетичної діагностики було проведено аналіз даних національного реєстру пацієнтів із муковісцидозом. Лабораторні дослідження здійснювались на базі Інституту спадкової патології та наукового медико-генетичного центру «Леоген». Оцінювались методи, що використовувались у різні періоди

починаючи з 1996 року, зокрема аналіз їхньої ефективності стосовно виявлення як поширених, так і рідкісних варіантів гена *CFTR* та доступність методик. Для аналізу первинної структури гена *CFTR* використовували наступні методи: гетеродуплексний, рестрикційний аналіз, метод MLPA, гібридизація з використанням набору INNO-LiPA *CFTR*, TaqMan, класичне секвенування за Сенгером та NGS [4]. Секвенування методом NGS проводили в Department of Biology and Medical Genetics Department of Molecular Genetics and National Cystic Fibrosis Centre University Hospital Motol and 2nd Medical School Charles University Prague у межах наукової співпраці.

Виділення ДНК: першим етапом усіх досліджень є виділення ДНК з периферійної крові пацієнта. На початкових етапах вдалось застосувати фенольний метод, згодом імплементовано метод висолювання, що забезпечує високу якість виділеної ДНК [5]. Наразі в практиці використовується автоматизоване виділення ДНК на платформі Magcore за допомогою набору Magcore Genomic DNA Whole Blood Kit.

Результати та обговорення

Для оцінки ефективності різних підходів до молекулярно-генетичної діагностики проведено аналіз даних національного реєстру пацієнтів із муковісцидозом, який налічує понад 525 пацієнтів. З них 80 % отримали підтвердження діагнозу, базуючись на результатах методик, які виявляють найпоширеніші варіанти гена *CFTR*. Для пацієнтів із невизначеними результатами або відсутністю патогенних варіантів у тестах першої лінії проводили дослідження методом NGS.

Гетеродуплексний аналіз метод, що став першим запровадженим для аналізу найпоширенішої мутації F508del, оскільки він дозволяє без застосування рестрикційних ферментів виявляти дрібні хромосомні перебудови, такі як делеція трьох нуклеотидів. Дослідження виконувались шляхом електрофоретичного розділення зразків у 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ), що забезпечує високу роздільну здатність. Окрім F508del (c.1521_1523delCTT), за допомогою цього методу можна детектувати варіанти F508C (c.1523T>G), I507del (c.1519_1521delATC), 1677delTA (c.1545_1546delTA) та 2184insA, які охоплюють 75 % усіх виявлених мутацій. Однак він має обмеження в чутливості до гомозиготних

варіантів 2184insA, що може призводити до недоідентифікації пацієнтів.

Аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (RFLP) застосовувався для швидкої детекції частих мутацій. На сьогоднішній день цим методом можна продіагностувати понад 30 мутацій, включаючи G542X (c.1624G>T), 3849+10kbC>T (c.3718-2477C>T), 621+1G>T (c.489+1G>T), 2789+5G>A (c.2657+5G>A) та інші, що загалом охоплює близько 20 % усіх виявлених варіантів *CFTR*. Це швидкий та економічно вигідний метод, який залишається ефективним для масового скринінгу поширених варіантів. Аналіз фрагментів ДНК після рестрикційного розщеплення проводиться за допомогою електрофоретичного розділення у 2 % агарозному гелі.

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) для виявлення великих делецій та дуплікацій у гені *CFTR* використовували метод MLPA. За допомогою набору SALSA MLPA P091 *CFTR* визначали варіації числа копій у критичних ділянках гена. Цей метод не дозволяє виявляти точкові мутації, але є ефективним для аналізу варіанту F508del, *CFTR*dele2,3 (21 kb), а також I507del. Загалом, використання MLPA дає змогу продіагностувати більше ніж 66 % випадків муковісцидозу (рис. 1). Метод є дорожчим порівняно з іншими підходами і потребує використання спеціалізованого обладнання, включаючи секвенатор та програмне забезпечення для аналізу, таке як Coffalyser.Net [3].

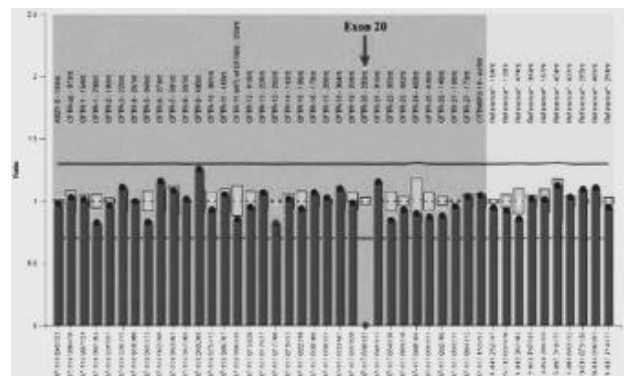


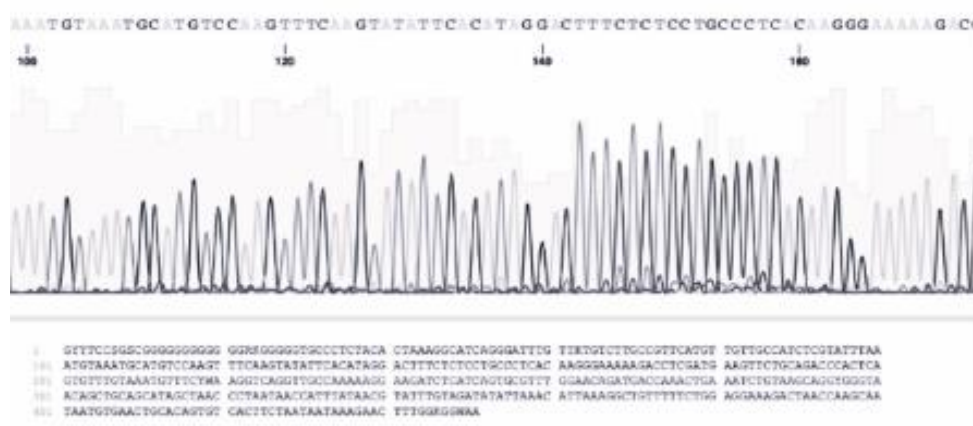
Рис. 1. MLPA виявив у пацієнта гомозиготну делецію екзону 20 *CFTR*. Червона стрілка позначає делецію екзону 20 в гомозиготному стані.

Гібридизація (LiPA – Line Probe Assay) з використанням набору INNO-LiPA *CFTR*, який дозволяє одночасно визначити понад 30 найпоширеніших варіантів гена *CFTR*. Цей метод є швидким та використовується під час скринінгу

Figure 1 is a schematic representation of a 180 kb genomic region on chromosome 10p12. The figure is divided into two main sections: the top section (clones 1-18) and the bottom section (clones 19-31). The top section includes a 'Red Marker Line (kb)' and a 'Contest' label. The bottom section includes a 'Green Marker Line (kb)' label. A scale bar at the bottom indicates distances in kb from 0 to 180. The clones are represented by vertical bars of varying heights, indicating their size and position relative to the markers. The top section shows clones 1-18, with a 'Red Marker Line (kb)' and 'Contest' label. The bottom section shows clones 19-31, with a 'Green Marker Line (kb)' label. A scale bar at the bottom indicates distances in kb from 0 to 180.

TaqMan-аналіз: швидка детекція відомих точкових варіантів. TaqMan-генотипування застосовували для ідентифікації специфічних мутацій у режимі реального часу (qPCR). Використовували TaqMan SNP Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific) для визначення найпоширеніших варіантів, як-от F508del (c.1521_1523delCTT), G542X (c.1624G>T), N1303K (c.3909C>G). Метод має обмеження, оскільки дозволяє аналізувати лише відомі мутації і не підходить для виявлення нових або рідкісних варіантів.

NGS (Next-Generation Sequencing) – метод секвенування наступного покоління використовується для комплексного аналізу всього гена *CFTR*, включаючи рідкісні варіанти та сплайсінг-мутації. Ця технологія дозволяє секвенувати велику кількість ДНК-фрагментів одночасно, що робить її надзвичайно потужною для діагностики спадкових захворювань. Проте NGS має певні обмеження. Він може пропускати структурні зміни, такі як великі делеції або дуплікації, що потребує додаткового тестування MLPA. Також метод має труднощі з детекцією варіантів у регуляторних ділянках, а інтерпретація варіантів невизначеного значення (VUS) може бути складною.



ISSN 2415-3826 (Online), ISSN 2219-3782 (Print). Фактори експериментальної еволюції організмів 2025. Том 37

NGS можна використовувати для секвенування цілого гена *CFTR* або для панельного аналізу. У випадку *CFTR*, панельне секвенування охоплює лише екзони разом із прилеглими (+50 н. о.) ділянками інтронів, тоді як повногеномне секвенування включає весь ген, зокрема всі інтрони та регуляторні елементи. Секвенування, що аналізує всю послідовність гена, включає екзони, інтрони та регуляторні ділянки, що забезпечує повніше охоплення, але є дорожчим і потребує складнішого біоінформатичного аналізу (рис. 4).

В Україні на сьогодні є можливості проведення повного секвенування гена *CFTR* методом NGS після позитивного підтвердженого

пренатального сгенакринінгу на базі Національної дитячої спеціалізованої лікарні «Охматдит». Окрім того, пацієнти, у яких не були виявлені найпоширеніші варіанти за допомогою стандартних методів, відправляються для подальшого обстеження в Чехію (Прага) у лабораторію MOTOL.

Представлена зведена таблиця демонструє порівняння всіх вищеписаних методів молекулярно-генетичної діагностики *CFTR*. Кожен із методів має свої переваги та обмеження, що визначають його застосування у клінічній практиці.

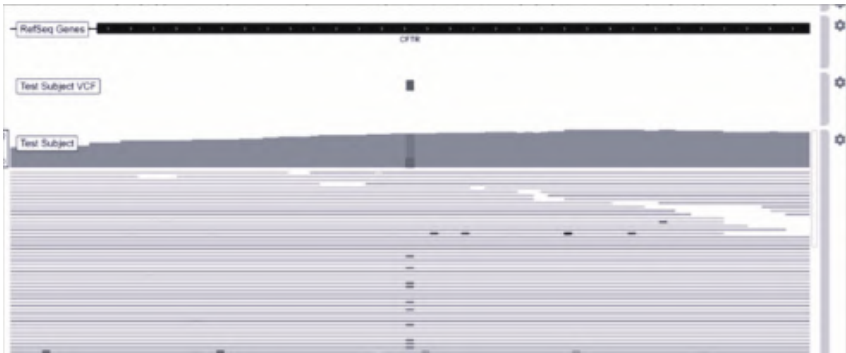


Рис. 4. Результат дослідження цілого гена *CFTR* методом NGS.

Таблиця. Порівняльна характеристика молекулярно-генетичних методів для діагностики патогенних варіантів гена ТРБМ (*CFTR*)

Метод	Тип мутацій, що виявляються	Покриття всіх виявлених випадків (%)	Досвід використання в Україні	Переваги	Обмеження
1	2	3	4	5	6
Гетеродуплексний аналіз	Точкові мутації, делеції кількох нуклеотидів	75 %	Використовується	Простий у виконанні, висока роздільна здатність	Обмежений набір мутацій. Висока ймовірність хибнонегативних результатів
RFLP (рестрикційний аналіз)	Точкові мутації	20 %	Широко використовується	Економічно вигідний, швидкий	Обмежений набір мутацій. Висока ймовірність хибнонегативних результатів

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6
MLPA	Великі делеції/дуплікації, р.Phe508del та I507del	66 %	Практично не використовується	Висока чутливість для варіацій числа копій (CNV), стандартизований метод	Не визначає точкові мутації, потреба спеціалізованого обладнання та програмного забезпечення
LIPA (Line Probe Assay)	Понад 30 поширених мутацій	75 %	Для скринінгу новонароджених	Висока специфічність. Придатний для масового скринінгу	Обмежений набір мутацій
TaqMan	Специфічні точкові мутації	75 %	Використовується у приватних лабораторіях	Швидкий і автоматизований	Аналізує тільки обрані мутації (часткове покриття гена)
Секвенування за Сенгером	Точкові мутації, невеликі інсерції/делеції. Аналіз будь-яких варіантів в межах обмеженого фрагмента гена	Залежно від регіону	Практично не використовується для гена <i>CFTR</i>	Висока точність. «Золотий стандарт»	Не підходить для масового тестування. Не визначає великі делеції. Висока вартість аналізу всього гена
NGS	Повне секвенування гена	95–99 % (залежно від покриття)	Використовується	Повний аналіз <i>CFTR</i> , враховуючи рідкісні мутації	Можливе пропущення варіантів та делецій. Висока вартість.

Методами першої лінії залишаються поєднання аналізу, що виявляє найчастіші патогенні варіанти та MLPA, оскільки вони дозволяють виявити найпоширеніші варіанти *CFTR* з сукупним покриттям приблизно 80 % усіх пацієнтів із муковісцидозом. MLPA дозволяє виявити великі делеції та дуплікації, а рестрикційний аналіз є швидким і економічно вигідним для ідентифікації частих точкових мутацій. Проте серед пацієнтів з муковісцидозом, які вже пройшли комплексне обстеження, до 30 % пато-

генних змін не визначаються рутинно. На це число впливають використовувані методи та досліджувана популяція. Таким чином, оптимальним підходом до діагностики муковісцидозу є використання етапної стратегії, що включає початкове тестування методами першої лінії з подальшим проведенням NGS у разі негативного результату.

Коректне трактування молекулярно-генетичних результатів є ключовим у діагностиці муковісцидозу. Для стандартизованого

запису мутацій використовується HGVS (Human Genome Variation Society), що встановлює єдині правила для їх позначення. Наприклад, варіант c.1521_1523delCTT означає делецію триплету CTT у кодуючій ДНК, що призводить до втрати амінокислоти фенілаланіну (p.Phe508del). Історично мутації *CFTR* мали різні позначення. Так, F508del може записуватися як p.Phe508del (HGVS-білковий рівень) або c.1521_1523delCTT (HGVS-кДНК рівень), а варіант G542X має альтернативні назви p.Gly542X, c.1624G>T, 1756G>T. Відсутність єдиного стандарту ускладнює порівняння результатів між лабораторіями.

При трактуванні результатів також важливо пам'ятати, що муковісцидоз є аутосомно-рецесивним захворюванням, тобто для його розвитку необхідна наявність двох патогенних мутацій у гомозиготному або компаунд-гетерозиготному стані. Якщо у пацієнта виявлено лише одну патогенну мутацію, він вважається носієм, що не є підставою для встановлення діагнозу.

Ми демонструємо випадок, отриманий за допомогою методу NGS. У пацієнта було виявлено дві патогенні мутації у гені *CFTR* – c.413_415dup (p.Leu138dup) та делецію екзонів 2–3 гени *CFTR*, обидві у гетерозиготному стані. Відповідно до аутосомно-рецесивного механізму успадкування, така комбінація вказує на компаунд гетерозиготність, що асоціюється з розвитком муковісцидозу. У іншому випадку, діагностованому цим методом, виявлено варіант c.1516A>G (p.Ile506Val) у гетерозиготному стані, що класифікують як доброякісний (відповідно до класифікації ClinVar), що вказує на носійство та не викликає розвитку захворювання. Правильне трактування таких результатів є критично важливим, оскільки неврахування зиготності варіантів може призвести до хибної інтерпретації і помилкового встановлення діагнозу.

Також виявлено обмеження різних методів діагностики. Пацієнту, якому було проведено гетеродуплексний та рестрикційний аналіз на 32 поширені варіанти *CFTR*, виявили *CFTR*dle2.3 (del21kb) у гетерозиготному стані. Для уточнення діагнозу NGS у лабораторії MOTOL ідентифікував додаткову дуплікацію ~26.8kb (*CFTR*dle2.3/dup6b-10ex), що змінило трактування випадку.

Ці результати підтверджують необхідність стандартизації запису варіантів та використання міжнародних баз даних, таких як ClinVar, HGMD, NCBI (National Center for Biotechnology Information), що допомагають уникнути помилкової інтерпретації. Окремо слід зазначити, що *CFTR2* – це міжнародна база даних, яка містить інформацію про клінічну значущість та поширеність варіантів *CFTR*, що значно полегшує ухвалення клінічних рішень.

Висновки

Молекулярно-генетична діагностика муковісцидозу є важливим інструментом у підтвердженні діагнозу та визначенні оптимальних підходів до лікування. Проте жоден із доступних методів не забезпечує абсолютного охоплення всіх можливих варіантів у гені *CFTR*. У даному дослідженні продемонстровано переваги та обмеження різних підходів до аналізу *CFTR*, а також важливість комбінованого використання методик для підвищення діагностичної ефективності.

Для оцінки ефективності різних підходів до молекулярно-генетичної діагностики проведено аналіз даних національного реєстру пацієнтів із муковісцидозом, який налічує понад 500 пацієнтів. З них 80 % отримали підтвердження діагнозу, базуючись на результатах досліджень першої лінії, що виявляють найпоширеніші варіанти. Для пацієнтів із невизначеними результатами або відсутністю патогенних варіантів у тестах першої лінії проводили NGS.

Трактування отриманих результатів є ще одним важливим аспектом діагностики. Використання HGVS-стандарту та перевірка номенклатури у міжнародних базах, таких як *CFTR2* та NCBI, значно покращують точність інтерпретації даних та допомагають уникнути помилкових діагнозів.

Перспективним напрямком у майбутньому є розвиток нових технологій секвенування, що дозволять подолати поточні обмеження, зокрема досконаліші алгоритми обробки даних NGS, технології довгочитного секвенування (long-read sequencing) та комплексний підхід до аналізу варіантів *CFTR*. Впровадження цих методик допоможе покращити точність діагностики та персоналізовані підходи до ведення пацієнтів із муковісцидозом.

References

1. Bareil C., Bergougnoux A. CFTR gene variants, epidemiology and molecular pathology. *Archives de Pédiatrie*. 2020. Vol. 27. P. eS8–eS12. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(20\)30044-0](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(20)30044-0).
2. Welsh M. J., Smith A. E. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. 1993. Vol. 73 (7). P. 1251–1254. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90353-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90353-R).
3. Liu K., Xu W., Xiao M., Zhao X., Zhang Q., Song J., Zhang X. Characterization of clinical and genetic spectrum of chinese patients with cystic fibrosis. 2020. <https://doi.org/10.21203/rs.2.20219/v1>.
4. Makukh G. V., Hnateyko O. Z., Zastavna D. V., et al. Methods of molecular genetic analysis of cystic fibrosis, phenylketonuria and Nijmegen syndrome. Lviv : Methodological recommendations, 2009. 28 p. [in Ukrainian]
5. Makukh G. V., Zastavna D. V., Tyrkus M. Ya. Method of DNA isolation from peripheral blood leukocytes. Pat. 32044 Ukraine: MPK G01N33/49 (2006.01) No. u200801896; appl. 14.02.2008; publ. 25.04.2008, Bull. No. 8. [in Ukrainian]

TYSHCHENKO O.^{1,2}, TYRKUS M.^{1,3}, SHYMANSKA I.^{1,4}, MATIITSIV N.^{1,3}, MAKUKH H.^{1,2,3}

¹ LLC “Scientific Medical-Genetic Center “LeoGene””,

Ukraine, 79059, Lviv, Maksymovycha str., 7g

² Ivan Franko National University of Lviv,

Ukraine, 79000, Lviv, Hrushevskoho str., 4

³ Regional centre of newborn screening, KNP “Lviv Regional Clinical Perinatal Centre”,

Ukraine, 79000, Lviv, D. Vashyngtona str., 6

⁴ Institute of Hereditary Pathology, NAS of Ukraine,

Ukraine, 79008, Lviv, Mykola Lysenka str., 31-A

APPLICATION OF MOLECULAR-GENETIC APPROACHES IN CFTR GENE VARIANT DIAGNOSTICS: HISTORICAL PERSPECTIVE AND PERSONAL EXPERIENCE

Aim. To analyze the evolution of molecular-genetic methods for cystic fibrosis diagnosis, assess their effectiveness, advantages, and limitations, and determine optimal approaches for detecting *CFTR* gene variants. **Methods.** An analysis of the national registry of cystic fibrosis patients was conducted, along with laboratory studies performed at the Institute of Hereditary Pathology and the Scientific Medical-Genetic Center “LeoGene”. The study investigated methods including heteroduplex analysis, restriction analysis, MLPA, INNO-LiPA *CFTR*, TaqMan, Sanger sequencing, and NGS. **Results.** It was shown that the combined use of first-line methods identifying major population variants, along with MLPA, allows the detection of up to 70 % of *CFTR* variants. NGS provides a more detailed mutation analysis, including rare variants. **Conclusions.** The most effective approach is a stepwise strategy, incorporating initial screening for common variants followed by NGS analysis in case of a negative result. The use of international HGVS standards and databases such as *CFTR2* and NCBI is crucial for the unification of diagnostic conclusions.

Keywords: cystic fibrosis, *CFTR*, molecular diagnostics, NGS, MLPA.