



УДК 616.36:616.831]-056.7-008.9:5465:577.21(571.62)

Н.В. Вялова¹, Т.Н. Просколова¹, Г.М. Баязутдинова², Н.Н. Тен¹, С.И. Нам¹, А.М. Хелимский¹

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ У БОЛЬНЫХ ГЕПАТОЛЕНТИКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ В ХАБАРОВСКОМ КРАЕ

¹Дальневосточный государственный медицинский университет, 680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru, г. Хабаровск;
²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, ул. Москворечье, 1, тел. 8-(495)-221-90-84, e-mail: info@dnalab.ru, г. Москва

Резюме

Проведено молекулярно-генетическое исследование 15 пациентам с гепатолентикулярной дегенерацией в Хабаровском крае. Анализ спектра мутаций в гене АТР7В выявил наибольшую долю мутации р.His1069Gln, что согласуется с данными о частоте встречаемости этой мутации в Российской Федерации в целом.

Ключевые слова: мутация, ген АТР7В, гепатолентикулярная дегенерация.

N.V. Vyalyova¹, T.N. Proskokova¹, G.M. Bayazutdinova², N.N. Ten¹, S.I. Nam¹, A.M. Helimsky¹

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS IN PATIENTS WITH HEPATOLENTICULAR DEGENERATION IN KHABAROVSK KRAY

¹Far East State Medical University, Khabarovsk;
²Research Center for Medical Genetics, Federal Public Budget-Funded Research Institution, Moscow

Summary

A molecular typing was studied in 15 patients with hepatolenticular degeneration in Khabarovsk Kray, Russia. The analysis of the АТР7В gene alteration revealed the prevalence of р.His1069Gln mutation, which is compliant with the data on this gene mutation frequency in the Russian Federation.

Key words: mutation, АТР7В gene, hepatolenticular degeneration.

Гепатолентикулярная дегенерация (ГЛД), болезнь Вильсона – Коновалова – редкое аутосомно-рецессивное прогрессирующее заболевание, характеризующееся избыточным накоплением в организме и токсическим воздействием меди. Болезнь сопровождается сочетанным поражением внутренних органов и структур головного мозга [1, 5, 6].

Распространенность болезни Вильсона в популяциях мира колеблется в широких пределах от 0,4 до 6,8 на 100 000 населения с неравномерным географическим и этническим распространением [1, 7, 8]. Гетерозиготное носительство патологического гена достигает 1 % [8, 11].

В 1993 году независимыми исследователями из США и Канады был идентифицирован ген ГЛД, получивший название АТР7В (АТРase, Cu (2+)-Transporting Beta Polypeptide), расположенный на длинном плече

13-й хромосомы (локус 13q14) [9, 14]. Ген АТР7В имеет достаточно сложную организацию, охватывая около 80 тысяч п.н. геномной ДНК. В его состав входит 21 экзон длиной от 77 до 2355 п. н. [4, 13]. Результатом мутации гена АТР7В является нарушение синтеза и функции белка АТФ-азы Р-типа, которая обеспечивает встраивание меди в молекулу апоцерулоплазмин в аппарате Гольджи и экскрецию с желчью избытка меди в составе церулоплазмин и других медьсодержащих белков клетками печени. При ГЛД этот процесс нарушается, что приводит к увеличению концентрации «свободной» меди крови, накоплению ее в различных тканях и органах [10, 15]. В настоящее время известно более 380 различных мутаций в гене АТР7В [2, 3, 4]. Наиболее частыми являются миссенс-мутации, мелкие инсерции, делеции, нонсенс-, фреймшифт-мутации, мутации сайтов сплайсинга, реже выявляются

интронные и регуляторные мутации [4, 12]. Клинические проявления возможны при гомозиготном или компаунд-гетерозиготном носительстве мутаций, в большем проценте случаев больные являются компаунд-гетерозиготами [2, 4, 8]. Множественные вариации мутационных комбинаций у компаунд-гетерозигот имеют значение для выраженного фенотипического полиморфизма ГЛД. «Горячими точками» гена АТР7В являются 2, 8, 14, 15, 16 и 18 экзоны. Многочисленные исследования мутационного спектра в отдельных популяциях выявили, что распространенность той или иной мутации в гене АТР7В зависит от территориального ареала проживания [1, 4]. Частоту встречаемости мутаций и их спектр необходимо принимать во внимание при определении приоритетных для поиска мутаций в конкретном регионе.

Для европейской популяции наиболее распространенной мутацией является миссенс-мутация р.His1069Gln, генетический дефект которой обусловлен трансверсией С на А в 3207 положении, приводящей к замене аминокислоты гистидин на глутамин в 1069 положении [3, 4]. Впервые данная мутация была обнаружена у 22 % больных русского и 31 % американского происхождения в 1993 году [4, 9]. В европейских и североамериканских популяциях р.His1069Gln встречается в гомозиготном или гетерозиготном состоянии в 50-80 % случаев [4], в Российской популяции – в 30-40 % [3]. Мутация р.His1069Gln могла возникнуть в результате одиночного и очень древнего мутационного события, так как пациенты из различных европейских стран с данной мутацией имеют одинаковый гаплотип по сцепленным с геном полиморфным ДНК-локусам [4]. В Болгарии частота мутации р.His1069Gln составила 59 % в выборке из 80 больных болгар [4]. Данная мутация не встречается в Японии, Китае, Бразилии и Индии. У европейцев в 10 % случаев встречаются мутации в 8 экзоне (2299insC, G710S), 15 экзоне (3402delC) и 13 (R969Q). В Греции наиболее частыми оказались р.His1069Gln (35 %) и р.Arg969Gln (12 %). В Испании преобладает мутация р.Met645Arg (55 % случаев). В Бразилии в 30 % случаев ГЛД определяется мутация 3402delC. В популяциях стран Дальнего Востока (Корея, Китай, Тайвань, Япония) преобладает по частоте (35-40 %) мутация в 8 экзоне с заменой гуанина на тимин в 2 333 положении р.Arg778Leu.

Выявление мажорных мутаций имеет значение для медико-генетического консультирования. Возможна разработка скрининговых программ для определенных этнических групп, которые позволят осуществлять прямую ДНК диагностику, несмотря на сложную организацию гена.

Цель работы – анализ спектра мутаций в гене АТР7В у больных ГЛД в Хабаровском крае.

Материалы и методы

Проведено исследование образцов ДНК у 15 пациентов с клиническим диагнозом ГЛД. Возраст обследуемых пациентов составил от 15 до 48 лет (средний возраст – 35,5±9,5 лет). Трое пациентов являлись родными сибсами. Молекулярно-генетическое исследование проводилось на базе ДНК-лаборатории ФГБНУ Медико-генетического научного центра (г. Москва)

после получения информированного согласия больных. Материалом для исследования служила геномная ДНК, выделенная из венозной крови больных. Выделение ДНК из лейкоцитов венозной крови производили стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Использовали метод определения одноцепочечного конформационного полиморфизма ДНК (SSCP – анализ) наиболее часто мутирующих экзонов гена АТР7В. После выявления измененного электрофоретического паттерна миграции фрагментов ДНК проводилось прямое секвенирование мутантных образцов с целью выявления конкретных изменений нуклеотидного состава гена.

Проведен поиск восьми наиболее часто встречающихся мутаций гена АТР7В в российской популяции (с.3207C>A, с.2532delA, с.3402delC, с.2304insC, с.1707insC, с.1340-1343del4, с.3649-3654del6, с.3627-3630del4). При обнаружении данных мутаций в гетерозиготном состоянии методом прямого секвенирования проведено исследование всей кодирующей последовательности и областей экзон-интронных соединений гена АТР7В.

Обработка полученного материала проводилась с использованием пакета программ Statistica 6.0 и SPSS 16.0.

Результаты и обсуждение

Мутация р.His1069Gln обнаружена у 10 (67 %) пациентов в гомозиготном состоянии и у 3 (20 %) в компаунд-гетерозиготном состоянии. Аллельная частота данной мутации – 76,7 % (таблица). Другие семь мутации встречались в компаунд-гетерозиготном состоянии с аллельной частотой 3,3 %. Мутациями (в числе трех) в компаунде с р.His1069Gln, обнаруженных методом прямого секвенирования были: первая – с.1707+2dupT в 4 интроне; вторая – транзиция гуанина на аденин в 2 336 основании (р.Trp779Stop) в 8 экзоне; у третьей пациентки мутаций не выявлено. Секвенирование гена не дает возможность оценить некоторые особые виды мутаций: протяженные делеции или дупликации, мутации в промоторной области или в такой области интрона, которая влияет на сплайсинг, но не попадает внутрь конкретной пары праймеров, амплифицирующих ближайший экзон. В этом случае обнаружение второй мутации требует использования более сложных подходов.

Таблица

Спектр и частота мутаций в гене АТР7В у больных с ГЛД в Хабаровском крае

Замена нуклеотидов	Замена аминокислот	Экзон/интрон	Число хромосом	Частота, %
c.1707+2dupT	splice	Int 4	1	3,3
c.1847G>A	p.Arg616Trp	5	1	3,3
c.2336G>A	p.Trp779Stop	8	1	3,3
c.2304dupC	p.Met769HisfsX26	8	1	3,3
c.3190G>A	p.Glu1064Lys	14	1	3,3
c.3207C>A	p.His1069Gln	14	23	76,7
c.3402delC	p.Ala1135GlnfsX13	15	1	3,3
Неустановленные мутации	–	–	1	3,3
Всего хромосом			30	

У оставшихся двух больных – компаунд-гетерозигот выявлены другие сочетания мутаций. У одной пациентки обнаружена дупликация цитозина с.2304dupC, которая приводит к сдвигу рамки считывания, начиная с аминокислоты метионин в положении 769 (р. Met769HisfsX2) и делеция цитозина в основании 3 402, также приводящая к сдвигу рамки считывания в положении 1 135 белка (р. Ala1135GlnfsX1). Обе мутации входят в восемь, наиболее часто встречающихся в Российской популяции. У второго больного выявлены в гетерозиготном состоянии замена гуанина на аденин в 3 190 основании, приводящая к замене глутаминовой кислоты на лизин в положении 1 064 белка (р. Glu1064Lys) в 14 экзоне и замена гуанина на аденин в 1 847 основании, приводящая к замене аргинина на триптофан в положении 616 белка (р. Arg616Trp) в 5 экзоне. Обе мутации не входят в диагностический протокол для российской популяции.

Таким образом, мутационный анализ гена АТР7В имеет важное практическое значение, позволяя проводить диагностику как в сложных клинических случаях, так и пресимптоматическую и пренатальную диагностику в семьях повышенного риска.

Выводы

У больных ГЛД в Хабаровском крае преобладающей мутацией в гене АТР7В является замена р. His1069Gln в 14 экзоне, выявляемая у 87,7 % больных на 76,7 % хромосом. Доля данной мутации в 2 раза превышает показатели в российской популяции в целом.

Высокая частота мутации р. His1069Gln позволяет использовать ее поиск в качестве основного молекулярно-генетического теста при обследовании больных с ГЛД в Хабаровском крае.

Литература

1. Вялова Н.В., Проскокова Т.Н., Хелимский А.М. Гепатолентикулярная дегенерация: клиника, диагностика, лечение // Дальневосточный медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 130-134.

2. Дубовик С.В., Гусина Н.Б. Популяционная частота болезни Вильсона в Беларуси // Медицинская генетика. – 2010. – № 11. – С. 27-33.

3. Карабанов А.В. Гепатолентикулярная дегенерация в России: поиск и анализ мутаций в гене АТР7В и характеристика их клинических проявлений: автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. – М., 2000. – 28 с.

4. Карнаус А.С., Магжанова А.Р., Магжанов Р.В., Гайсина Е.В., Мурзабаева С.Ш., Хуснутдинова Э.К. Молекулярно-генетическое исследование болезни Вильсона в Республике Башкортостан // Медицинская генетика. – 2009. – № 8. – С. 41-48.

5. Коновалов Н.В. Гепатоцеребральная дистрофия. – Л.: Медицина, 1960. – 458 с.

6. Лекарь П.Г., Макарова В.А. Гепатоцеребральная дистрофия. – Л.: Медицина, 1984. – 206 с.

7. Bie P., Muller P., Wijmenga C., Klomp L.W.J. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes // J Med. Genet. – 2007. – Vol. 44. – P. 673-688.

8. Brewer G.J., Yuzbasiyan-Gurcan V. Wilson disease // Medicine. – 1992. – Vol. 71. – № 3. – P. 139-164.

9. Bull P.C., Thomas G.R., Rommens J.M. et al. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene // Nat. Genet. 1993. – Vol. 5. – P. 327-337.

10. Cox D.W. Genes of the copper pathway // Am. J. Hum Genet. – 1995. – Vol. 56. – P. 828-834.

11. Gollan J.L., Gollan T.J. Wilson disease in 1998: genetic, diagnostic and therapeutic aspects // J Hepatol. – 1998. – Vol. 28. – P. 28-36.

12. Kenney S.M., Cox D. Sequence Variation Database for the Wilson Disease Copper Transporter // Human Mutation. – 2007. – Vol. 28, № 12. – P. 1171-1177.

13. Petrukhin K., Lutsenko S., Chernov I., Ross B.M., Kaplan J.H., Gilliam T.C. Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure function predictions // Hum. Molec. Genet. – 1994. – Vol. 3. – P. 1647-1656.

14. Petrukhin K., Speer M., Cayanis E., Bonaldo M., Tantravahi U., Soares M., Fischer S., Warburton D., Gilliam T., Ott J. A microsatellite Genetic Linkage Map of Human Chromosome 13 // Genomics. – 1993. – Vol. 15. – P. 76-85.

15. Roberts E.A., Schilsky M.L. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update // Hepatology. – 2008. – Vol. 47. – P. 2089-2111.

Literature

1. Vyalova N.V., Proskokova T.N., Khelimsky A.M. Hepatolenticular degeneration: clinic, diagnostics, and treatment // Far Eastern Medical J. – 2012. – Vol. 4. – P. 130-134.

2. Dubovic S.V., Gusina N.B. Frequency of Wilson's disease in the population of Belarus // J. Med. Genet. – 2010. – Vol. 11. – P. 27-33.

3. Karabanov A.V. Hepatolenticular degeneration in Russia: Analysis of mutations in ATP7B gene and the characteristics of clinical aspects thereof: author's abstract – M., 2000. – 28 p.

4. Karnaus A.S., Magzhanova A.R., Magzhanov R.V., Gaisina E.V., Murzabaeva S.Sh., Khusnutdinova E.K. Мо-

lecular-genetic study of Wilson's disease in Bashkortostan // J. Med. Genet. 2009. – Vol. 8. – P. 41-48.

5. Konovalov N. V. Hepatocerebral dystrophy. – L.: Medicine, 1960. – 555 p.

6. Lekar P.G., Makarova V.A. Hepatocerebral dystrophy. – L.: Medicine, 1984. – 206 p.

7. Bie P., Muller P., Wijmenga C., Klomp L.W.J. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes // J Med. Genet. – 2007. – Vol. 44. – P. 673-688.

8. Brewer G.J., Yuzbasiyan-Gurcan V. Wilson // Medicine. – 1992. – Vol. 71. – № 3. – P. 139-164.

9. Bull P.C., Thomas G.R., Rommens J.M., et al. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkens gene // Nat. Genet. 1993. – Vol. 5. – P. 327-337.
10. Cox D.W. Genes of the copper pathway // Am. J. Hum Genet. – 1995. – Vol. 56. – P. 828-834.
11. Gollan J.L., Gollan T.J. Wilson disease in 1998: genetic, diagnostic and therapeutic aspects // J Hepatol. – 1998. – Vol. 28. – P. 28-36.
12. Kenney S.M., Cox D. Sequence Variation Database for the Wilson Disease Copper Transporter // Human Mutation. – 2007. – Vol. 28, № 12. – P. 1171-1177.
13. Petrukhin K., Lutsenko S., Chernov I., Ross B.M., Kaplan J.H., Gilliam T.C. Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure function predictions // Hum. Molec. Genet. – 1994. – Vol. 3. – P. 1647-1656.
14. Petrukhin K., Speer M., Cayanis E., Bonaldo M., Tantravahi U., Soares M., Fischer S., Warburton D., Gilliam T., Ott J. A microsatellite Genetic Linkage Map of Human Chromosome 13 // Genomics. – 1993. – Vol. 15. – P. 76-85.
15. Roberts E.A., Schilsky M.L. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update // Hepatology. – 2008. – Vol. 47. – P. 2089-2111.

Координаты для связи с авторами: Вялова Надежда Викторовна – ассистент кафедры неврологии и нейрохирургии ДВГМУ, тел. +7-962-584-58-96, e-mail: nvjalova@gmail.com; Проскокова Татьяна Николаевна – профессор кафедры неврологии и нейрохирургии ДВГМУ, тел. +7-909-844-99-96, e-mail: Proskokova2011@yandex.ru; Хелимский Александр Маркович – профессор, заведующий кафедрой неврологии и нейрохирургии ДВГМУ; тел. +7-914-771-76-66, e-mail: akhelim@gmail.com; Тен Нелли Николаевна – кафедра неврологии и нейрохирургии ДВГМУ; Нам Светлана Ивановна – кафедра неврологии и нейрохирургии ДВГМУ; Баязутдинова Гульнара Маратовна – научный сотрудник ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», тел. 8-(495)-221-90-84, e-mail: info@dnalab.ru.



УДК 616.831-073.753.52

С.Е. Гуляева¹, А.А. Овчинникова¹, С.А. Гуляев², А.А. Юрченко¹, А.В. Овчинников³

О ЗНАЧЕНИИ ЭЭГ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЭПИЛЕПСИИ С ВЕГЕТАТИВНО-СОСУДИСТЫМИ ПАРОКСИЗМАМИ (КЛИНИКО-ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАФИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ)

¹Тихоокеанский государственный медицинский университет, 690950, пр. Острякова, 2, г. Владивосток;

²Институт детской неврологии и эпилептологии им. святителя Луки (Войно-Ясенецкого), 109156, Борисовские Пруды, 13, корп. 2, г. Москва;

³КГБУЗ «ВКБ № 1», 690078, ул. Садовая, 22, тел. 8-(423)-245-26-82, г. Владивосток

Резюме

Представлен анализ 19 ЭЭГ-исследований с видеонаблюдением у трех пациентов с пароксизмальными состояниями, основу которых составляли вегетативные дисфункции. Установлена отличительная особенность таких кривых ЭЭГ – возникновение пароксизмов билатерально-синхронных высокоамплитудных медленных волн (тэта-и дельта-диапазона) с максимальным достижением амплитуды в лобно-теменных отведениях обоих полушарий. Провокатором появления такой пароксизмальной активности всегда оказывалась гипервентиляция. Они не отличались стойкостью и исчезали по мере снижения гипервентиляционной нагрузки.

Отсутствие соответствия формы и характера пароксизмальных проявлений паттернам эпилептиформного вида, их особая зависимость от гипервентиляционной нагрузки, усиливающей гипоксию мозговых структур и провоцирующую срыв регуляторных механизмов надсегментарных вегетативных центров, позволяет предположить в описанных пароксизмальных проявлениях не эпилептиформные паттерны, а отражение ирритации глубинных срединных структур головного мозга и потери ими регуляторных функций.

Ключевые слова: эпилепсия, электроэнцефалография, пароксизмальная активность.