

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ У БОЛЬНЫХ ПБ С АМИЛОИДОЗОМ ПОЧЕК

А.С.Айрапетян, Е.О.Мнджоян, З.Р.Оганесян, Д.Т.Бабикиан,
М.М.Папазян, А.А.Саркисян, А.С.Баблоян, Т.Ф.Саркисян

*Центр медицинской генетики НАН РА
375010, Ереван, ул. Закияна, 5/1*

Ключевые слова: периодическая болезнь, амилоидоз почек, генные мутации, генотип, фенотип

Впервые проведено исследование по определению спектра мутаций разных генных локусов, связанных с развитием амилоидоза почек (АП) у больных периодической болезнью (ПБ). В наших публикациях по генотипированию мутаций гена MEFV, картированного в области 16p13.3 [9], показана корреляция между их спектром и тяжестью протекания заболевания, что создает широкие возможности для ранней диагностики и профилактики ПБ [8].

Помимо гена MEFV, имеется предположение об ассоциации с этиопатогенезом ПБ мутаций генов синтеза сывороточного амилоида А (SAA) и Р (APCS) [11,12]. Амилоидные белки А1 (локус SAA1) и А2 (локус SAA2), образующиеся в процессе протеолитического расщепления, являются основными компонентами отлагающегося амилоида А, характерного для вторичных амилоидозов [9,10]. Фибриллы амилоида А в клетках больных ПБ впервые были обнаружены в 1972 г. Количество его предшественника, SAA, реактанта острой стадии и медиатора воспаления, повышается как во время, так и в перерывах между приступами [1,5]. Семейство генов, кодирующих SAA, картировано на коротком плече хромосомы 11p (90 кб), мутации которых, по данным Sack и соавт. [9], являются основным генетическим дефектом, приводящим к развитию ПБ [10]. Структурные изменения высоко консервативного семейства генов SAA у четырех больных ПБ, но не выявленные у 20 здоровых лиц, объясняются "необычным" полиморфизмом. Предположительна и роль аллеля аполипопротеина Eε4 (локус APOEε4), являющегося фактором риска для семейных поздно начинающихся и спорадических форм болезни Альцгеймера, характеризующейся отложениями в мозгу α-амилоидного белка [8].

Изучены мутации генов MEFV, SAA1, SAA2 и APOE у 137 больных ПБ с АП, которые являлись членами 127 независимых семей.

Материал и методы

Скринирование генов проведено у 85 больных ПБ с АП и 30 больных ПБ старше 40 лет, которые не получали колхицинотерапию и у которых не развился АП.

Клинические симптомы заболевания (АП, артрит, лихорадка, перитонит, плеврит, рожистое воспаление кожи, диарея) до проведения лечения колхицином отмечали в специально разработанных анкетах, применяемых в клиниках Франции и США.

Геномную ДНК выделяли из периферической крови по стандартной методике. ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в стандартных условиях с соответствующими праймерами. Полученные продукты ПЦР обрабатывали рестрикционными ферментами, после чего их подвергали электрофорезу в агарозном или полиакриламидном геле. Условия проведения ПЦР и рестрикционного анализа определяли с помощью компьютерных программ MEET87 и SQNTX.

Результаты и обсуждение

Молекулярно-генетический анализ мутаций гена MEFV. Исследование выполнено у 85 больных ПБ с разными стадиями АП, разделенных по следующим клиническим критериям:

1. Наличие протеинурии, т.е. белка в суточной моче в количестве 150 мг/сут до появления нефротического синдрома (32 больных, 37.6%).
2. Наличие нефротического синдрома (29 больных, 34.2%).
3. Наличие хронической почечной недостаточности (24 больных, 28.2%).

Ген MEFV, мутации которого являются причиной ПБ, впервые идентифицировали в 1997 г. [6,7]. В том же году мы применили методы детекции мутаций MEFV с модификациями проф. S.Amselem (Paris) у больных армян с клинически установленным диагнозом ПБ. Наиболее четкая корреляция между генотипом и фенотипом показана при наличии следующих мутаций: M694V, V726A, M680I, R761H (10 экзон); E148Q (2 экзон); F479L (5 экзон). 94% больных оказались носителями мутаций, из которых у 91% обнаружено два мутантных аллеля. Сложная молекулярная структура гена значительно затрудняет поиск мутаций в кодирующей части гена. Тем не менее, скрининг указанных мутаций позволил оценить их диагностическую значимость. Среди 10 больных с АП у всех был выявлен гомозиготный генотип по мутации M694V. Результаты представлены в табл. 1.

Мутации в разных экзонах гена MEFV обладают различной клинической экспрессией, что свидетельствует о гетерогенности его аллелей. Во время приступов происходит приток гнойных асептических экссудатов, обогащенных нейтрофилами, в область воспаления; очевидно, экспрессия мутантных аллелей приводит к нарушению контроля процесса воспаления, опосредованного гранулоцитами [3,4].

Взаимосвязь развития АП при генотипировании локуса MEFV

ГЕНОТИП	СОТНОШЕНИЕ БОЛЬНЫХ С АП/БЕЗ АП
M694V/M694V	10/10
M694V/V726A	1/8
M694V/M680I	2/4
V726A/M680I	2/3
V726A/V726A	1/3
M680I/R761H	0/1
M694V/N	0/2
M680I/N	0/1
E148Q-P369S-R408Q/N	0/1
Общес соотношение	16/33

Среди больных с АП обнаружен наиболее характерный гомозиготный генотип по мутации M694V (22,2%, $P < 0.01$). У гомозигот по мутации M694V чаще наблюдается артрит (56,3%, $P < 0.01$) по сравнению с больными с другими генотипами. Данное различие является достоверным при сравнении гомозигот по M694V с компаунд гетерозиготами по наиболее часто встречающимся мутациям среди армян M694V/V726A и M694V/M680I ($P < 0.01$). Количественные характеристики спектра мутаций гена MEFV с разными проявлениями АП у обследованных больных представлены в табл. 2.

Соотношение частот генотипов с проявлением АП

Генотип	Общее число б-х сАП	Пр	НС	ХПН
M694V\M694V	30(44%)	9(30%)	15(50%)	6(20%)
M694V\V726M	14(20.5%)	9(64%)	4(29%)	1(7%)
M694V\M680I	14(20.5%)	8(57%)	5(36%)	1(7%)
M694V\R761H	4(6%)	1(25%)	3(75%)	-
M680I\V726A	2(3%)	2	-	-
M680I\M680I	1(1.5%)	1	-	-
M680I\M694V	1(1.5%)	1	-	-
M680I\M694I	1(1.5%)	1	-	-
V726A\M680I	1(1.5%)	1	-	-

Примечание. Здесь и в табл. 3 приняты сокращения:

Пр - протеинурия;

НС - нефротический синдром;

ХПН - хроническая почечная недостаточность.

Статистически достоверное преобладание аллеля M694V по сравнению с другими мутантными аллелями гена MEFV ($P=0.006$) представлено в табл. 3.

Таблица 3

Аллель	Число б-х	Пр	НС	ХПН
M694V/-	93	37	42	14
V726A/-	17	12	4	1
M680I/-	21	14	6	1
R761H/-	4	1	3	-
M694I/-	1	-	1	-

Полученные результаты свидетельствуют о важном прогностическом значении анализа мутаций гена MEFV для развития АП. Анализ мутаций гена MEFV в генетической консультации позволит идентифицировать больных до начала приступов и рекомендовать

прием колхицина, пока единственного известного эффективного средства. Генотипирование мутаций данного гена создает перспективу для выявления бессимптомных носителей двух мутаций M694V, приводящих к развитию АП.

Молекулярно-генетический анализ мутаций генов SAA1, SAA2, APOE у больных ПБ с АП. Молекулярный анализ проведен у 137 больных ПБ, разделенных на две группы: 1– 47 больных ПБ с АП; 2–90 больных ПБ без АП. Средний возраст больных первой и второй групп составил 27.4 ± 13.5 и 27.8 ± 16.2 лет соответственно ($P=0.806$).

Сравнительный анализ скринирования мутаций локусов MEFV, SAA1, SAA2, APOE проведен с учетом половых различий, продолжительности заболевания и возраста начала заболевания. Приводятся результаты исследования гена SAA в связи с его генетически опосредованной ролью в стимуляции приступов ПБ и развития АП. В табл. 4 приведены данные взаимосвязи между генотипами и частотой встречаемости АП у больных ПБ.

Таблица 4

Генотипы больных по локусам MEFV, SAA1, SAA2 и APOE в зависимости от наличия или отсутствия АП

Больные ПБ	Число больных (%) с генотипом							
	MEFV		SAA1		SAA2		APOE	
	M694V/ M694V	другие генотипы	α/α	другие генотипы	α/α	другие генотипы	$\epsilon 3/\epsilon 4$	другие геноти- пы
с АП	24 (51.1)	23 (48.9)	22 (46.8)	25 (53.2)	35 (74.5)	12 (25.5)	5 (10.6)	42 (89.4)
без АП	17 (18.9)	73 (81.1)	15 (16.7)	75 (83.3)	56 (62.2)	34 (37.8)	13 (14.4)	77 (85.6)
P	<0,0001		<0,0002		<0,150		=0,530	

Данные табл. 4 свидетельствуют:

1. MEFV. Частота гомозигот по мутации M694V в группе больных с АП (51.1%) была достоверно выше в сравнении с группой без АП. В отличие от данных результатов, между обеими группами не выявлены различия по остальным распространенным генотипам MEFV: M694V/V726A; M694V/M680I; M680I/V726A.

2. SAA1. Частота АП достоверно выше при наличии гомозиготного генотипа SAA1 α/α в сравнении с другими сочетаниями аллеля SAA1. Очевидно, развитие АП достоверно связано с гомозиготным генотипом M694V в сочетании с SAA1 α/α (11/11). В отличие от данного спектра мутаций при наличии одной аллели SAA1 α или без нее у больных ПБ частота возникновения АП статистически не различается:

	SAA1 α +	SAA1 α -
У гомозигот по мутации M694V:	43.7%	42.9%
Другие генотипы:	18.9%	15.2%

3. SAA2. Частота возникновения АП статистически не различается между больными с гомозиготным генотипом по мутации SAA2 α/α в сравнении с другими сочетаниями мутаций SAA2.

Аналогичные результаты получены при сравнении в сочетании генотипов MEFV и SAA2:

	SAA2 +	SAA2 -
У гомозигот по мутации M694V:	66.7%	42.9%
Другие генотипы:	26.7%	18.7%

4. APOE ϵ 4. При исследовании трех аллелей гена APOE не выявлены различия между частотой АП в группах больных с одной аллелью APOE ϵ 4 и другими генотипами APOE4. Аналогичные результаты были получены при сопоставлении данных генотипов со спектрами мутаций гена MEFV:

	APOE ϵ 4+	APOE+
У гомозигот по мутации M694V:	57.1%	58.8%
Другие генотипы:	10.0%	25.9%

Анализ полученных результатов позволил определить закономерности, связанные с возрастом начала заболевания, его продолжительностью и развитием АП (табл. 5). Продолжительность течения ПБ аналогична в группах больных ПБ с АП и без него. Однако у больных ПБ с АП отмечен более ранний возраст начала заболевания в сравнении с больными ПБ без данного осложнения. Несомненно, существует несбалансированное распределение генотипов MEFV между двумя группами.

Таблица 5

Клинические признаки больных в зависимости от наличия или отсутствия АП

Больные	Муж.	Жен.	Начало заболевания (средний возраст)	Длительность за- болевания
с АП n=44	35(74.5)	12(25.5)	9.1 \pm 10.5	18.7 \pm 10.3
без АП n=85	45(50.0)	45(50.0)	12.1 \pm 10.5	16.3 \pm 12.8
P	=0,006		=0,022	=0,142

Таким образом, выявлена достоверная связь между генотипом SAA1 и риском развития почечного амилоидоза у больных ПБ. По сравнению с другими компаунд гетерозиготными генотипами при наличии гена SAA1 в разных сочетаниях гомозиготный генотип SAA1 α/α достоверно ассоциирован с повышенным риском АП, что свидетельствует о значительной роли локуса SAA1 в развитии почечного амилоидоза.

Сходные результаты получены для больных кавказского происхождения с ревматическими или хроническими артритами, страдающих двумя немэнделирующими заболеваниями неизвестной этиологии, которые по своей симптоматике являются хроническими воспалительными синдромами: в случае этих заболеваний риск развития вторичного амилоидоза намного выше у больных с гомозиготным генотипом SAA1 α/α , чем у больных, обладающих другим генотипом SAA1 [2].

Согласно нашим данным, наличие одной аллели SAA1 α в гетерозиготном состоянии не сопровождается развитием АП: вероятно, предрасположенность больных ПБ к развитию амилоидоза, связанного с аллелью SAA1 α , может рассматриваться как рецессивный признак.

Можно заключить, что в результате исследования двух разных генных локусов, мутации которых ассоциированы с развитием АП, выявлены важные закономерности. Несомненно, АП ассоциирован с наличием гомозиготного генотипа SAA1 α/α у лиц, одновременно являющихся гомозиготами по мутации M694V гена MEFV.

Поступила 27.09.01

ԳԵՆԱՅԻՆ ՄՈՒՏԱՑԻԱՆԵՐԻ ԿՈՐԵԼՅԱՑԻԱՆ ԵՐԻՎԱՍՆԵՐԻ
ԱՍԻԼՈՒՐՈՉԻ ՉԱՐԳԱՑՄԱՆ ՀԵՏ ՊԱՐԲԵՐԱԿԱՆ
ՀԻՎԱՆԳՈՒԹՅԱՄԲ ՏԱՌԱՊՈՂ ԱՆՁԱՆՑ ՄՈՏ

Հ.Ս. Հայրապետյան, Ե.Օ. Մնցոյան, Չ.Ռ. Հովհաննիսյան, Դ.Թ. Բաքիլյան, Մ.Ս. Փափապյան,
Ա.Սարգսյան, Ա.Ա.Բաբլոյան, Թ.Ֆ.Սարգսյան

Պարբերական հիվանդությունը ռեյեսիվ ճանապարհով ժառանգվող հիվանդություն է, որն ասոցացված է MEFV գենի մուտացիաների և երիկամային ամիլոիդոզի գենետիկական նախահավածության հետ: Շրջանցելու համար այս հիվանդության մեջ պատասխանատու մոդիֆիկացնող գործոնների քայահայտման ժամանակ առաջ եկող դժվարությունները, մեր կողմից ուսումնասիրվեցին Հայաստանում բնակվող և միմյանց հետ ազգակցական կապ չունեցող 127 ընտանիքների 137 հիվանդներ: Որպես երիկամային ամիլոիդոզի վարձայման գործընթացում հավանական մոդիֆիկատորներ ընտրվել են հիվանդների սեռը և SAA1, SAA2, APOE գեները, որոնք համապատասխանաբար կոդավորում են շիճուկային ամիլոիդ սպիտակուցները և E-ապոլիպոսպիտակուցը: Stepwise logistic-regression վերլուծությամբ ցույց տրվեց, որ SAA1 α/α գենոտիպը 7 անգամ բարձրացնում է երիկամային ամիլոիդոզի վարձայման ռիսկը՝ համեմատած այլ SAA1 գենոտիպերի հետ: Այս կապը, որն առկա էր անկախ MEFV գենոտիպից, հատկապես արտահայտված է M694V հոմոպլիգոտ գենոտիպով հիվանդների մոտ: Միաժամանակ արական սեռի հիվանդների մոտ երիկամային ամիլոիդոզի վարձայման ռիսկը 4 անգամ ավելի բարձր է, քան իգական սեռի հիվանդների մոտ: Հավանաբար SAA2, APOE գենների պոլիմորֆիզմները չեն ազդում երիկամային ամիլոիդոզի

վարճայան վրա: Մենդելյան այս հիվանդությունը պայմանավորված է MEFV-ից անկախ, գենետիկական բնույթի առնվազն 2 գործոններով՝ SAA1 գենով և սեռով, որոնք գործում են միմյանցից անկախ:

CORRELATION OF GENE MUTATIONS WITH RENAL AMYLOIDOSIS IN PATIENTS WITH FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER

H.S.Hayrapetyan, E.O.Mnjoyan, Z.R.Hovanesyan, D.T.Babikyan, M.M.Papazyan, A.A.Sarkissian, A.S.Babloyan, T.F.Sarkisian

Familial Mediterranean fever (FMF) is a recessively inherited disorder predisposing to renal amyloidosis and associated with mutations in MEFV, a gene encoding a protein of unknown function. To overcome the well-known difficulties in the identification of modifying genetic factors, we investigated a relatively homogeneous population of 137 Armenian patients with FMF from 127 independent families living in Armenia. We selected the SAA1, SAA2 and APOE genes, encoding serum amyloid proteins and apolipoprotein E, respectively, as well as the patients' sex, as candidate modifiers for renal amyloidosis. A logistic-regression analysis showed that the SAA1 *a/a* genotype was associated with a sevenfold increased risk for renal amyloidosis, compared with other SAA1 genotypes. This association, independent of the presence of the MEFV genotype, was especially marked in patients homozygous for M694V. The risk for male patients of developing renal amyloidosis was fourfold higher than that for female ones. Polymorphisms in the SAA2 or APOE gene did not appear to influence susceptibility to renal amyloidosis. Mendelian disorder is influenced by at least two MEFV-independent factors of genetic origin- SAA1 and sex that act independently from each other.

ЛИТЕРАТУРА

1. Benson M.D., Skinner M., Cohn A.S. Ann.Intern.Med., 1977, 87:31.
2. Booth D.R., Gillmore J.D. et al. QJM, 1998,91:603.
3. Cazeneuve C., Sarkisian T., Ajrapetyan H., Amselem S. et al. Am.J.Hum.Genet., 1999, 65:88.
4. Cazeneuve C., Sarkisian T., Ajrapetyan H., Babloyan A. et al. Am.J.Hum.Genet., 2000, 67:1136.
5. Husby G., Natvig J. Clin. J.Invest., 1974, 53:1054.
6. The French FMF Consortium, Nat.Genet, 1997,17:25.
7. The International FMF Consortium, Cell, 1997,90:797.
8. Lepnieks J., Kluve-Beckerman B., Benson M. Biochim. Biophys. Acta, 1995,1270:81.
9. Sack G., Talbot J.R., Seuanez J.R., O'Brien S.J. Scand.Immunol., 1988, 29:731.
10. Saunders A., Strittmatter W., Schmechel D. et al. Neurology, 1993,43:1467.
11. Shohat M., Livneh A., Zimer D. et al. Am.J.Med.Gen., 1992, 44:168.
12. Shohat M., Shohat T., Rotter J. et al.Genomics, 1990,8:83.