

Асоціація генотипу і клінічних проявів найпоширеніших моногенних спадкових захворювань

Л. А. Лівшиць, Г. М. Бичкова¹, М. В. Нечипоренко, О. Ю. Екшиян, Н. В. Грищенко, С. Г. Малярчук, В. М. Пампуха, С. А. Кравченко, Н. О. Афанасьєва², Н. А. Пічкур², Г. В. Скибан¹

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

¹ Український науковий центр радіаційної медицини АМН України
Вул. Мельникова, 53, Київ, 04050, Україна

² Кримський медико-генетичний центр
Вул. Титова, 77, Сімферополь, 95000, Україна

Проведено аналіз асоціації генотипу і фенотипу у хворих на муковісцидоз (МВ), фенілкетонурию (ФКУ), спінальну м'язову атрофію (СМА) та синдром Мартіна-Белла (СМБ) з України. Отримано дані про кореляцію певних мутацій генів ТРБМ, ФАГ, SMN і FMR-1 з деякими проявами фенотипу. Обговорюється роль інших генівмодифікаторів, причетних до патогенезу МВ, ФКУ, СМА та СМБ. На основі одержаних даних зроблено припущення про те, що ген HFE-1 може бути модифікуючим фактором клінічного фенотипу у хворих на МВ.

Вступ. Закінчення роботи над проектом «Геном людини» ознаменувалося розшифровкою всієї нуклеотидної послідовності ядерної та мітохондріальної ДНК людини [1]. Завдяки цим дослідженням з'ясувалося, що геном людини складається з 3,5 млрд нуклеотидів, причому лише 1,5 % геному являє собою суто кодуючу частину, а 50 % його — це вірусні послідовності. Шляхом генетичного картування було встановлено точну локалізацію відкритих 35000 структурних генів на хромосомах. Охарактеризовано 1,5 млн ДНК-поліморфізмів (мутацій). У функціональному плані відкрито гени (кластери генів) спадкових хвороб, схильності до певних мультифакторіальних захворювань, чутливості до ліків, продуктів харчування і факторів екологічного забруднення, гени поведінки, інтелекту, довголіття тощо.

Паралельно з основною програмою «Геном людини» вивчалися розповсюдження і фенотипічні

ефекти найпоширеніших мутацій. Вже до 2000 року було відкрито близько 1000 генів, мутації в яких призводять до розвитку різних спадкових захворювань [1]. Завдяки дослідженням послідовності ДНК генів спадкових захворювань у хворих з різних країн світу (у тому числі з України) з'ясувалося, що сотні різних мутацій, розташованих в окремих ділянках одного гена, спричиняють одне і те ж захворювання. Ці дослідження вже більш ніж 15 років здійснюються науковими співробітниками відділу геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України [2].

Дослідження спектра мутацій має дуже важливе значення для з'ясування первинних основ патогенезу та явища клінічної гетерогенності в межах однієї нозологічної форми. Генотип і фенотип є найвіддаленішими категоріями, які використовують при аналізі етапів патогенезу спадкових захворювань моногенної природи. Генотип як одна з першопричин патогенезу являє собою «стартовий пункт» при описі захворювання, представлений мутаціями, що спричиняють хворобу і містяться на

© Л. А. ЛІВШИЦЬ, Г. М. БИЧКОВА, М. В. НЕЧИПОРЕНКО, О. Ю. ЕКШИЯН, Н. В. ГРИЩЕНКО, С. Г. МАЛЯРЧУК, В. М. ПАМПУХА, С. А. КРАВЧЕНКО, Н. О. АФАНАСЬЄВА, Н. А. ПІЧКУР, Г. В. СКИБАН

двох окремих (у випадку аутомно-рецесивних захворювань) або одному (в разі Х-, Y-зчеплених, або аутосомно-домінантних) алелях. У свою чергу фенотип, з точки зору клінічної картини захворювання, визначають за проявом якісних та кількісних ознак, які можна описати і виміряти в ході спостереження за пацієнтом. Основними показниками фенотипу є специфічність клінічних проявів і симптомів, тяжкість та вікові особливості перебігу. Аналіз взаємозв'язку генотипу і фенотипу виявляє кореляцію між конкретним генотипом та клінічними проявами захворювання у пацієнтів. Такий аналіз є дуже важливим з точки зору як дослідження механізмів розвитку захворювання в цілому і його різних клінічних проявів зокрема, так і пошуку найкращої стратегії медичної допомоги хворому та його родині.

Метою цієї роботи було вивчення варіювання основних клінічних характеристик у хворих з різними мутантними генотипами та виявлення закономірності асоціації різних типів мутацій з основними параметрами клінічного фенотипу — віком маніфестації, перебігом, розмахом патологічних змін на рівні органів і систем. Дослідження проводили у хворих з такими поширеними моногенними захворюваннями, як муковісцидоз (МВ), спінальна м'язова атрофія (СМА), фенілкетонурія (ФКУ) та синдром Мартіна-Белла (СМБ, синдром Х-ламкої хромосоми).

Матеріали і методи. Матеріалом для молекулярно-генетичного дослідження були зразки крові хворих та їхніх родичів з родин високого ризику захворювання на МВ, СМА, синдром Мартіна-Белла, ФКУ з різних регіонів України. Для вивчення асоціації генотипу з клінічними проявами фенотипу нами було розроблено та розіслано спеціальну анкету, в якій клініцистів просили вказати основні клінічні та біохімічні параметри хворих.

Зразки крові та результати клініко-генеалогічного обстеження були надані Інститутом педіатрії, акушерства і гінекології (ПАГ) АМН України, Українським науковим центром медичної генетики АМН України та іншими медико-генетичними установами України.

Для аналізу окремих ділянок досліджуваних генів ТРБМ, ФАГ, SMN, FMR-1 використовували такі методи: виділення і очищення ДНК з біологічних зразків [3]; блот-гібридизацію за Саузерном [3,4]; ампліфікацію *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [5]; рестрикційний аналіз; аналіз гетеродуплексів; гель-електрофорез в агарозному та поліакриламідному гелях [4]; градієнтний гель-електрофорез у денатуруючих умовах [6]; капілярне секвенування [7].

Результати і обговорення. Аналіз асоціації генотипу та фенотипу у хворих на муковісцидоз. У групі хворих на МВ досліджували такі мутації гена трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу (ТРБМ): delF508, dell 507, 1677delTA, R117H, 621+1G-T, R347P, R334W, 1154insTC, 1717-1GaA, S549I, R553X, G551D, G542X, N1303K, W1282X, CFTRdele2,3(21kB) [8]. Аналіз клінічних характеристик проведено для 135 хворих на МВ з різними мутантними генотипами. Оскільки делеція delF508 входить до складу більшості генотипів хворих з України, найінформативнішим був аналіз асоціації цієї мутації з клінічними проявами МВ. Отримані дані свідчать (табл. 1) про те, що переважна більшість (86,4 %) хворих гомозигот за delF508 мали тяжкий перебіг захворювання.

Така ж закономірність спостерігалася у хворих з delF508 у компаунді з іншими мутаціями. У хворих же з мутаціями, відмінними від delF508, подібні клінічні ознаки зустрілися лише у 56,8 % (статистично вірогідно рідше, ніж в двох інших групах). Змішану форму захворювання — патологію кишково-шлункового тракту в поєднанні з бронхо-легеневою патологією виявлено у 90,9 % хворих гомозигот за delF508. Подібну клінічну картину спостерігали і у хворих з генотипом delF508 у компаунді з іншими мутаціями (80,8 % хворих). Більшість (91,5 %) хворих з цієї групи страждала від недостатності функції підшлункової залози. Цю клінічну ознаку статистично вірогідно рідше фіксували у хворих з генотипом, до якого не входила delF508 ($p < 0,05$). У 43,9 % хворих, у генотипі яких є delF508, зафіксовано найвищі показники вмісту хлоридів у потовій рідині (більш ніж 100 ммекв/л). Статистично вірогідно менше було хворих (25,3 %) з такими показниками та з відсутністю delF508.

Отримані нами результати свідчать про провідну роль мутації delF508 у патогенезі недостатності підшлункової залози. Особливо наочно це спостерігали у гомозигот за delF508 та у хворих з генотипами delF508 у компаунді з мутаціями CFTRdele2,3(21kB), N1303K, 1677delTA і G542X, delF508. У хворих, до генотипу яких входили мутації R334W, W1282X і 1717-1G-A, відзначено м'який перебіг захворювання, оскільки, як передбачається, саме ці мутації менше ушкоджують функції білка ТРБМ [9]. У групі хворих з мутаціями CFTRdele2,3(21kB), N1303K і G542X, а також G551D у компаунді з відмінними від delF508 мутаціями відмічено порушення функції підшлункової залози і дуже високий вміст хлоридів у потовій рідині (100 ммекв/л). Можна зробити висновок, що ці мутації тісно асоційовані з екзокрин-

Таблиця 1
Клінічні прояви муковісцидозу у хворих з різними генотипами

Характеристика клінічного фенотипу	Генотип хворих		
	FF, n = 44 (%)	FX, n = 47 (%)	XX, n = 44 (%)
Перебіг захворювання			
тяжкий	38 (86,4)	40 (85,1)	25 (56,8)
відносно легкий	6 (13,6)	7 (14,9)	19 (43,2)**
Клінічна форма			
змішана	40 (90,9)	38 (80,8)	31 (70,5)
легенева	2 (4,6)	4 (8,5)	8 (18,2)
кишкова	2 (4,6)	5 (10,7)	5 (11,4)*
Маніфестація перших проявів			
протягом 1-го року життя	38 (86,4)	39 (82,9)	2 (4,5)
у віці 1—3 років	6 (13,6)	6 (12,8)	28 (63,6)
після 3 років	0	2 (4,3)	14 (31,9)***
Вміст хлоридів у потовій рідині, ммекв/л			
< 60	9 (20,4)	9 (19,1)	5 (11,4)
60—100	13 (29,6)	20 (42,5)	28 (63,6)
> 100	22 (50)	18 (38,4)	11 (25,3)**

Примітка. F — мутація delF508; X — мутації гена TRBM, відмінні від delF508; n — кількість хворих; *p < 0,05 — статистично вірогідна відмінність від групи хворих з генотипом FF; **p < 0,005 — від груп хворих з генотипами FF та FX; ***p < 0,001 — від груп хворих з генотипами FF та FX.

ною дисфункцією підшлункової залози. Іншим характерним проявом МВ є патологія бронхо-легеневої системи. Прояви цієї патології спостерігали в малочисельній групі хворих з легеневою формою (10,3 %). Більшість цієї групи (57,1 %) були носіями мутацій, відмінних від delF508. У багатьох із них також виявлено (як супутні і неспецифічні) прояви патології системи травлення. Тобто легенева форма у деяких хворих з мутаційним генотипом із легкими мутаціями гена TRBM може бути лише початковою стадією змішаної форми. Асоціація мутацій гена TRBM з патологією бронхо-легеневої системи є досить слабкою. Це підтверджують і результати обстеження нечисленної групи хворих (12 осіб), які не мали жодних проявів патології легеневої системи (більш ніж половина хворих цієї групи мала мутацію delF508).

Таким чином, можна зробити висновок про безпосередній зв'язок, що існує між мутаціями гена TRBM та патологією органів травлення. Зважаючи на інфекційну природу запальних процесів бронхо-легеневої системи, можна очікувати, що ця патологія лише частково обумовлена мутаціями гена TRBM. До певної міри бронхо-легеневу патологію можуть модифікувати як генетично обумовлена чутливість (або стійкість) до інфікування, так

і екзогенні фактори. Варіювання клінічних проявів у хворих з однаковими мутаціями гена TRBM навели на думку про існування інших генетичних факторів, які можуть виступати як модифікатори фенотипу у хворих на МВ з порушеннями функцій органів травлення.

Ми припустили, що ген, відповідальний за розвиток спадкового гемохроматозу (ген HFE-1) [10], може бути геном-модифікатором клінічного фенотипу при муковісцидозі. Ця гіпотеза ґрунтується на таких фактах:

— ген HFE-1 локалізований у тій самій хромосомній ділянці, що й гени системи HLA, для яких встановлено асоціацію з клінічними проявами муковісцидозу;

— існує подібність між проявами шлунково-кишкової патології у хворих на спадковий гемохроматоз та у хворих на МВ.

Аналогічні припущення висловлено і в роботах інших авторів [11]. Для перевірки цієї гіпотези нами досліджено можливу асоціацію мутацій C28a2Y і H63D гена HFE-1 зі ступенем важкості патології органів травлення у хворих на МВ. Аналіз цих мутацій проводили для 35 хворих на муковісцидоз та 97 донорів з контрольної групи [12]. Важливо зазначити, що більшість хворих на му-

Таблиця 2

Аналіз мутацій гена *HFE-1* у хворих на муковісцидоз (МВ) з панкреатитами та/бо порушеннями функції печінки

Мутація	Хворі на МВ (n = 35), %	Контрольна популяція (n = 97), %	Fisher exact test, p
C28a2Y	2,9	2	0,31
H63D	30	17	0,01

ковісцидоз мали тяжкі ураження шлунково-кишкового тракту та/або печінки. Також важливо підкреслити, що група хворих була достатньо гомогенною за мутантним генотипом гена *TRPM*: 65,7 % цих хворих мали в своєму генотипі мутацію *delF508* гена *TRPM* у гетерозиготному чи гомозиготному стані (22,9 % усіх хворих були гомозиготами). Результати аналізу мутацій C28a2Y і H63D гена *HFE-1* в обох обстежених групах наведено в табл. 2.

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що частота мутації H63D є статистично вірогідно вищою у групі хворих на муковісцидоз ($p = 0,01$). У свою чергу індивіди, які були гомозиготами H63D, статистично вірогідно частіше зустрічалися в групі хворих на МВ у порівнянні з контрольною популяцією ($p = 0,05$).

На підставі отриманих даних можна зробити припущення про асоціацію мутації H63D з розвитком патології органів системи травлення у хворих на муковісцидоз, що є свідченням на користь висунутої нами гіпотези про роль гена *HFE-1* як модифікатора клінічного фенотипу при МВ. Аналогічні результати нещодавно отримано дослідниками з Ірландії [13].

Роль мутацій генів *SMN* і *NAIP* у розвитку різних клінічних типів спінальної м'язової атрофії. Аналіз делецій 7-го та 8-го екзонів генів *SMN* (*survival motor neuron gene*) проведено у 74 хворих. Диференційну детекцію послідовностей 7-го та 8-го екзонів генів *teSMN* і *cenSMN* проводили за допомогою рестрикційного аналізу продуктів ПЛР. Також проаналізовано делецію 5-го екзона гена *NAIP* (*neuronal apoptosis inhibitory protein gene*), локалізованого в хромосомній області 5q13 [14]. Оскільки усі хворі з обстеженої групи були точно прогенотиповані, нами досліджувалась асоціація між окремими мутантними генотипами і клінічними проявами СМА. В обстеженій групі з 74 хворих I тип захворювання з найтяжчим проявом СМА діагностовано у 42 пацієнтів, II тип — у 23 пацієнтів і групу з 9 осіб склали хворі з III, прогностично найменш тяжким типом СМА. За результатами аналізу мутацій (табл. 3) виявлено, що в переважній більшості хворих (82,8 %) гомо-

зигот за протяжною делецією 7-го і 8-го екзонів гена *teSMN* та 5-го екзона гена *NAIP* (усього 29 осіб) діагностовано I тип СМА. Важливо зазначити, що в групі хворих з цим генотипом виявлено лише одного хворого (3,4 %) з клінічними ознаками III типу СМА, а II тип СМА діагностовано у чотирьох пацієнтів (13,8 %).

В усіх обстежених хворих з таким генотипом спостерігалось тяжке ураження проксимальних м'язів ніг, яке у переважній більшості супроводжувалося ураженням проксимальних м'язів рук. Приблизно у половині хворих з цієї групи також відмічено ураження м'язів діафрагми та міокарда, а в деяких з них виявляли ще й ураження екстраокулярних м'язів та тремор рук. Найчисленнішою була група хворих — гомозигот за менш протяжною делецією 7-го та 8-го екзонів гена *SMN* (37 пацієнтів). У цій групі у 43,2 % хворих виявлено клінічні ознаки найтяжчого (I) типу СМА, 46 % пацієнтів мали клінічні ознаки II типу СМА, у решти (10,8 %) з цим генотипом діагностовано III тип СМА. У хворих з таким генотипом, як і у гомозигот за делецією послідовності генів *teSMN* та *NAIP*, виявляли ураження проксимальних м'язів ніг, яке в переважній більшості поєднувалося з подібним ураженням м'язів рук. Проте у хворих з цим генотипом майже вдвічі рідше, ніж у гомозигот за більш протяжною делецією, знайдено ураження міокарда, м'язів діафрагми, тремор рук і ураження екстраокулярних м'язів. У половині хворих з генотипом, до складу якого входить химерний ген *cen/teSMN* (8 осіб), діагностовано «найм'якший» (III) тип СМА. Характерно, що у таких хворих спостерігали лише симптоми ураження м'язів верхніх та нижніх кінцівок. Результати аналізу асоціації мутантного генотипу та клінічних проявів у хворих свідчать про провідну роль мутацій 7-го екзона гена *teSMN* у розвитку СМА, оскільки відсутність даної послідовності гена нами виявлено практично у всіх хворих на СМА. Протяжні делеції 7-го і 8-го екзонів гена *teSMN* та 5-го екзона гена *NAIP* зафіксовано приблизно у 40 % хворих. Також простежується чітка асоціація між протяжністю делеції у хромосомній області 5q13 і межами атрофічних процесів у м'язах кінцівок та внут-

Таблиця 3

Клінічні прояви спінальної м'язової атрофії (СМА) у хворих з різними генотипами

Тип СМА	Частота генотипу, %		
	Гомозиготна делеція 7-го і 8-го екзонів гена <i>telSMN</i> та 5-го екзона гена <i>NAIP</i> , <i>n</i> = 29	Гомозиготна делеція 7-го і 8-го екзонів гена <i>telSMN</i> , <i>n</i> = 37	Химерний ген <i>cen/telSMN</i> , <i>n</i> = 8
I (<i>n</i> = 42)	82,8	43,2	25
II (<i>n</i> = 23)	13,8	46	25
III (<i>n</i> = 9)	3,4	10,8	50

рішніх органів (діафрагми, серця). Найтяжчі прояви СМА спостерігали у хворих з протяжними делеціями, які охоплювали 7-й та 8-й екзони гена *telSMN*, 5-й екзона гена *NAIP*, а в деяких випадках сягали меж ділянки повторів *AgICA*. Досі остаточно не з'ясовано роль мутацій гена *NAIP* у патогенезі СМА. В нашому дослідженні в одного з батьків хворого на СМА виявлено гомозиготну делецію 5-го екзона гена *NAIP*, проте жодних клінічних симптомів спінальної м'язової атрофії в нього не спостерігалося. Виходячи з цього можна припустити, що мутантний ген *NAIP* виступає в ролі модифікуючого фактора фенотипу СМА.

Асоціація мутацій CGG-ділянки гена FMR-1 та клінічних ознак у хворих з діагнозом синдрому Мартіна-Белла (ламкої X-хромосоми). Нами проведено клініко-генетичне обстеження 53 пацієнтів із синдромом Мартіна-Белла, їхніх матерів та сибсів. В рамках цього обстеження проаналізовано мутації в *CGG-ділянці* гена *FMR-1* (*fragile mental retardation gene-1*) в усіх хворих і їхніх родичів та цитогенетично досліджено ламкі сайти в хромосомній області *Xq27* [15]. Також ми вивчили асоціацію мутацій гена *FMR-1* з клінічними проявами СМБ. Мутації *CGG-області* гена *FMR-1* у вигляді експансії (збільшення кількості *CGG-повторів* до 250 і вище) виявлено лише у 14 пацієнтів. У 12 випадках з них зафіксовано наявність ламкого сайту в області *Xq27* (ці 12 хворих увійшли до групи спостереження 1). Групу спостереження 2 склали 30 пацієнтів з ламким сайтом в області *Xq27* та нормальною протяжністю ділянки *CGG-повторів* гена *FMR1*. Ми провели диференційний аналіз асоціації генотипу і фенотипу у хворих з груп спостереження 1 і 2, а також з групи спостереження 3 (хворі, в яких не зафіксовано мутацій у гені *FMR-1* і ламкість у хромосомній області *Xq27*). У пацієнтів усіх трьох груп проведено аналіз 27 виявлених у них фенотипічних ознак. В групі спостереження 1 деякі ознаки (змінені пропорції обличчя і пролапс мітрального клапана) зустріча-

лися статистично вірогідно частіше, ніж в інших групах. У свою чергу, такі діагностично високоінформативні ознаки, як макроорхідизм та ніс з ключовидним кінчиком, також статистично вірогідно частіше зустрічали у хворих з мутаціями в гені *FMR-1*. Отримані нами результати аналізу інтелектуальних функцій у хворих з мутаціями *CGG-ділянки* гена *FMR-1* свідчать про те, що порушення внаслідок мутацій експресії білка *FMR-1* призводить до порушення функціонування лобних відділів кори головного мозку. На користь цього свідчать відносно низькі результати спеціальних субтестів, які, на думку авторів тесту вимірювання інтелекту [16], є показниками порушень формування програми дій (стратегічне мислення) та контролю за їхнім виконанням (функції лобних частин).

За результатами аналізу показників інтелекту у матерів та сестер хворих — носіїв премутації (збільшення кількості *CGG-повторів* у гені *FMR-1* від 50 до 250) або повної мутації (кількість *CGG-повторів* більш за 250) з різним ступенем експансії *CGG-області* виявлено від'ємну кореляцію між кількістю *CGG-повторів* та коефіцієнтом інтелекту (*IQ*) — $ra = -0,96$ (табл. 4).

Проте такої кореляції не знайдено для хворих хлопчиків — носіїв повної мутації. Імовірно, що при експансії *CGG-последовності* до розміру повної мутації відбуваються принципові патологічні зміни, які рееструються як суттєве зниження показників інтелекту. Дуже цікаві дані нещодавно отримано в роботах Повеля [17]. Справа в тому, що лише частина (біля 40 %) жінок — носіїв повної мутації мають зниження інтелекту різного ступеня. Жінки з премутацією не відрізняються за особливостями психічного розвитку від контрольної групи (жінки з нормальним інтелектом та відсутністю премутацій чи мутацій у гені *FMR-1*). Особливості інтелектуального розвитку у розумово відсталих жінок з повною мутацією не відрізняються від показників у хворих чоловіків з СМБ (у них теж

Таблиця 4

Результати молекулярно-генетичного, фенотипічного і патопсихологічного обстежень матерів та сибсів жіночої статі з премутацією

Жінка — носій премутації	Розмір CGG-інсерції (тис. п. н.)	Наявність (+) чи відсутність (-) фенотипічних проявів	IQ загальний, %
Б (сестра)	1,8	+	68
В (сестра)	1,5	+	84
В (мати)	1,4	-	89
А (мати)	1,4	-	90
П (сестра)	1,4	-	91
Б (мати)	1,4	-	91
П (мати)	1,3	-	93
Л (мати)	1,3	-	94
С (мати)	1,2	-	98
Г (мати)	1,2	-	100

знаходять переважне зниження функцій стратегічного мислення та планування дій — ураження лобних відділів мозку). Жінки з повною мутацією і нормальними показниками IQ суттєво відрізняються від контрольної групи (жінки з такими ж показниками інтелекту і з відсутністю мутацій у гені FMR-1). У них знаходять переважне порушення математичних здібностей, особливо таких, які потребують кількох послідовних дій та функцій соціального інтелекту (порушення контакту з оточуючими, навіть часто контакту очей, підвищений рівень соціальної тривоги).

Досить широке варіювання фенотипічних ознак (у тому числі особливостей психічних функцій) як у хворих з експансією CGG-ділянки гена FMR-1, так і у жінок — носіїв премутації може бути пов'язане з явищем соматичного мозаїцизму, зафіксованим нами практично в усіх цих осіб. Передбачають, що наявність у різних тканинах і, в першу чергу, в нейронах головного мозку алелів з різними змінами послідовності гена може спричинювати широке стадіє- та тканиноспецифічне варіювання експресії цього гена [18] і, як наслідок, модифікацію клінічних ознак у хворих. Модифікуючий вплив на фенотип також може мати взаємодія індивідуального комплексу інших генів з факторами довкілля.

Вивчення кореляції генотип—фенотип у хворих на фенілкетонурию. Аналіз мутацій гена фенілаланінгідроксилази проведено у 28 пацієнтів, хворих на ФКУ [19]. «Класичну» форму ФКУ мав 21 пацієнт, так звану «проміжну» форму було діагностовано у чотирьох хворих, а «м'яку» форму — у трьох.

Результати генотипування хворих на «класич-

ну» форму ФКУ наведено нижче (X — неідентифікована мутація):

Генотип	Кількість хворих
R408W/R408W	7
R408W/R158Q	2
R408W/R261Q	1
R408W/Ivs10nt546	2
R408W/Ivs12nt1	1
R408W/Y414C	1
S273F/R413P	1
R252W/X	1
R408W/X	1
7-й екзон/X	1
X/X	3

Таким чином, нами показано, що група мутацій, асоційованих із «класичною» формою ФКУ, є досить гетерогенною. Виходячи з аналізу представлених даних можна зробити висновок про те, що мутація R408W у гомозиготному стані призводить до розвитку фенотипу, характерного для «класичної» форми ФКУ. З приводу мутацій R158Q, G272X, Ivs10nt546 і Ivs12nt1 можна зазначити, що ці мутації в компаунді з мутацією R408W також можуть бути асоційовані з «класичною» формою ФКУ.

У чотирьох хворих, біохімічні показники яких відповідали «проміжній» формі ФКУ, нами ідентифіковано чотири різних генотипи: R408W/P281L, R261Q/X, R408W/R252W і X/X. З нашої точки зору, особливий інтерес становлять результати аналізу клінічного фенотипу у двох пацієнтів з генотипами R408W/P281L і R408W/R252W. Виявлено, що мутації R408W, P281L і R252W призводять до

повної втрати активності ферменту [20]. При аналізі літературних даних з'ясувалося, що для всіх пацієнтів з такими генотипами визначалася «класична» форма ФКУ [21]. У нашому ж випадку біохімічні показники дозволяють класифікувати у цих хворих «проміжну» форму ФКУ. Результати клінічного обстеження цих хворих також вказують на нетиповий перебіг хвороби. Одним із пояснень цих фактів може бути припущення стосовно того, що за рахунок гіпотетичного компенсаторного ефекту при сполученні в генотипі двох різних мутацій, кожна з яких спричинює повну втрату функції ферменту, в деяких випадках спостерігається відносно «м'який» фенотип [22].

За результатами аналізу генотипів у хворих з різними клінічними формами ФКУ звертає на себе увагу той факт, що в групах хворих із «проміжною» і «м'якою» формами фенілкетонуриї відсоток ідентифікованих нами мутацій значно нижчий, ніж у групі хворих з «класичною» формою ФКУ (16 і 41 % відповідно). Можна припустити, що «проміжна» і «м'яка» форми асоційовані з рідкісними мутаціями, локалізованими або в інтронних послідовностях, або в послідовностях екзонів, які ми не аналізували.

Особливо цікавою є група хворих, які мали однаковий генотип — R408W/Y414C, але суттєво відрізнялись за перебігом хвороби.

Відповідно до літературних даних, мутація Y414C належить до числа «м'яких», оскільки зберігається 28—50 % активності фенілаланінгідроксилази [20]. В обстеженій нами групі хворих два пацієнти з однаковим генотипом R408W/Y414C мали різні клінічні форми ФКУ: «класичну» та «м'яку».

З нашої точки зору наведені вище випадки, коли у хворих з однаковими фенотипами спостерігали різні клінічні форми захворювання, можна пояснити впливом інших генів, які модифікують формування клінічного фенотипу.

На основі узагальнення одержаних даних розроблено концепцію формування фенотипу моногенних спадкових захворювань як результату взаємодії мутантного генотипу з ендегенними (іншими генами) та екзогенними (чинниками довкілля) модифікуючими факторами.

L. A. Livshits, A. M. Bychkova, M. V. Nechyporenko, O. Yu. Ekshyyan, N. V. Gryshenko, S. G. Malyarchuk, V. N. Pampukha, S. A. Kravchenko, N. A. Afanaseva, N. A. Pichkur, G. V. Skiban

Association between genotype and clinical manifestation of the most spread monogenic hereditary disorders

Summary

Genotype-phenotype association study was performed in Ukraine

with CF, PKU, SMA and fragile X syndrome patients. The data of correlation between some mutations in CFTR, PAH, SMN, FMR-1 genes and special phenotype manifestations were obtained. A possible role of other modulating genes involved in CF, PKU, SMA and fragile X syndrome pathogenesis is discussed. The data obtained suggest that HFE-1 gene may be a modifying factor of phenotype manifestations in CF patients.

L. A. Livshits, A. M. Bychkova, M. V. Nechyporenko, A. Yu. Ekshyyan, N. V. Gryshenko, S. G. Malyarchuk, V. N. Pampukha, S. A. Kravchenko, N. A. Afanaseva, N. A. Pichkur, G. V. Skiban

Асоціація генотипа с клінічними проявленнями наиболее распространенных моногенных наследственных заболеваний

Резюме

Проведен анализ ассоциации генотипа и фенотипа у больных муковисцидозом, (МВ) фенилкетонурией, спинальной мышечной атрофией и синдромом Мартина-Белла из Украины. Получены данные про корреляцию определенных мутаций генов TRPM, PAH, SMN и FMR-1 с отдельными проявлениями фенотипа. Обсуждается роль других генов-модификаторов, задействованных в патогенезе муковисцидоза, фенилкетонурии, спинальной мышечной атрофии и синдрома Мартина-Белла. На основании полученных данных сделано предположение о том, что ген HFE-1 может быть модифицирующим фактором клинического фенотипа у больных муковисцидозом.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lander E. S., Linton L. M., Birren B. et al. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome // *Nature*.—2001.—409, N 6822.—P. 860—921.
2. Лівшиць Л. А., Кравченко С. А., Гришко В. І., Мальярчук С. Г., Екшиян О. Ю., Нечипоренко М. В., Пампуха В. М., Бычкова Г. М., Бариляк І. Р., Михайлець Л. П., Сопко Н. І., Скибан Г. В., Антупкін Ю. Г., Лук'янова О. М., Бужівська Т. І., Мацука Г. Х. ДНК-діагностика найбільш поширених в Україні спадкових захворювань моногенної природи (10-річний досвід проведення ДНК-діагностики в Україні) // *Перинатологія та педіатрія*.—2000.—№ 1.—С. 3—7.
3. Wehnert M., Herrmann F. H., Metzke H., Thiele H. Erste ergebnisse bei der genomischen carrier diagnostik in Risikosippen mit haemophilie A und B in der DDR // *Z. Gesamte Inn. Med.*—1988.—43, N 16.—S. 441—444.
4. Маніатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1985.—420 с.
5. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Science*.—1988.—239, N 4838.—P. 487—491.
6. Guldberg P., Guttler F. A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis // *Nucl. Acids Res.*—1993.—21, N 9.—P. 2261—2262.
7. Sheffield V. C., Cox D. R., Lerman L. S., Myers R. M. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1989.—86, N 1.—P. 232—236.
8. Лівшиць Л. А. Молекулярно-генетичний аналіз в деяких екзонах гена TRPM у хворих на муковісцидоз з України // *Цитологія і генетика*.—2000.—34, № 4.—С. 6—9.
9. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis // *Respiration*.—2000.—67.—P. 117—133.

10. Feder J. N., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy D. A., Basava A., Dormishian F., Domingo R., Jr., Ellis M. C., Fullan A., Hinton L. M., Jones N. L., Kimmel B. E., Kronmal G. S., Lauer P., Lee V. K., Loeb D. B., Mapa F. A., McClelland E., Meyer N. C., Mintier G. A., Moeller N., Moore T., Morikang E., Wolff R. K. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis // *Nat. Genet.*—1996.—13.—P. 399—408.
11. Rohlf E. M., Shaheen N. J., Silverman L. M. Is the hemochromatosis gene a modifier locus for cystic fibrosis? // *Genet. Test.*—1998.—2, N 1.—P. 85—88.
12. Пампуха В. М., Розуменко В. Д., Черченко А. П., Лівшиць Л. А. Аналіз мутацій С282У та Н63D гена спадкового гемохроматозу HFE серед населення України та хворих з гліальними пухлинами мозку // *Біополімери і клітина*.—2003.—19, № 6.—С. 536—541.
13. Devaney J., Maher M., Smith T., Houghton J. A., Glennon M. HFE alleles in Irish cystic fibrosis population // *Genet. Test.*—2003.—7, N 2.—P. 155—158.
14. Экишиян А. Ю., Лившиц Л. А., Бычкова А. М., Афанасьева Н. А., Бариляк И. Р. Молекулярно-генетический анализ спинальной мышечной атрофии (СМА) в семьях высокого риска из разных регионов Украины // *Цитология и генетика*.—1997.—31, № 6.—С. 75—81.
15. Бычкова А. М., Малярчук С. Г., Лившиц Л. А. Клинический и молекулярно-генетический анализ синдрома ломкой X-хромосомы // *Цитология и генетика*.—1999.—33, № 4.—С. 70—76.
16. *Измерение интеллекта у детей* / Под ред. Ю. З. Гильбуха.—Киев, 1991.—267 с.
17. Powell L. Girls with fragile X // *Nat. Conf. Fragile X Soc.*—New York, 2003.—P. 11—25.
18. Jin P., Warren S. T. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome // *Hum. Mol. Genet.*—2000.—12, N 9.—P. 901—908.
19. Nechyporenko M. V., Kravchenko S. A., Livshits L. A. PKU in Ukraine: PAH gene mutations and minihaplotype analysis // *Bull. Mol. Med.*—2001.—9, N 10.—P. 1—6.
20. Erlandsen H., Stevens R. C. The structural basis of phenylketonuria // *Mol. Genet. Metab.*—1999.—68, N 2.—P. 103—125.
21. Guldberg P., Romano V., Ceratto N., Bosco P., Ciuna M., Indelicato A., Mollica F., Meli C., Giovannini M., Riva E. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in southern Europe // *Hum. Mol. Genet.*—1993.—2, N 10.—P. 1703—1707.
22. Guldberg P., Rey F., Zschocke J., Romano V., Francois B., Michiels L., Ulrich K., Hoffmann G. F., Burgard P., Schmidt H., Meli C., Riva E., Dianzani U., Ponzzone A., Rey J., Guttleret F. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype // *Amer. J. Hum. Genet.*—1998.—63, N 1.—P. 71—79.

УДК 575.11+577.21+577.213.3+616.832-009.55
Надійшла до редакції 27.02.04