

МУТАЦІЇ ГЕНА АТР7В СЕРЕД ПАЦІЄНТІВ ВИСОКОГО РИЗИКУ ХВОРОБИ ВІЛЬСОНА З УКРАЇНИ

Г. МАКУХ¹, І. ГАЙБОНІУК¹, А. ЗАРІНА², О.М. СЕМЕРЯК³, Л. ГАЙЛІТЕ³

¹ ДУ «Інститут спадкової патології Національної Академії Медичних Наук України» вул. Лисенка, 31-а, 79008, Львів, Україна

² Ризький університет імені Пауля Страдіня, 16, вул. Дзерцисма, Рига, Латвія, LV-1007

³ КЗ ЛОР «Львівська обласна клінічна лікарня», вул. Некрасова, 4, 79008, Львів, Україна

E-mail: makukh.h@ihp.lviv.ua, ivankagaiboniuk@gmail.com, zarina.agnese@gmail.com, dr.orchyk@gmail.com, linda.gailite@rsu.lv

Хвороба Вільсона (ХВ) – аутосомне рецесивне захворювання зумовлене порушенням метаболізму міді, унаслідок спадкових мутацій гена АТР7В, спектр і частота мутацій значно відрізняється у різних популяціях. Визначити перелік найчастіших мутацій гена АТР7В серед пацієнтів з України для впровадження їх генетичного тестування в практику медико-генетичного консультування. Матеріалом для дослідження слугували зразки ДНК виділені із лейкоцитів 90 пацієнтів (41 чоловічої і 49 жіночої статі) віком від 3 до 60 років з клінічними та біохімічними проявами захворювання. Проведено молекулярно-генетичний аналіз найпоширенішої для європейців мутації с.3207С > А (Н1069Q) методом PCR Vi-PASA. У 23 пацієнтів, які набрали 3 бали за бальною системою Лейтциг провели секвенування екзонів гена АТР7В. У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу мутацій гена АТР7В у 23,3 % пацієнтів з клінічними проявами хвороби, генетично верифіковано діагноз хвороба Вільсона. У пацієнтів дослідженої вибірки виявлено 5 різних мутацій та 5 одонуклеотидних поліморфізмів у гені АТР7В. Найпоширенішу для європейців мутацію (с.3207С > А) виявили у 28 пацієнтів, включаючи 15 випадків гомозиготності. У 6 випадках мутація с.3207С > А була у компаунд гетерозиготному стані з іншими мутаціями гена АТР7В : 3 – с.2304dupC (8 екзон), 1 – с.2128G > А (8 екзон), 1 – с.3011A > С (13 екзон), 1 – с.3402delC (15 екзон). У 7 осіб окрім мутації Н1069Q інших перебудов виявлено не було. Частота найпоширенішого в Європі патогенного алелю с.3207С > А (Н1069Q) гена АТР7В серед пацієнтів набрали 3 та більше балів відповідно до бальної системи діагностичних тестів сягає 76,8 %. Частота алелі с.2304dupC серед генетично верифікованих випадків становить 7 %. Впроваджено в практику генетичне тестування двох мутацій гена АТР7В (с.3207С > А та с.2304dupC), які є частими серед пацієнтів з хворобою Вільсона з України. У третини пацієнтів при відсутності патогенних алелів в екзонних послідовностях гена АТР7В виявлено наявність одного чи декількох одонуклеотидних поліморфізмів, серед

них декілька не патогенних варіантів та один поліморфізм, асоційований з підвищенням ризику розвитку хвороби Альцгеймера (с.2495А > G). Отримані результати вказують на високу інформативність генетичного тестування мутацій с.3207С > А та с.2304dupC гена АТР7В серед осіб з хворобою Вільсона з України.

Ключові слова: Гена АТР7В, мутація, хвороба Вільсона, Україна.

Вступ. Хвороба Вільсона (ХВ) – аутосомне рецесивне захворювання зумовлене порушенням метаболізму міді та накопичення йонів Cu²⁺ в клітинах, унаслідок спадкових мутацій гена АТР7В. В нормі екскреція міді відбувається через гепатобіліарну систему за участю білка АТР7В [1], який складається з 1465 амінокислот та відіграє ключову роль в нормальному розподілі міді в печінці, нирках, плаценті та мозку [2]. АТР7В належить до сім'ї аденозин трифосфатів Р-типу, сім'ї, що нараховує велику кількість мембранних білків, які відповідають за транспорт катіонів з клітини [3]. Протеїн складається з п'яти доменів: аміно-термінальний мідь зв'язуючий фрагмент, який містить шість метал-зв'язуючих мотивів; трансмембранний домен, який визначає специфічність білка АТР7В [4]; АТФ зв'язуючий домен; фосфорилуючий фрагмент; домен гідролізу АТФ [5]. Зв'язування міді відбувається за допомогою залишків цистеїну в метал зв'язуючому домені, яких в білку є шість [6]. Також, ймовірно, роль цих шести доменів полягає у видаленні металу з інших лігандів, таких як цитоплазматичні шаперони НАН1р [7] та АТОХ1 [8]. Білок АТР7В також доставляє мідь в кров, стимулюючи перетворення апоцерулоплазміну в церулоплазмін. Біосинтетичні та гомеостатичні функції білка АТР7В визначаються міддю [9]. Мутації, які спричиняють втрату функції білка призводять до накопичення токсичного металу в клітині

та розвиток хвороби Вільсона (Вільсона-Коновалова, Вільсона-Коновалова-Вестфалія або гепатолентикулярна дегенерація) [10]. Описано більше 300 патогенних варіантів гена *ATP7B*, для яких підтверджено роль у розвитку захворювання, проте спектр і частота мутацій значно відрізняється у різних популяціях [23]. Найпоширеніша серед європейців мутація – р. His1069Gln (14 екзон), тоді як в Азії – р. Arg778Leu (8 екзон) [24], а в Бразилії – р. His1069Gln і 3402delC в екзоні 15 [23].

Унаслідок мутацій гена *ATP7B* накопичення металу в клітинах спричиняє порушення структури жирних кислот мембрани та її руйнування. Коли кількість міді в клітинах більша, ніж кількість білків, які її зв'язують, відбувається окисне пошкодження цілісності мембрани внаслідок реакції Фентона [11]. Це призводить до запалення печінки, її фіброзу та цирозу. Також, з печінки в кров виділяється мідь, не з'єднана з церулоплазміном, яка осідає по всьому організму і тоді подібні реакції відбуваються у місцях її локалізації [12]. Існують препарати, які можуть виводити з клітин іони Cu^{2+} , минаючи нефункціональний білок [13]. Також, є дані літератури, які говорять про те, що цинк володіє антагоністичною дією, індукуючи синтез мідь зв'язуючого ліганду, ймовірно, тіонеїну, в клітинах слизової оболонки, куди потрапляє мідь з продуктами харчування та робить її недоступною для транспортування в кров [14–16].

Не зважаючи на мультисистемність проявів [2], вчасне призначення правильного лікування дозволяє позбутись усіх симптомів та повернутися до нормального життя, але для коректного лікування має бути вчасно правильно поставлений діагноз. Захворювання має неспецифічні прояви, тому вчасна діагностика часто викликає значні труднощі. Зважаючи на наявність ефективного лікування, але відсутність вчасної діагностики через мультисистемність проявів, дуже важливо щоб генетична діагностика цього захворювання була швидкою та економічно доступною. Зробити це можна шляхом впровадження генетичного тестування найпоширеніших патогенних варіантів гена *ATP7B*.

Мета. Визначити перелік найчастіших мутацій гена *ATP7B* серед пацієнтів з України для впровадження їх генетичного тестування в практику медико-генетичного консультування.

Матеріали та методи. Дослідження включало зразки ДНК 90 пацієнтів (41 чоловічої статі і 49 жіночої) віком від 3 до 60 років з клінічними та біохімічними проявами захворювання. Усім пацієнтам дослідної групи було виключено вірусні гепатити, алкогольний цироз, медикаментозне ушкодження печінки. Пацієнтів з прогресуючими неврологічними проявами було відібрано методом аналізу родоводів. Було зібрано реєстраційні карти, які включають інформацію про вік, стать, місце праці і проживання, наявність шкідливих звичок та дані лабораторних обстежень. Забір матеріалу проводили після підписання пацієнтами інформаційної згоди на проведення дослідження та дозволу на зберігання ДНК в банку. Дослідження було затверджено комітетом біоетики ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України».

Геномну ДНК виділяли з лейкоцитів периферійної крові методом висоловлювання [18]. Проводили молекулярно-генетичний аналіз найпоширенішої для європейців мутації $c.3207C > A$ (H1069Q), яку виявляли методом PCR Bi-PASA [19]. Проводили ПЛР використовуючи дві пари праймерів, 2-кратний Green Master Mix (Thermo Scientific, USA), в автоматичному режимі на ампліфікаторі T-CY (CreaCon technologies, NL) з наступними температурно-часовими параметрами: 1 цикл 95 °C 5 хв; 30 циклів: 94 °C – 1 хв, 54 °C – 30 сек, 72 °C – 25 сек [28]. Електрофорез проводили в 2%-ному агарозному гелі. На наступному етапі відібрано ДНК пацієнтів, які набрали 3 бали за бальною системою (23 особи) та провели їм секвенування 8 та 14 екзонів гена *ATP7B*. Особам, у яких не виявили жодних перебудов у цих екзонах провели повне секвенування гена *ATP7B*. Дослідження проводили з використанням набору для секвенування Big Dye Terminator v.3.1 (Thermo Fisher Scientific, США), використовуючи адаптований протокол виробника. Послідовності праймерів доступні на запитом.

Оцінку патогенності нових мутацій підтверджували за допомогою онлайн-ресурсу Mutation Taster, Polyphen2 та опублікованої бази даних ClinVar та Wilson disease database. Вирівнювання послідовності проводили відносно референтної гена *ATP7B* людини (NM_000053.3) в програмі UGENE. Номенклатура мутацій подавалась відповідно до стандартів HGVS [20].

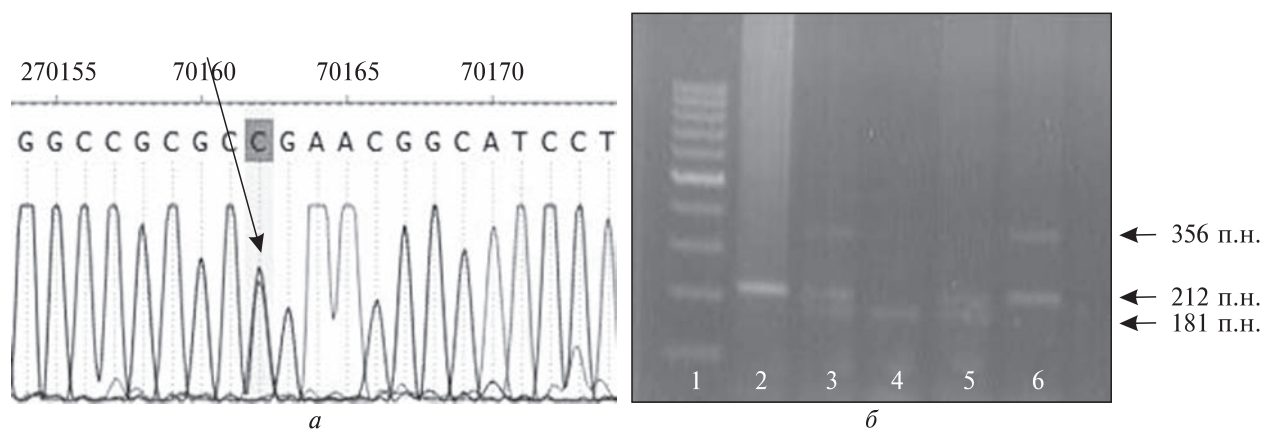


Рис. 1. *a* – хроматограма мутації с.3207С > А (GC[C/A]GA) гена *ATP7B*; *б* – електрофореграма детекції мутації с.3207С > А гена *ATP7B* методом електрофоретичного розділення ампліфікованих PCR BI-PASA фрагментів у 2%-ному агарозному гелі. Стрілка вказує на місце мутації

Результати досліджень та їх обговорення. Генетичне обстеження усіх пацієнтів починали з тестування найпоширенішої для європейців мутації с.3207С > А (Н1069Q). Для валідації методики детекції мажорної мутації Н1069Q шляхом двокерункової ПЛР відібрано зразки, у яких мутація підтверджена прямим секвенуванням. Наявність фрагменту розміром 212 пар основ свідчить про відсутність мутації Н1069Q. Присутність фрагменту розміром 181 пар основ свідчить про наявність мутації Н1069Q в гомозиготному стані. Два фрагменти розміром 212 та 181 пар основ свідчать про мутацію в гетерозиготному стані (рис. 1, б). Результати детекції мутації с.3207С > А гена *ATP7B* представлено на рис. 1, а, б.

За результатами аналізу мажорної мутації гена *ATP7B*, у п'ятнадцяти осіб виявлено алель с.3207С > А (Н1069Q) в гомозиготному стані, у тринадцяти пацієнтів у гетерозиготному. Результати дослідження генетичного тестування мажорної мутації с.3207С > А гена *ATP7B* у групі осіб з клінічними проявами ХВ наведено в табл. 1.

Базуючись на результатах генетичного аналізу та наявних клінічних проявів було відібрано групу пацієнтів для наступного етапу – секвенування екзонів. Сформовано вибірку 23 із 75 пацієнтів, які набрали 3 та більше бали відповідно до бальної шкали діагностичних тестів Лейпцига для ХВ. Відповідно до бальної системи діагностичних тестів, яка була прийнята на 8 міжнародному з'їзді, присвяченому хворобі

Таблиця 1. Результати генетичного тестування мажорної мутації с.3207С > А гена *ATP7B* у групі осіб з клінічними проявами ХВ

Генотип	Частота, n, %
с.3207С > А/с.3207С > А	15 (16,7)
с.3207С > А/Н	13 (14,4)
Н/Н	62 (68,9)
Всього обстежених	90 (100)
Алель	Частота алелю серед всіх обстежених
<i>ATP7B</i> 3207А	43/180 (23,8)

Примітка. * N – відсутність мутації с.3207С > А.

Таблиця 2. Характеристика групи пацієнтів, яким проведено повне секвенування гена *ATP7B*

Клінічні прояви	Гетерозиготи за мутацією с.3207С > А	Не виявлено мажорної мутації гена <i>ATP7B</i>
Загальна кількість, n	13	10
Наявність тільки неврологічних проявів	2/13	2/10
Наявність тільки печінкових проявів	9/13	7/10
Змішані прояви	2/13	1/10
Середній вік на час звернення, років	31,3	25,8
Середній бал за системою Лейпциг	3,5–4	2,5–3

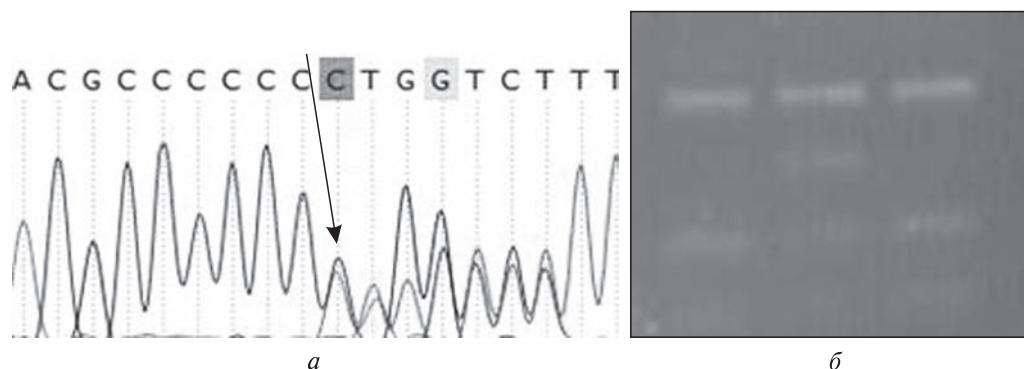


Рис. 2. *a* – хроматограма секвенування 8 екзону гена *ATP7B*, що містить мутацію *c.2304dupC* (CC[A/C]TG) у гетерозиготному стані; *б* – електрофореграма детекції мутації *c.2304dupC* методом поліморфізму довжин рестриктних фрагментів та електрофоретичного розділення в 2%-ному агарозному гелі

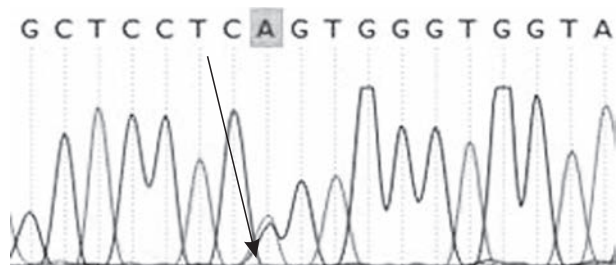


Рис. 3. Хроматограма секвенування 8 екзону гена *ATP7B*, що містить мутацію *c.2128G > A* (TC[G/A]GT). Стрілка вказує місце перебудови

Вільсона, який відбувся в 2001 р. в Лейпцигу діагноз хвороба Вільсона може бути підтверджено, коли пацієнт набирає принаймні 4 бали за цією системою. Характеристика пацієнтів, які відібрані для повного секвенування гена *ATP7B* наведена в табл. 2.

Секвенування гена розпочато з 8 та 14 екзонів гена *ATP7B*, оскільки за даними літератури саме в цих екзонах найчастіше зареєстровані патогенні мутації, які зумовлюють розвиток ХВ. У чотирьох пацієнтів виявлено однакову перебудову – вставку одного нуклеотида: цитозину в позиції 2304 яка асоціюється із ХВ. Мутація спричиняє зсув рамки зчитування у 8 екзоні та зміну амінокислотної послідовності білка (p.Glu770Argfs), і як наслідок порушення функціонування трансмембранного домену мідь зв'язуючої АТФ-ази Р-типу 7 класу.

Мутацію *c.2304dupC* в межах екзона 8 гена *ATP7B* виявлено у 4 пацієнтів. У трьох з них мутація була в компаунд гетерозиготному стані

з мажорною мутацією *c.3207C > A*, що верифікує діагноз хвороба Вільсона. В однієї пацієнтки після секвенування усєї послідовності гена та детекції великих делецій та дуплікацій виявлено лише мутацію *c.2304dupC* в одному алелі гена. У пацієнта зафіксовано високий рівень міді в добовій сечі, (166 g/l), фіброзні зміни в печінці, високі рівні АЛТ (83 mg/l), АСТ (61 mg/l). Відповідно до бальної системи діагностичних тестів, наявність однієї мутації дає 1 бал, високий рівень міді в добовій сечі – 1, фіброзні зміни в печінці – 2 бали. Сумарно пацієнтка набирає 4 бали, що дозволяє підтвердити діагноз. Оскільки, мутація *c.2304dupC* виявлена в чотирьох пацієнтів з дослідженої вибірки, вважаємо її частою для жителів України. В практику впроваджено генетичне тестування мутації *c.2304dupC* для покращення діагностики хвороби Вільсона методом поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів. Використовуючи онлайн-ресурс primer design 3, підібрано праймери (forward 5'-GTCACGACT-GTGCACAAAGC-3', revers 5'-TTCTGAACCT-GAAGCTGCTGT-3') для ампліфікації фрагменту 8 екзона гена *ATP7B* величиною 285 пар нуклеотидів. В межах цього фрагменту є два сайти рестрикції для ендонуклеази HpyF10VI (MwoI) і при наявності дуплікації цитозину в позиції 2304 (мутація *c.2304dupC*) один сайт рестрикції порушується. Запропонований метод впроваджено в практику для генетичного тестування мутації *c.2304dupC* гена *ATP7B* (рис. 2, б).

В одного пацієнта в межах екзону 8 виявлено заміну гуаніну на аденін в позиції 2128

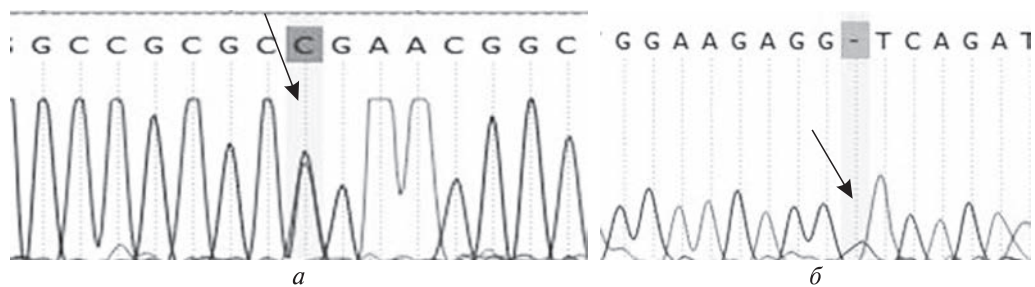


Рис. 4. *a* – хроматограма секвенування 13 екзону гена *ATP7B*, що містить мутацію с.3011A > C (GC[A/C]GA), *б* – хроматограма секвенування 15 екзону гена *ATP7B*, що містить мутацію с.3402delC. Стрілка вказує на місце перебудови

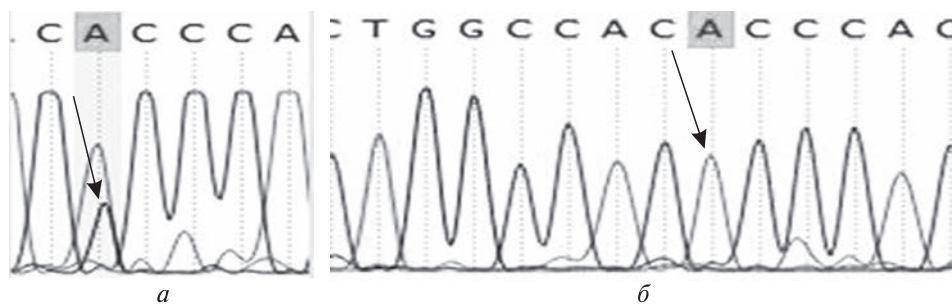


Рис. 5. Хроматограма секвенування 13 екзону гена *ATP7B*, що містить SNP с.2973G>A (AC[G/A]CC) у гетерозиготному (*a*) та гомозиготному (*б*) стані

кДНК – мутація с.2128G > A. Ця перебудова зумовлює заміну гліцину в 710 позиції амінокислот на серин в трансмембранному домені мідь зв'язуючої АТФ-ази Р-типу 7 класу. Мутація описана в базі даних HGMD як патогенна (rs137853285). Хроматограма детекції мутації с.2128G > A гена *ATP7B* представлена на рис. 3. Ця перебудова виявлена у 40 річного пацієнта з неврологічними ураженнями в компаунд гетерозиготному стані з мажорною мутацією с.3207C > A.

Особам, у яких не виявили перебудов в екзонах 8 та 14 провели секвенування решти екзонів гена *ATP7B*. За результатами секвенування та порівняння з референтною послідовністю, в 9 екзоні гена не виявлено перебудов у жодному із зразків ДНК. Відповідно до даних літератури, в жителів європейської популяції мутації в цьому екзоні виявляються рідко. Секвенування цієї ділянки гена не є інформативне для досліджуваної популяції.

Наступним етапом роботи було секвенування з 10 до 15 екзонів. У межах екзона 13 виявлено заміну аденіну на цитозин в положенні 3011

(с.3011A > C). Ця перебудова зумовлює заміну глутаміну в 1004 позиції амінокислот на пролін в металозв'язуючому домені АТФ-ази Р-типу 7 класу. Мутація описана в базі даних HGMD як патогенна (rs587783307). Хроматограма детекції мутації с.3011A > C гена *ATP7B* представлена на рис. 4, *a*. Ця перебудова виявлена у 27 річного пацієнта з асцитом нез'ясованого генезу в компаунд гетерозиготному стані з мажорною мутацією с.3207C > A.

В одному із зразків в послідовності 15 екзона гена *ATP7B* виявлено втрату одного нуклеотиду в позиції 3402 – мутацію с.3402delC. Ця перебудова зумовлює заміну аланіну на глутамін в позиції 1135 амінокислот АТФ-зв'язуючого домену білка АТФ7В (p.Ala1135GlnfsX13). Мутація веде до зсуву рамки зчитування та описана в базі даних HGMD як патогенна (rs137853281). Хроматограма детекції мутації с. 3402delC гена *ATP7B* представлена на рис. 4, *б*. Ця перебудова виявлена в компаунд гетерозиготному стані з мажорною мутацією с.3207C > A у 17 річного хлопця з ідіопатичним гепатитом. Хроматограми секвенування екзонів 13 та 15, що містять

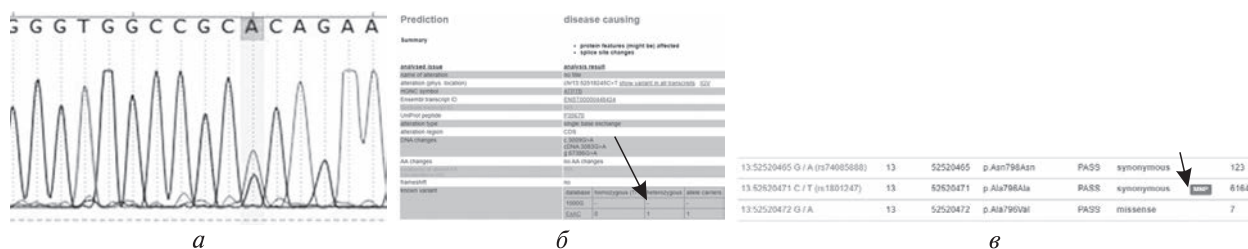


Рис. 6. а – хроматограма секвенування гена *ATP7B*, що містить перебудову с.3009G>A (GC[G/A]CA) у гетерозиготному стані, б – заміна в базі Mutation tester, в – заміна в базі ClinVar

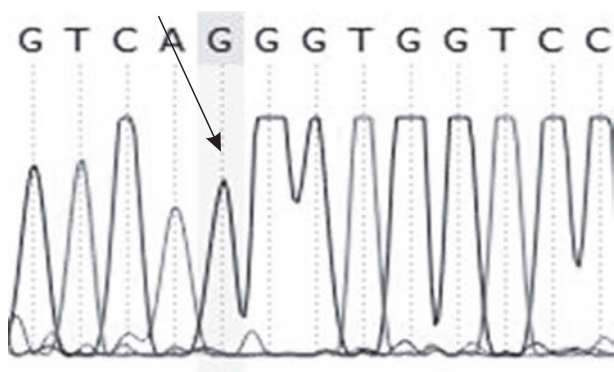


Рис. 7. Хроматограма секвенування гена *ATP7B* з SNP с.2495A > G (CA[A/G]GG) у гомозиготному стані. Стрілка вказує місце перебудови

перебудови представлено на рис. 4, а, б, відповідно.

У двох осіб в межах екзона 13 виявлено заміну аденіну на цитозин в положенні 2973 кДНК (с.2973A > C). Цей варіант не веде до зміни

послідовностей амінокислот у білку, і трактується у базах даних як однонуклеотидний поліморфізм rs1801248. У дослідженій вибірці ця однонуклеотидна заміна виявлена у двох пацієнтів в гетерозиготному стані та в одного в гомозиготному стані. (рис. 5, а, б).

Також, виявлено двох осіб із заміною гуаніну на аденін в положенні 3009 гена *ATP7B* (с.3009G > A) в гетерозиготному стані (рис. 6, а). Цей варіант не веде до зміни послідовностей амінокислот у білку, і трактується у базах даних як однонуклеотидний поліморфізм rs1801247, хоча до недавнього часу в базі ExAc він трактувався як варіант невідомого значення.

Відповідно до отриманих результатів секвенування екзону 10 гена *ATP7B*, виявлено місценс мутацію с.2495A > G в гетерозиготному стані у 6 пацієнтів, та в гомозиготному стані у двох осіб. Хроматограму секвенування 10 екзона гена *ATP7B* наведено на рис. 7. Ця перебудова зумовлює заміну лізину на аргінін в позиції

Таблиця 3. Результати генетичного тестування мажорної мутації с.3207C > A та секвенування екзонів гена *ATP7B* у групі осіб з клінічними проявами ХВ

Алель гена <i>ATP7B</i>	Клінічне значення	Номер екзона	Кількість виявлених випадків		
			в гомозиготному стані	в гетерозиготному стані	в компаунд гетерозиготному стані
с.3207C > A	Патогенний	14	15	7	6
с.2304dupC	Патогенний	8	—	1	3
с.2128G > A	Патогенний	8	—	—	1
с.3402delC	Патогенний	15	—	1	1
с.3011A > C	Патогенний	13	—	—	1
с.3009G > A	Поліморфізм	13	—	—	2
с.2495A > G	Алель ризику розвитку хвороби Альцгеймера	10	2	2	4
с.1366C > G	Поліморфізм	3	3	—	5
с.1366C > T	Не відоме (не описано)	3	—	1	—
с.2973G > A	Поліморфізм	13	1	—	2

832 амінокислотної послідовності трансмембранного домену білка *ATP7B* (p.Lys832Arg). Проте, цей варіант в базах даних трактується як одонуклеотидний поліморфізм (rs1061478), клінічне значення якого залишається дискусійним. Є дані про те, що цей алель в гомозиготному стані порушує обмін міді та підвищує ризик розвитку хвороби Альцгеймера на 75 % [21]. У дослідженні даний варіант виявлено у пацієнтів з клінічними проявами характерними для ХВ за відсутності інших патогенних мутацій. У п'ятих пацієнтів окрім варіанту с.2495A > G виявлено одонуклеотидні заміни в екзонах 2, 3 та 13.

У результатів секвенування з 16 по 21 екзонів гена *ATP7B* в досліджуваних зразках ДНК пацієнтів, що набрали три та більше балів за діагностичною шкалою Лейпциг відмінностей від референтної послідовності гена не виявлено. Аналіз даних літератури показав, що для європейської популяції мутації в цих екзонах не є частими [24]. Також, не виявлено відмінностей від референтної послідовності у межах 1, 11 та 12 екзонів гена *ATP7B*. Секвенування 2 екзону проводили в три етапи, оскільки екзон складається з 1233 п.н., але жодних перебудов у ньому не виявлено.

Відповідно до баз даних мутацій гена *ATP7B*, рідкісними є мутації в екзоні 3. У даному дослідженні в межах третього екзона гена *ATP7B* в чотирьох осіб виявлено одонуклеотидний поліморфізм с.1366C > G (AG[C/T]GT) rs1801244 – заміна амінокислоти валіну на лейцин в положенні 456 в гетерозиготному стані, у трьох – в гомозиготному стані (рис. 8, а). В одного із пацієнтів виявлено одонуклеотидний поліморфізм с.1366C > T, (AG[C/T]GT) в гетерозиготному стані (рис. 8, б)

У 8 із 23 пацієнтів, які набрали 3 та більше бали за шкалою Лейпциг, в екзонних послідовностях гена *ATP7B* виявлено наявність одонуклеотидних поліморфізмів при відсутності патогенних алелів. За останні кілька років поняття «синонімічні мутації» дуже змінилось. Дослідження молекулярної еволюції встановили, що у всіх організмах синонімічні кодони перебувають під тиском селекції. Ці спостереження були доповнені біохімічними, біофізичними та генетичними дослідженнями, які дають механістичні пояснення того, як таке зміщення кодону

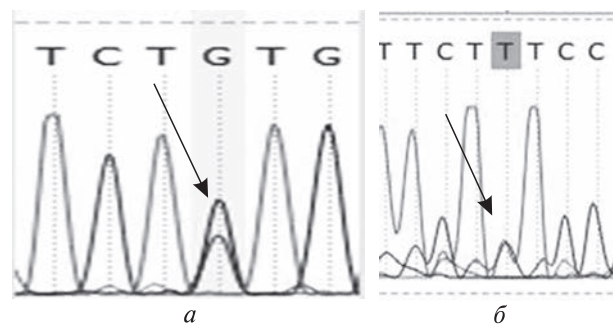


Рис. 8. а – хроматограма секвенування гена *ATP7B* з SNP с.1366C > G (AG[C/G]GT), б – с.1366C > T (GAG[C/T]GT). Стрілки вказують місце перебудови

впливає на механізми транскрипції та контролю експресії генів, ефективності укладання білка та узгодженої експресії функціонально пов'язаних генів. Інтерес до цього явища посилюється зв'язком між багатьма синонімічними мутаціями та хворобами людини. Таким чином, синонімічні мутації, які колись вважались нешкідливими, все частіше проявляються, як патогенні [22].

Відповідно до отриманих результатів виявлено 5 різних мутацій та 5 одонуклеотидних поліморфізмів у гені *ATP7B* серед 23 пацієнтів з діагнозом хвороба Вільсона. Результати генетичного тестування мажорної мутації с.3207C > A та секвенування екзонів гена *ATP7B* у групі осіб з клінічними проявами ХВ наведено в табл. 3. Частоти патогенних алелів гена *ATP7B* у групі осіб з клінічними проявами ХВ з України приведено у табл. 4.

Як свідчать дані, наведені в табл. 3 та 4 найпоширенішу для європейців мутацію (с.3207C >

Таблиця 4. Частота патогенних алелів гена *ATP7B* у групі осіб з клінічними проявами ХВ з України

Алель гена <i>ATP7B</i>	Частота алеля, n, %	
	серед генетично верифікованих випадків хвороби Вільсона, (n = 21)	Серед усіх обстежених з підозрою хвороби Вільсона, (n = 90)
с.3207C > A	37 (88)	43 (23,9)
с.2304dupC	3 (7,1)	4 (2,2)
с.3402delC	1 (2,3)	2 (1,1)
с.2128G > A	1 (2,3)	1 (0,6)
с.3011A > C	1 (2,3)	1 (0,6)
Всього алелів	42	180

> А) виявили у 28 пацієнтів, включаючи 15 випадків гомозиготності. У 6 випадках мутація с.3207С > А була у компаунд гетерозиготному стані з іншими мутаціями гена *ATP7B*: 3 – с.2304dupС (8 екзон), 1 – с.2128G > А (8 екзон), 1 – с.3011А > С (13 екзон), 1 – с.3402delС (15 екзон). У 7 осіб окрім мутації Н1069Q інших перебудов виявлено не було. Частота алеля с.3207С > А серед генетично верифікованих випадків становить 88 %. Частота алеля с.2304dupС серед генетично верифікованих випадків становить 7 %, що є вищою, ніж в інших популяціях [23].

Крім того, слід додати, що робота не включала дослідження інтронних послідовностей, які теж можуть містити патогенні варіанти. Також варто зазначити, що можливо не у всіх пацієнтів, які увійшли в дослідну групу порушення зумовлені саме хворобою Вільсона. Через значний поліморфізм клінічних проявів дуже важко відрізнити неврологічні прояви ХВ від інших неврологічних порушень. Слід також відзначити, що збільшений рівень міді може виявлятися при гепатитах іншого генезу, окрім ХВ, що утруднює коректний клінічний відбір групи пацієнтів з ХВ [12]. Не є частою ознакою й наявність кільця Кайзера, яке розвивається переважно на пізніх стадіях хвороби. Усі ці обмеження мають значення для отримання показника частот мутантних алелів в пацієнтів з України. При перерахунку на усю групу 90 пацієнтів з клінічними проявами ХВ, частота найпоширенішого в Європі патогенного алелю с.3207С > А (Н1069Q) гена *ATP7B* становить лише 24 %. При обрахунках у пацієнтів, які набрали 3 та більше балів відповідно до бальної системи діагностичних тестів – у 43 з 56 (частота алелю 76,8 %). Серед генетично верифікованих випадків частота мажорної мутації с.3207С > А (Н1069Q) гена *ATP7B* сягає 88 %, що вказує на її високу інформативність для застосування в практичній діагностиці та медико-генетичному тестуванні. Також, інформативним показником є співвідношення серед уражених пацієнтів з ХВ гетеро- та гомозигот за певною мутацією. У нашій роботі це співвідношення склало 15 до 10 на користь гомозиготного генотипу, що свідчить на користь високої частоти мутації с.3207С > А (Н1069Q) гена *ATP7B* серед пацієнтів з ХВ з України.

Отримані результати вказують на високу інформативність генетичного тестування мутацій с.3207С > А та с.2304dupС гена *ATP7B* серед осіб з хворобою Вільсона з України.

Висновки. У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу мутацій гена *ATP7B* у 23,3 % пацієнтів з клінічними проявами хвороби, генетично верифіковано діагноз хвороба Вільсона. Частота найпоширенішого в Європі патогенного алелю с.3207С > А (Н1069Q) гена *ATP7B* серед пацієнтів, які набрали 3 та більше балів відповідно до бальної системи діагностичних тестів сягає 76,8 %. Впроваджено в практику генетичне тестування двох мутацій гена *ATP7B* (с.3207С > А and с.2304dupС), які є частими серед пацієнтів з хворобою Вільсона з України. У третини пацієнтів при відсутності патогенних алелів в екзонних послідовностях гена *ATP7B* виявлено наявність одного чи декількох одонуклеотидних поліморфізмів, серед них декілька не патогенних варіантів та один поліморфізм, асоційований з підвищенням ризику розвитку хвороби Альцгеймера (с.2495А > G).

Дотримання етичних стандартів. Усі процедури, виконані в дослідженні за участю людей, відповідають етичним стандартам національного Комітету з дослідницької етики та Гельсінської декларації 1964 р. і її подальших змін або відповідним нормам етики. Від кожного, з включених в дослідження учасників, було отримано інформовану добровільну згоду.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Дослідження було проведено в межах стажування Макух Г.В. на базі молекулярно-генетичної лабораторії за фінансової підтримки Ризького університету ім. Пауля Страдіня.

MUTATIONS IN GENE *ATP7B* IN UKRAINIAN PATIENTS WITH HIGH RISK OF WILSON'S DISEASE

H. Makukh, I. Hayboniuk, A. Zarina,
O.M. Semeriak, L. Gailite

SI Institute of Hereditary Pathology of Ukrainian National Academy of Medical Science,
31-a, Lysenko str., Lviv, Ukraine
Riga Stradins University,
16 Dzirciema str., Riga, Latvia, LV-1007

KI LOR «Lviv Regional Clinical Hospital»,
4, Nekrasova str., Lviv, Ukraine, 79008
E-mail: makukh.h@ihp.lviv.ua, ivankagaiboniuk@gmail.com, zarina.agnese@gmail.com, dr.orchyk@gmail.com, linda.gailite@rsu.lv

Wilson's disease (WD) is an autosomal recessive condition, caused by the impaired metabolism of copper due to hereditary mutations in the gene *ATP7B*, the spectrum and frequency of mutations are considerably different in different populations. To define the list of the most frequent mutations in the gene *ATP7B* in patients from Ukraine with the purpose of introducing the genetic testing into the practice of medical and genetic consulting. The materials for the study were DNA samples, isolated from leukocytes of 90 patients (41 males and 49 females), aged 3–60, with clinical and biochemical signs of the disease. The molecular and genetic analysis of the mutation c.3207C > A (H1069Q), the most common among Europeans, was conducted by the method of PCR Bi-PASA. The sequencing of exons of the gene *ATP7B* was conducted for 23 patients, who had scored 3 by the Leipzig scoring system. The molecular and genetic analysis of the mutations in the gene *ATP7B* verified Wilson's disease genetically in 23.3 % of patients with clinical signs of the disease. Five different mutations and five single-nucleotide polymorphisms in the gene *ATP7B* were determined in the patients of the investigated sampling. The mutation (c.3207C > A), most common for Europeans, was determined in 28 patients, including 15 cases of homozygosity. In 6 cases the mutation c.3207C > A was in compound heterozygous state with other mutations in the gene *ATP7B*: 3 – c.2304dupC (8 exon), 1 – c.2128G > A (8 exon), 1 – c.3011A > C (13 exon), 1 – c.3402delC (15 exon). No other transformations, except for mutation H1069Q, were found in 7 persons. The frequency of the pathogenic allele c.3207C > A (H1069Q) of the gene *ATP7B*, most widespread in Europe, among patients who scored 3 and more points according to the scoring system of diagnostic tests, was 76.8 %. The frequency of allele c.2304dupC among genetically verified cases was 7 %. The genetic testing of two mutations in the gene *ATP7B* (c.3207C > A and c.2304dupC), which are frequent among patients with Wilson's disease from Ukraine, was introduced into practice. The third of patients did not have pathogenic alleles in exon sequences of the gene *ATP7B* but had one or several single nucleotide polymorphisms, including several non-pathogenic variants and one polymorphism associated with the increased risk of developing Alzheimer's disease (c.2495A > G). The obtained results indicate high informative value of genetic testing of mutations c.3207C > A and c.2304dupC in the gene *ATP7B* among Ukrainian patients with Wilson's disease.

МУТАЦИИ ГЕНА *ATP7B* СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ ВЫСОКОГО РИСКА БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА ИЗ УКРАИНЫ

Г. Макух, И. Гайбонюк, А. Зарина,
О. Семеряк, Л. Гайлите

Болезнь Вильсона (Вильсона – Коновалова) – ауто-сомно рецессивное заболевание обусловленное нарушением метаболизма меди из-за наследственных мутаций гена *ATP7B*, спектр и частота мутаций значительно отличается в разных популяциях. Определить перечень наиболее частых мутаций гена *ATP7B* среди пациентов из Украины для внедрения их генетического тестирования в практику медико-генетического консультирования. Материалом для исследования послужили образцы ДНК выделенные из лейкоцитов крови 90 пациентов (41 мужского и 49 женского пола) в возрасте от 3 до 60 лет с клиническими и биохимическими проявлениями заболевания. Проведено молекулярно-генетический анализ распространенной для европейцев мутации c.3207C > A (H1069Q) методом PCR Bi-PASA. У 23 пациентов, которые набрали более 3 единиц по балльной системе Лейпциг провели секвенирование экзонов гена *ATP7B*. В результате проведенного молекулярно-генетического анализа мутаций гена *ATP7B* у 23,3 % пациентов с клиническими проявлениями болезни, генетически верифицированы диагноз болезнь Вильсона. У пациентов исследованной выборки выявлено 5 различных мутаций и 5 однонуклеотидных полиморфизмов гена *ATP7B*. Распространенную для европейцев мутацию (c.3207C > A) обнаружили у 28 пациентов, включая 15 случаев гомозиготности. В 6 случаях мутация c.3207C > A была в компаунд гетерозиготном состоянии с другими мутациями гена *ATP7B*: 3 – c.2304dupC (8 экзон), 1 – c.2128G > A (8 экзон), 1 – c.3011A > C (13 экзон), 1 – c.3402delC (15 экзон). У 7 человек кроме мутации H1069Q других перестроек обнаружено не было. Частота самого распространенного в Европе патогенного аллеля c.3207C > A (H1069Q) гена *ATP7B* среди пациентов набрали 3 и более баллов в соответствии с балльной системы диагностических тестов достигает 76,8 %. Частота аллеля c.2304dupC среди генетически верифицированных случаев составляет 7 %. Внедрены в практику генетическое тестирование двух мутаций гена *ATP7B* (c.3207C > A и c.2304dupC), которые являются частыми среди пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова из Украины. У трети пациентов при отсутствии патогенных аллелей в экзонных последовательностях гена *ATP7B* обнаружено наличие одного или нескольких однонуклеотидных полиморфизмов, среди них нескольких не патогенных

вариантов и один полиморфизм, ассоциированный с повышением риска развития болезни Альцгеймера (с.2495A > G). Полученные результаты указывают на высокую информативность генетического тестирования мутаций с.3207C > A и с.2304dupC гена *ATP7B* среди лиц с болезнью Вильсона из Украины.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Bhargava, K., Bahde, R., Kapoor, S., Palestro, C., and Gupta, S., Evaluation of biliary copper excretion in a rat model of Wilson's disease by PET imaging with ⁶⁴Cu-asialofetuin, *J. Nucl. Med.*, 2012, vol. 53, no. supplement 1, 1544 p.
- Langley, A., Dameron, C.T., Copper and anesthesia: clinical relevance and management of copper related disorders. *Anesthesiol. Res. Pract.*, 2013, vol. 2013, pp. 750901. doi: 10.1155/2013/750901.
- Yu, C.H., Lee, W., Nokhrin, S., and Dmitriev, O.Y., The structure of metal binding domain 1 of the copper transporter ATP7B reveals mechanism of a singular Wilson disease mutation, *Sci. Rep.*, 2018, vol. 12, no. 8, pp. 581–2.
- Candan, A., Yaozong, L., and Pernilla, W-S., The six metal binding domains in human copper transporter, ATP7B: molecular biophysics and disease-causing mutations, *Biometals.*, 2017, vol. 30, no. 6, pp. 823–40.
- Huster, D., Kühne, A., Bhattacharjee, A., Raines, L., Jantsch, V., Noe, J., Schirrmeister, W., Sommerer, I., Sabri, O., Berr, F., Mössner, J., Stieger, B., Caca, K., and Lutsenko, S., Diverse functional properties of wilson disease ATP7B variants, *Gastroenterology*, 2012, vol. 142, no. 4, pp. 947–56.
- Shanmugavel, K.P., Wittung-Stafshede P., Copper relay path through the N-terminus of Wilson disease protein, ATP7B, *Metallomics*, 2019, vol. 11, pp. 1472–80.
- Yu, C.H., Yang, N., Bothe, J., Tonelli, M., Nokhrin, S., Dolgova, N.V., Braiterman, L., Lutsenko, S., and Dmitriev, O.Y., The metal chaperone Atox1 regulates the activity of the human copper transporter ATP7B by modulating domain dynamics, *J. Biol. Chem.*, 2017, vol. 292, no. 44, pp. 18169–77.
- Hatori, Y., and Lutsenko, S., The Role of Copper Chaperone Atox1 in Coupling Redox Homeostasis to Intracellular Copper Distribution, *Antioxidants (Basel)*, 2016, vol. 5, no. 3, pp. 25.
- Polishchuk, R.S., Polishchuk, E.V., From and to the Golgi: Defining the Wilson disease protein road map, *FEBS Lett*, 2019, vol. 593, pp. 2341–50.
- Chang, I.J., Si, H.H., The genetics of Wilson disease, *Handbook of Clinical Neurology*, 2017, vol. 142, pp. 19–34.
- Khosravifarsani, M., Shabestani, A. M., Pouramir, M., and Zabihi, E., Effects of Fenton Reaction on Human Serum Albumin: An *In Vitro* Study, *Electron. Physician.*, 2016 vol. 8, no. 9, pp. 2970–6.
- Zhong, H.-J., Sun, H.-H., Xue, L.-F., McGowan, E. M., and Chen, Y., Differential hepatic features presenting in Wilson disease-associated cirrhosis and hepatitis B-associated cirrhosis, *World J. Gastroenterol.*, 2019, vol. 25, no. 3, pp. 378–87.
- Lorincz, M.T., Wilson disease and related copper disorders, *Handb. Clin. Neurol.*, 2018, vol. 147, pp. 279–92.
- Weiss, K.H., Stremmel, W., Clinical considerations for an effective medical therapy in Wilson's disease, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2014, vol. 1315, pp. 81–5.
- Li, W.J., Chen, C., You, Z.F., Yang, R.M., and Wang, X.P., Current Drug Managements of Wilson's Disease: From West to East, *Curr. Neuropharmacol.*, 2016, vol. 14, no. 4, pp. 322–5.
- Purchase, R., The treatment of Wilson's disease, a rare genetic disorder of copper metabolism, *Sci. Prog.*, 2013, vol. 96, pp. 19–32.
- Tanner, S., Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE, *ScienceDirect*, 2019, pp. 1–11.
- Pat. 32044 UA, MPK G01N33/49 (2006.01) Method of isolating DNA from leukocytes of peripheral blood, M. applicant Makukh, H., Zastavna, D., Tyrkus, SI Institute of Hereditary Pathology, NAMSU. No. u200801896; appl. 14.02.2008; publish. 25.04.2008, Bul. No. 8. (In Ukrainian).
- Polakova H., Katrincsakova B., Minarik G., Ferakova E., Ficek A., Baldovic M., et al. Detection of His1069Gln mutation in Wilson disease by bidirectional PCR amplification of specific alleles (BI-PASA) test. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2007, vol. 26, pp. 91–6. <https://varnomen.hgvs.org/>.
- Bucossi, S., Mariani, S., Ventriglia, M., Polimanti, R., Gennarelli, M., and Bonvicini, C., Association between the c. 2495 A > G ATP7B Polymorphism and Sporadic Alzheimer's Disease, *International Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 2011, ID 973692, 9 p.
- Sauna, Z.E., Kimchi-Sarfaty, C., Synonymous Mutations as a Cause of Human Genetic Disease. In *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). 2013. doi: 10.1002/9780470015902.a0025173.
- Haiboniuk, I., Spectrum and frequency of mutations in gene *ATP7B* in different populations and ethnic groups. *Bulletin of LNU*, 2019; vol. 80, pp. 3–11 (in Ukrainian).
- Gomes, A., Dedoussis, G.V., Geographic distribution of ATP7B mutations in Wilson disease. *Ann. Hum. Biol.*, 2016, vol. 43, pp. 1–8.

Надійшла в редакцію 13.01.20
Після доопрацювання 27.02.20
Прийнята до друку 18.07.20